



Universidad Nacional Autónoma de México

Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Facultad de Química

Inhibición de la
betaína aldehído deshidrogenasa
de
Pseudomonas aeruginosa

Tesis presentada por:

Víctor Javier Zaldívar Machorro

para optar por el grado académico de Doctor en Ciencias (Bioquímica)

Directora de tesis:

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares

México, D.F.

Diciembre de 2011



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección de la **Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares** en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares Facultad de Química, UNAM

Dr. Mario Calcagno Montans Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez Facultad de Medicina, UNAM

Agradezco a la Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, por su asesoría y apoyo brindados para llevar a cabo los experimentos de espectrofotometría de dicroísmo circular.

Se reconoce la asesoría técnica del M. En C. Carlos Mújica Jiménez del laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM, en los experimentos de cromatografía de exclusión molecular y Western-Blot.

Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por conacyt y del complemento de beca otorgado por DGEP-UNAM, para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente **Dra. Marietta Tuena Sangri**

Vocal **Dra. Gloria Soberón Chávez**

Secretario **Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez**

Suplente **Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez**

Suplente **Dr. Alfredo Torres Larios**

Esta tesis fue defendida en examen profesional presentado el día 16 de diciembre de 2011.

Agradecimientos:

A la **Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares** mi más sincero agradecimiento por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, así como por su apoyo y amistad incondicional.

A los Drs. **Mario Calcagno Montans** y **Juan Pablo Pardo Vázquez** un agradecimiento muy sincero por sus comentarios y consejos durante todo el tiempo que duró el doctorado.

A los miembros del jurado por las críticas y sugerencias en la revisión de la tesis.

Al CONACyT y a la DGEP por la becas otorgadas para la realización de este trabajo.

Dedicatoria

A mi madre, hermanos y primas por estar ahí siempre que los necesito.

A mis amigos del posgrado, Lilia Angélica, Daniel y Javier Andrés, por compartir su tiempo conmigo en las buenas y en las malas.

A mis compañeros del laboratorio 102, Carlos, Fati, Lilian, Ángel, Alice, Mina y Rodrigo, por contar con su ayuda siempre que me atoraba con algún experimento.

A Lety García del Posgrado en Biquímica por todo el apoyo brindado.

Y a todos los que me apoyaron en esta etapa de mi vida profesional y personal y a todo aquel que tiene la suficiente fe para ver su nombre escrito en esta página.

"GRACIAS"

Índice

| | Página |
|---|---------------|
| Abreviaturas | 4 |
| I. Resumen | 8 |
| II. Abstract | 11 |
| III. Antecedentes | 13 |
| III.1. Aldehído deshidrogenasas | 13 |
| III.1.1. Funciones fisiológicas y reacción catalizada por las ALDHs | 13 |
| III.1.2. Mecanismo de reacción de las ALDHs | 14 |
| III.1.3. Clasificación de las ALDHs | 15 |
| III.1.4. Estructura de las ALDHs | 17 |
| III.2. Betaína aldehído deshidrogenasas (BADHs) | 20 |
| III.2.1. Generalidades de las BADHs | 20 |
| III.2.2. Localización intracelular | 21 |
| III.2.3. Relaciones filogenéticas | 21 |
| III.2.4. Especificidad y función biológica | 22 |
| III.2.5. Estructura tridimensional | 23 |
| III.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 25 |
| III.3.1. <i>Pseudomonas</i> | 25 |
| III.3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 25 |
| III.3.3. Factores de patogenicidad de <i>P. aeruginosa</i> | 26 |
| III.3.4. Resistencia de <i>P. aeruginosa</i> a los antibióticos | 28 |
| III.3.5. Metabolismo de <i>P. aeruginosa</i> | 28 |
| III.3.6. Catabolismo de colina en <i>P. aeruginosa</i> | 29 |
| III.3.7. Respuesta al estrés osmótico en <i>P. aeruginosa</i> | 32 |
| III.4. Betaína aldehído deshidrogenasa de <i>P. aeruginosa</i> | 33 |
| III.4.1. La enzima BADH de <i>P. aeruginosa</i> (PaBADH) | 33 |
| III.4.2. Mecanismo cinético | 34 |
| III.4.3. Estructura tridimensional | 34 |
| III.4.4. Utilización de la coenzima | 36 |
| III.4.5. Estabilidad | 39 |
| III.5. Inhibidores enzimáticos | 41 |

| | |
|--|-----------|
| III.5.1. Generalidades de los inhibidores enzimáticos | 41 |
| III.5.2. Inhibidores irreversibles | 41 |
| III.5.3. Análisis de la inhibición irreversible | 42 |
| III.5.4. Descubrimiento y diseño de inhibidores | 42 |
| III.6. Modificación química de aminoácidos | 45 |
| III.6.1. Grupos reactivos de aminoácidos | 45 |
| III.6.2. Modificación de grupos tiol | 45 |
| III.6.2.1. Modificación de grupos tiol por agentes alquilantes | 46 |
| III.6.2.2. Modificación de grupos tiol por agentes oxidantes | 47 |
| III.6.2.3. Modificación de grupos tiol por otros tioles y disulfuros | 47 |
| III.7. Disulfiram y sus metabolitos | 49 |
| III.7.1. Disulfiram | 49 |
| III.7.2. Metabolismo del DSF | 51 |
| III.8. Planteamiento del problema | 53 |
| IV. Hipótesis | 54 |
| V. Objetivos | 55 |
| V.1. Objetivo general | 55 |
| V.2. Objetivos particulares | 55 |
| VI. Materiales y métodos | 57 |
| VI.1. Reactivos | 57 |
| VI.2. Microorganismos, medios de cultivos y conservación de las cepas | 57 |
| VI.3. Síntesis química de los metabolitos del DSF | 58 |
| VI.4. Sobre-expresión, purificación y ensayo de actividad de la PaBADH | 59 |
| VI.5. Inactivación <i>in vitro</i> de la PaBADH | 60 |
| VI.6. Inactivación <i>in situ</i> de la PaBADH | 60 |
| VI.7. Inhibición del crecimiento bacteriano en agar y medio líquido | 61 |
| VI.8. Determinación del MIC en medio líquido | 61 |
| VI.9. Evaluación de la estructura secundaria de la PaBADH químicamente modificada | 62 |
| VI.10. Desnaturalización térmica de la PaBADH químicamente modificada ... | 63 |
| VI.11. Fluorescencia intrínseca y extrínseca de la PaBADH químicamente modificada | 63 |
| VI.12. Cromatografía de exclusión molecular de la PaBADH químicamente modificada | 63 |

| | |
|--|-----|
| VI.13. Estudios de agregación de la PaBADH químicamente modificada | 64 |
| VI.14. Modelado del sitio activo de la PaBADH modificada covalentemente por DSF o sus metabolitos | 64 |
| VII. Resultados y discusión | 65 |
| VII.1. Efectos de la modificación química de la PaBADH <i>in vitro</i> | 65 |
| VII.1.1. Inactivación <i>in vitro</i> de la PaBADH por DSF y sus metabolitos | 65 |
| VII.1.2. Efecto del DSF y sus metabolitos sobre la estructura de la PaBADH | 68 |
| VII.1.2.1 Efecto del DSF y sus metabolitos sobre la estructura cuaternaria de la PaBADH | 68 |
| VII.1.2.2. Efecto del DSF y sus metabolitos sobre la estructura terciaria de la PaBADH | 71 |
| VII.1.2.3. Efecto del DSF y sus metabolitos sobre la estructura secundaria de la PaBADH | 73 |
| VII.1.2.4. Efecto del DSF y sus metabolitos sobre la estabilidad térmica de la PaBADH | 73 |
| VII.2. Efectos de la modificación química de la PaBADH <i>in situ</i> | 77 |
| VII.2.1. Inactivación <i>in situ</i> de la PaBADH por DSF y sus metabolitos | 77 |
| VII.2.2. Efecto del DSF y sus metabolitos sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>P. aeruginosa</i> | 78 |
| VII.2.3. Determinación de la MIC de MeDDTC-SO y de MeDTC-SO ₂ para <i>P. aeruginosa</i> | 85 |
| VIII. Conclusiones | 89 |
| IX. Perspectivas | 92 |
| X. Bibliografía | 93 |
| XI. Anexos | 117 |

Abreviaturas

| | |
|----------------|--|
| A ⁻ | Base de Brønsted, nucleófilo |
| ALDH | Aldehído deshidrogenasa |
| ANS | 8-Anilino-1-naftaleno sulfonato |
| AMADH | Aminoaldehído deshidrogenasa |
| BADH | Betaína aldehído deshidrogenasa |
| <i>betA</i> | Gen que codifica para la colina deshidrogenasa en γ -proteobacterias |
| <i>betB</i> | Gen que codifica para la betaína aldehído deshidrogenasa en γ -proteobacterias |
| <i>betI</i> | Gen que codifica para el operador del operón <i>betIBA</i> en γ -proteobacterias |
| <i>betIBA</i> | Operón que contiene los genes <i>betA</i> , <i>betB</i> y <i>betI</i> en γ -proteobacterias |
| <i>betT1</i> | Gen que codifica para el transportador de colina en γ -proteobacterias |
| CEM | Centro espectral de masas |
| DC | Dicroísmo circular |
| DS | Desviación estándar |
| DDC | Dietilditiocarbamato |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DSF | Disulfiram; bis[dietiltiocarbamoil] disulfuro |
| DTNB | Ácido 5,5'-ditio-bis[2-nitrobenzoico] |
| DTT | Ditiotreitol |
| ϵ | Coefficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) |
| E | Enzima |
| E.C. | Comisión de enzimas (por sus siglas en inglés: Enzyme Commission) |
| EDTA | Ácido etilendiaminetetraacético (por sus siglas en inglés: Ethylenediaminetetraacetic acid) |
| EI | Complejo enzima-inhibidor reversible |
| EI* | Complejo enzima-inhibidor irreversible |
| E.S. | Error estándar |
| GcBADH | Betaína aldehído deshidrogenasa de <i>Gadus callaris</i> |

| | |
|------------------------|--|
| GB | Glicina betaína |
| HsALDH2 | ALDH2 mitocondrial de humano |
| HsSSADH | Succinato semialdehído deshidrogenasa mitocondrial de humano |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta eficiencia (por sus siglas en inglés: High-performance liquid chromatography) |
| I | Inhibidor |
| IPTG | β -D-isopropiltiogalactósido |
| k_{inact} | Constante de velocidad de inactivación |
| K_M | Constante de Michaelis-Menten |
| k_{obs} | Constante de velocidad de inactivación observada |
| λ | Longitud de onda |
| LB | Medio de cultivo Luria Bertani |
| MALDI-TOF | Espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (por sus siglas en inglés: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-Flight) |
| mBBr | Monobromobimano; 3-(bromometil)-2,5,6-trimetil-1H,7H-pirazolo[1,2-a]pirazol-1,7-diona |
| MeDDTC-SO | S-metil- <i>N,N</i> -dietilditiocarbamoil sulfóxido |
| MeDDTC-SO ₂ | S-metil- <i>N,N</i> -dietilditiocarbamoil sulfona |
| MeDTC-SO | S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamoil sulfóxido |
| MeDTC-SO ₂ | S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamoil sulfona |
| MH | Medio de cultivo Mueller-Hinton |
| MIC | Concentración mínima inhibitoria (por sus siglas en inglés: Minimal inhibitory concentration) |
| MMTS | Metil metanotiosulfonato |
| NAD(P) ⁺ | NAD ⁺ o NADP ⁺ |
| NAD(P)H | NADH o NADPH |
| NAD ⁺ | Forma oxidada del dinucleótido de adenina y nicotinamida |
| NADP ⁺ | Forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida y adenina-2'-fosfato |

| | |
|------------------|--|
| NADH | Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina |
| NADPH | Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina-2'-fosfato |
| NAGGN | <i>N</i> -acetilglutaminilglutamina amida |
| NBS | <i>N</i> -bromosuccinimida; 1-bromo-2,5-pirrolidindiona |
| NEM | <i>N</i> -etilmaleimida; 1-etilpirrol-2,5-diona |
| PaBADH | Betaína aldehído deshidrogenasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PAO | Óxido de fenilarsina |
| PAO1 | Cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> serotipo O1 |
| pCAL-BetB | Vector de expresión que contiene el gen que codifica para la PaBADH |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction) |
| pdb | Banco de datos de estructuras de proteínas (por sus siglas en inglés, Protein Data Bank) |
| p-MB | p-Hidroximercuribenzoato |
| PVDF | Fluoruro de polivinilideno (por sus siglas en inglés: polyvinylidene fluoride) |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés) |
| RnALDH3 | Aldehído deshidrogenasa 3 de rata |
| SAM | <i>S</i> -adenosil metionina |
| SEC | Cromatografía de exclusión molecular (por sus siglas en inglés: Size-Exclusion Chromatography) |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés: sodium dodecyl sulfate) |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida (por sus siglas en inglés: polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia de SDS |
| PsAMADH2 | Aminoaldehído deshidrogenasa 2 de <i>Pisum sativum</i> |
| SmGANP | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante dependiente de NADP ⁺ de <i>Streptococcus mutans</i> |
| SoBADH | Betaína aldehído deshidrogenasa de <i>Spinacia oleracea</i> |
| T_m | Temperatura de fusión |
| TNB ⁻ | Anión 5-tio-2-nitro-benzoato |

| | |
|-------------------|--------------------------------|
| TNB ²⁻ | Dianión 5-tio-2-nitro-benzoato |
| V_{max} | Velocidad máxima de una enzima |

I. Resumen

La enzima betaína aldehído deshidrogenasa del patógeno humano *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) cataliza la oxidación irreversible de betaína aldehído a glicina betaína, un osmoprotector muy eficiente, con la concomitante reducción de NAD^+ o NADP^+ . En *P. aeruginosa* esta reacción participa en el catabolismo de colina y probablemente como defensa contra los estreses osmótico y oxidativo, a los que la bacteria se encuentra expuesta cuando infecta tejidos humanos. Dado que la colina y sus precursores son abundantes en los tejidos infectados, la PaBADH es un blanco potencial de fármacos porque su inhibición llevaría a un aumento en los niveles de betaína aldehído, altamente tóxica, dentro de las células bacterianas. En este trabajo probamos al disulfiram (DSF) y cinco de sus metabolitos—el dietilditiocarbamato (DDC), el *S*-metil-*N,N*-dietilditiocarbamoil sulfóxido (MeDDTC-SO), la *S*-metil-*N,N*-dietilditiocarbamoil sulfona (MeDDTC-SO₂), el *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamoil sulfóxido (MeDTC-SO) y la *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamoil sulfona (MeDTC-SO₂)—como inhibidores *in vitro* e *in situ* de la PaBADH así como del crecimiento de *P. aeruginosa*. *In vitro*, su orden de potencia como inhibidores de la PaBADH fue: MeDDTC-SO₂>DSF>MeDTC-SO₂>MeDDTC-SO>MeDTC-SO. El DDC no tuvo efecto sobre la actividad de la enzima. La inactivación por DSF pudo revertirse por DTT, pero no así la inactivación producida por los metabolitos del DSF. La presencia de la coenzima en el medio de inactivación no evitó la modificación de la proteína por ninguno de estos reactivos. También estudiamos el efecto que sobre la estructura de la PaBADH tenía su modificación *in vitro* por estos compuestos. Para ello se usó la cromatografía de filtración en gel, la dispersión de luz, la fluorescencia intrínseca de la proteína y la extrínseca del ANS unido a ella, así como el dicroísmo circular en la región lejana del espectro UV. La modificación de la enzima a 37 °C con DSF produjo la agregación irreversible de ésta, mientras que la modificación por los metabolitos del DSF no afectó significativamente la estructura cuaternaria, terciaria o secundaria de la proteína. Estos diferentes efectos del DSF y sus metabolitos sobre la estabilidad de la PaBADH están relacionadas con la diferente modificación del residuo de

cisteína catalítica que producen: los metabolitos del DSF forman aductos de cisteinil-S-metil-*N,N*-dietil-(di)tiocarbamoilo que son menos voluminosos que el disulfuro mixto formado por el DSF. Los Modelos del disulfuro mixto o de los aductos de cisteín-carbamoilo en el sitio activo de la PaBADH mostraron que mientras los últimos caben en este sitio el disulfuro produce un choque estérico con el W161, el cual, si se mueve para evitar el choque, empuja a la N465, un residuo situado en la interfaz entre monómeros. De esta forma la modificación por DSF desestabiliza la estructura cuaternaria de la enzima. La modificación química con DSF o sus metabolitos no afectó significativamente la termoestabilidad de la enzima, con la excepción de la modificación con MeDTC-SO₂ que produjo un incremento en la T_m aparente de desplegamiento térmico de 11 °C.

De los metabolitos del DSF, la MeDTC-SO₂ y el MeDDTC-SO produjeron una significativa inactivación de la PaBADH *in situ* y detuvieron el crecimiento de *P. aeruginosa* en medios de crecimiento que contenían colina, la cual es necesaria para inducir la expresión de la PaBADH. No se observó ninguna inhibición del crecimiento bacteriano por estos reactivos en un medio carente de colina, lo que indica que la PaBADH es su principal blanco. Las cinéticas de inactivación de la enzima *in vitro* e *in situ* por estos dos compuestos fueron muy similares, mostrando que no hay restricción en el transporte de éstos al interior de las células de *P. aeruginosa*. A pesar de ser buenos inactivadores de la PaBADH *in vitro*, la MeDDTC-SO₂ y el DSF no tuvieron efecto inhibitorio alguno *in situ*, probablemente debido a su alta reactividad hacia tioles no esenciales, lo cual causa su agotamiento en el interior de la célula. El crecimiento bacteriano tampoco se afectó cuando las células se crecieron en un medio con glucosa más colina, a pesar de que la PaBADH estaba expresada. Pero sí se inhibió cuando a este medio se le añadió una alta concentración de NaCl, lo que por sí mismo enlenteció el crecimiento. Por lo tanto, para que estos dos metabolitos del DSF inhiban el crecimiento de *P. aeruginosa* se requiere que además de la presencia de colina exista una velocidad de crecimiento baja, lo que posiblemente permita la acumulación de la betaína aldehído en el interior de las células bacterianas. Este hallazgo sugiere que la detención del crecimiento se debe a la acumulación intracelular de la betaína aldehído hasta niveles tóxicos. Es importante señalar que estas condiciones, es decir, la presencia de colina o de sus precursores así como una alta osmolaridad, son las que prevalecen en los sitios que la

bacteria infecta. En conclusión, los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de que la PaBADH es un prometedor blanco para tratar las infecciones por *P. aeruginosa*, y sugieren que algunos de los metabolitos del DSF podrían ser de ayuda en este propósito.

II. Abstract

Betaine aldehyde dehydrogenase from the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) catalyzes the irreversible, NAD(P)⁺-dependent oxidation of betaine aldehyde producing glycine betaine, an efficient osmoprotectant. *P. aeruginosa* can grow on choline as its only carbon, nitrogen and energy source. PaBADH participates in the catabolism of choline and likely in the defense against the osmotic and oxidative stresses to which the bacterium is exposed when infecting human tissues. Given that choline or choline precursors are abundant in infected tissues, PaBADH is a potential drug target because its inhibition will lead to the build up of the toxic betaine aldehyde inside bacterial cells. We tested the thiol reagents, disulfiram (DSF) and five DSF metabolites—diethyldithiocarbamic acid (DDC), *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamoyl sulfoxide (MeDDTC-SO), *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamoyl sulfone (MeDDTC-SO₂), *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamoyl sulfoxide (MeDTC-SO) and *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamoyl sulfone (MeDTC-SO₂)—as inhibitors of PaBADH and *P. aeruginosa* growth. As *in vitro* PaBADH inhibitors, their order of potency was: MeDDTC-SO₂>DSF>MeDTC-SO₂>MeDDTC-SO>MeDTC-SO. DDC did not inactivate the enzyme. *In vitro*, PaBADH enzyme inactivation by DSF at room temperature could be reverted by DTT, but inactivation by DSF metabolites could not be reverted by this reducing agent, in agreement with formation of a mixed disulfide between the catalytic Cys and DSF, and carbamoyl-cysteine adducts with the DSF metabolites. In any case, the kinetics of enzyme inactivation were not affected by NAD(P)⁺. We investigated the effect that the modification of PaBADH by these compounds has on the protein structure by means of gel filtration chromatography, light scattering, intrinsic protein fluorescence, extrinsic 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid fluorescence, as well as circular dichroism in the far-UV region. At 37 °C, the chemical modification of PaBADH by DSF generated irreversible and visible protein aggregates, while modification with the DSF metabolites did not significantly affect the quaternary, tertiary and secondary structure of the enzyme. The different structural effects of DSF and its metabolites are most likely related to the different modification of the catalytic cysteine residue produced by these compounds:

DSF forms a bulky mixed disulfide whereas DSF metabolites form smaller cysteinyl-*S*-methyl-*N,N*-diethyl(di)tiocarbamoyl adducts. Molecular models of the mixed disulfide or the carbamoyl-cysteine adducts showed that the carbamoyl-cysteine adduct fit in the PaBADH active site but that the mixed disulfide sterically clashes with the side-chain of W161, which if displaced to avoid this clash would push N465, a residue that belongs to a loop located at the interface between monomers. The modification by DSF can in this way destabilize the quaternary structure of the enzyme. Modification by DSF and its metabolites did not significantly affect PaBADH thermostability, with the exception of MeDTC-SO₂, which increased the apparent T_m of the thermal transition of the enzyme by 15 °C.

Of the DSF metabolites, MeDTC-SO₂ and MeDDTC-SO produced significant *in situ* PaBADH inactivation and arrested *P. aeruginosa* growth in choline containing media, in which the expression of PaBADH is induced. They had no effect in media lacking choline, indicating that PaBADH is their main intracellular target. The *in vitro* and *in situ* kinetics of enzyme inactivation by these two compounds were very similar, indicating no restriction on their uptake by the cells. In spite of their high *in vitro* inhibitory potency against PaBADH, MeDDTC-SO₂ and DSF had no inhibitory effects *in situ*, probably because their high reactivity towards intracellular non-essential thiols causes their depletion. The bacterial growth was not affected when bacteria were grown in a glucose plus choline containing medium, in spite of PaBADH being expressed at a significant level. However, bacterial growth was inhibited when a high NaCl concentration was added to this medium. Since the presence of salt decreases the rate of growth, this finding suggest that growth arrest is due to the intracellular accumulation of betaine aldehyde up to toxic levels. It is important to note that these conditions, i.e., the presence of choline or its precursors as well as a high osmolarity, are prevalent in the sites that the bacteria infect. In conclusion, the results of this work support the hypothesis of this work: that PaBADH is a promising target to treat *P. aeruginosa* infections and that some DSF metabolites might be of help in this aim.

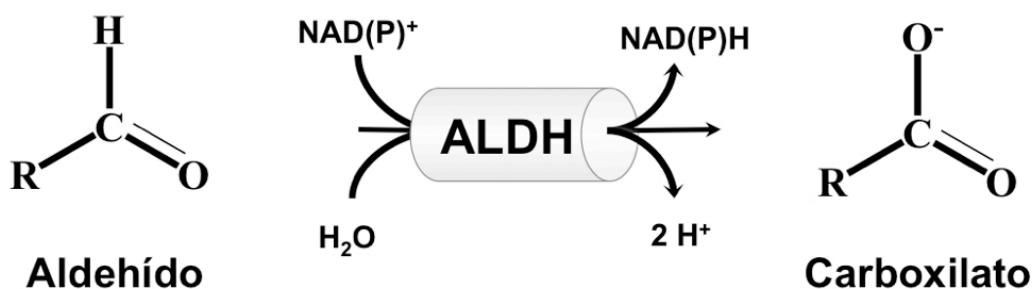
III.1. Aldehído deshidrogenasas

III.1.1. Funciones fisiológicas y reacción catalizada por las ALDHs

Los aldehídos en los organismos pueden tener procedencia exógena, al adquirirlos del medio ambiente o durante la biotransformación de diversas drogas (Marusic *et al.*, 1973), o endógena al ser producidos como intermediarios durante el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, lípidos, aminas biogénicas, vitaminas y esteroides (Vasiliou y Nebert, 2005). También se generan en las respuestas metabólicas a estreses ambientales como salinidad, deshidratación, frío o calor (Bartels, 2001). Son compuestos electrofílicos, altamente reactivos frente a tioles y grupos amino. Pocos de ellos son benéficos o terapéuticos, como el retinaldehído (retinal), cuyas propiedades de absorción de la luz son indispensables para la visión (Duester, 1991). La mayoría de ellos son citotóxicos, genotóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos, aun a muy bajas concentraciones (Lindahl, 1992; Vasiliou y Nebert, 2005). Una forma de eliminar sus efectos nocivos es su biotransformación en sus correspondientes ácidos carboxílicos en una reacción catalizada por las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) presentes en todos los organismos a lo largo de toda la escala filogenética, lo que muestra su gran relevancia fisiológica. Además de la desintoxicación de aldehídos, estas enzimas poseen importantes funciones fisiológicas, como por ejemplo, participar en la respuesta a un estrés osmótico (caso de las betaína aldehído deshidrogenasas, BADHs). Algunas, incluso desempeñan funciones no enzimáticas, como es el caso de algunas ALDHs sin actividad enzimática que juegan un importante papel de protección en la córnea y el cristalino (Vasiliou y Nebert, 2005).

Las ALDHs son enzimas óxido-reductasas (EC 1.2.1) que catalizan la conversión irreversible de los aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos utilizando al NAD^+ o NADP^+ como cofactor (Jakoby, 1963; Figura 1), aunque la mayoría de las caracterizadas hasta el momento prefieren usar NAD^+ (Yoshida *et al.*, 1998). Las ALDHs pueden utilizar una gran variedad de sustratos, tales como aldehídos alifáticos

(lineales y ramificados) o aromáticos, o bien aldehídos funcionarizados en la posición α al carbonilo como el malondialdehído.



Esquema 1. Reacción general de oxidación de aldehídos catalizada por las ALDHs. El grupo R puede ser una cadena alifática o aromática, neutra o con carga.

III.1.2. Mecanismo de reacción de las ALDHs

El mecanismo químico propuesto para la reacción catalizada por las ALDHs hidrolíticas consiste en una catálisis covalente y ácido-básica que consta de los siguientes pasos (Figura 1):

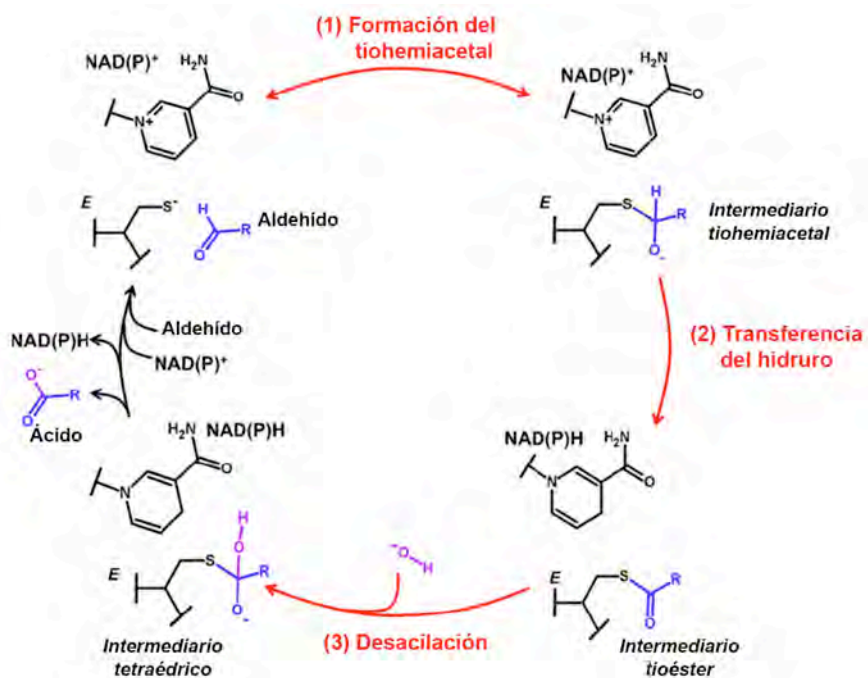


Figura 1. Mecanismo químico mínimo de la reacción de deshidrogenación catalizada por las ALDHs hidrolíticas. Adaptado de Muñoz-Clares *et al.*, 2011.

1) *Formación de tiohemiacetal*: Una vez que se han unido tanto la coenzima como el sustrato al sitio activo, el tiolato de la cisteína catalítica realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono del carbonilo para formar un intermediario tiohemiacetal tetraédrico. El oxianión formado en este paso es estabilizado mediante dos puentes de hidrógeno que recibe de la asparragina catalítica y del nitrógeno del grupo amido de la cadena principal de la cisteína catalítica.

2) *Transferencia del hidruro*: Cuando el par de electrones del tiohemiacetal desprotonado regresa al carbono aldehídico se regenera la hibridación sp^2 y se propicia la transferencia del hidruro desde el aldehído al nucleótido (NAD^+ o $NADP^+$) para formar el intermediario tioéster y el nucleótido reducido.

3) *Desacilación*: La hidrólisis del tioéster por un ión hidroxilo, resultante de la activación de una molécula de agua (desprotonación) por el glutámico catalítico, libera el grupo tiol y el producto ácido de la reacción.

4) *Liberación de los productos*: Por último, los productos salen del sitio activo de la enzima en forma ordenada, primero el ácido y después el nucleótido reducido, regenerándose la enzima libre.

III.1.3. Clasificación de las ALDHs

Las ALDHs se clasificaron inicialmente atendiendo a la naturaleza de la molécula que genera el nucleófilo (A^-) que ataca al intermediario tioéster de la reacción que catalizan (Figura 1). La enzima se clasificó como de tipo I si A^- es un ión hidroxilo (ALDHs hidrolíticas), de tipo II si A^- es un fosfato, arsenato o tiolato y de tipo III cuando la ruptura del enlace tioéster resulta de la combinación de las dos clases anteriores (Jakoby, 1963). Hoy en día se sabe que forman parte de la superfamilia de las ALDHs, es decir proteínas que comparten el mismo plegamiento, sólo aquellas enzimas que en su mecanismo químico tienen un paso de hidrólisis o de tiólisis del tioéster (Vasiliou *et al.*, 1999).

Basándose en su localización celular, las ALDHs citosólicas de animales se han clasificado como de clase I (ALDH1), las mitocondriales de clase II (ALDH2) y las

III.1 Aldehído deshidrogenasas

aldehído deshidrogenasas (familias de ALDHs numeradas) o a la base de datos Swiss-Prot (familias de ALDHs no numeradas). Las líneas punteadas indican los límites de las familias de proteínas reportadas en las bases de datos públicas. Los nombres completos de las familias de proteínas indicadas es como sigue: **ALDH9**, betaína aldehído deshidrogenasas de animales; **HMSAD**, hidroximuconato semialdehído deshidrogenasas; **ALDH16**, ALDHs de levaduras de función desconocida; **ALDH1**, ALDHs mitocondrial y citosólica de hongos y animales (las de animales poseen también actividad de retinal deshidrogenasa); **ALDH2**, ALDHs mitocondrial de animales y plantas; **ALDH1L (FTHFD)**, formiltetrahydrofolato deshidrogenasas de animales; **ADH20 (ADHE)**, bifuncional alcohol/aldehído deshidrogenasas de protozoos y bacterias; **ALDH4**, pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasas; **ASTD**, succinil glutamato semialdehído deshidrogenasas; **ALDH7**, antiquitinas de animales y plantas; **ALDH6 (MMSA)**, metilmalonato semialdehído deshidrogenasas; **ALDH11**, NADP⁺-dependientes no fosforilantes gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas; **ALDH3**, ALDHs inducibles por dioxina de animales; **ALDH14**, ALDHs de levaduras de función desconocida; **ALDH13**, ALDHs no caracterizadas de protozoos; **ALDH15**, ALDHs de levaduras de función desconocida; **ALDH5 (SSDH)**, succinato semialdehído deshidrogenasas de animales y hongos; **SNDH**, sorbosona deshidrogenasas de α -proteobacterias; **ABALDH**, γ -aminobutiraldehído deshidrogenasas; **BADH**, beta betaína aldehído deshidrogenasas de bacterias; **ALDH10**, betaína aldehído deshidrogenasas de plantas. * = Los miembros de estas familias presentan actividad de BADH. Tomado de Julián-Sánchez *et al.* (2007).

III.1.4. Estructura de las ALDHs

En 1949 se publicó por primera vez la detección de la actividad y la purificación de una ALDH a partir del hígado de bovino (Racker, 1949). En 1967 se logró la purificación a homogeneidad de una ALDH de *Saccharomyces cerevisiae* (Steinman y Jakoby, 1967), pero no fue sino hasta 1984 que se concluyó la primera secuenciación de una ALDH, la ALDH1 de hígado de humano (Hempel *et al.*, 1984). En septiembre de 2011, el número de secuencias de genes de ALDHs disponibles en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) es de 4712, de las cuales 323 corresponden a bacterias y el resto a organismos eucariontes.

En 1997 se publicaron las primeras estructuras tridimensionales de ALDHs: la de la enzima tetramérica ALDH2 bovina (Steinmetz *et al.*, 1997) y la de la enzima dimérica ALDH3 de rata (Liu *et al.*, 1997). Hasta la fecha se han depositado en el Protein Data Bank (PDB) 36 estructuras tridimensionales de diferentes ALDHs (www.rcsb.org). En

todas éstas se encontró un plegamiento similar, sin importar su estado de oligomerización (Figura 3).



Figura 3. Alineamiento estructural tridimensional de la subunidad A de distintas ALDHs. El alineamiento múltiple de la subunidad A de algunas ALDHs, como ejemplo del plegamiento de estas enzimas, muestra como todas presentan el mismo tipo de plegamiento sin importar su estado de oligomerización. Las enzimas utilizadas fueron las siguientes: la HsALDH2 (código de acceso pdb 3n80), HsSSADH (código de acceso pdb 2w8o), RnALDH3 (código de acceso pdb 1ad3), GcBADH (código de acceso pdb 1a4s), PsAMADH2 (código de acceso pdb 3iwj), SoBADH (código de acceso pdb 4a0m), SmGANP (código de acceso pdb 2euh) y la PaBADH (código de acceso pdb 2wme). El alineamiento de las cadenas polipeptídicas de las proteínas se realizó por superposición de éstas con el programa de cómputo PyMol (DeLano, 2002).

La unidad monomérica de las ALDHs posee tres dominios: un dominio de unión a la coenzima en la región *N*-terminal, un dominio catalítico y un dominio de oligomerización mediante el cual se forma la unidad dimérica (Figura 4A). Este último

dominio es una extensión del dominio de unión a la coenzima y de ahí la importancia del NAD(P)^+ en el mantenimiento de la estructura cuaternaria encontrada en la BADH de *Pseudomonas aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 1999). Los dos primeros dominios presentan un plegamiento tipo Rossmann modificado debido a que carecen del último motivo $\alpha\beta$ (Rossmann *et al.*, 1974). En las secuencias codificantes para las BADHs se ha encontrado que los residuos de los aminoácidos implicados en la actividad catalítica, la unión de la coenzima y la región de unión al sustrato están altamente conservados.

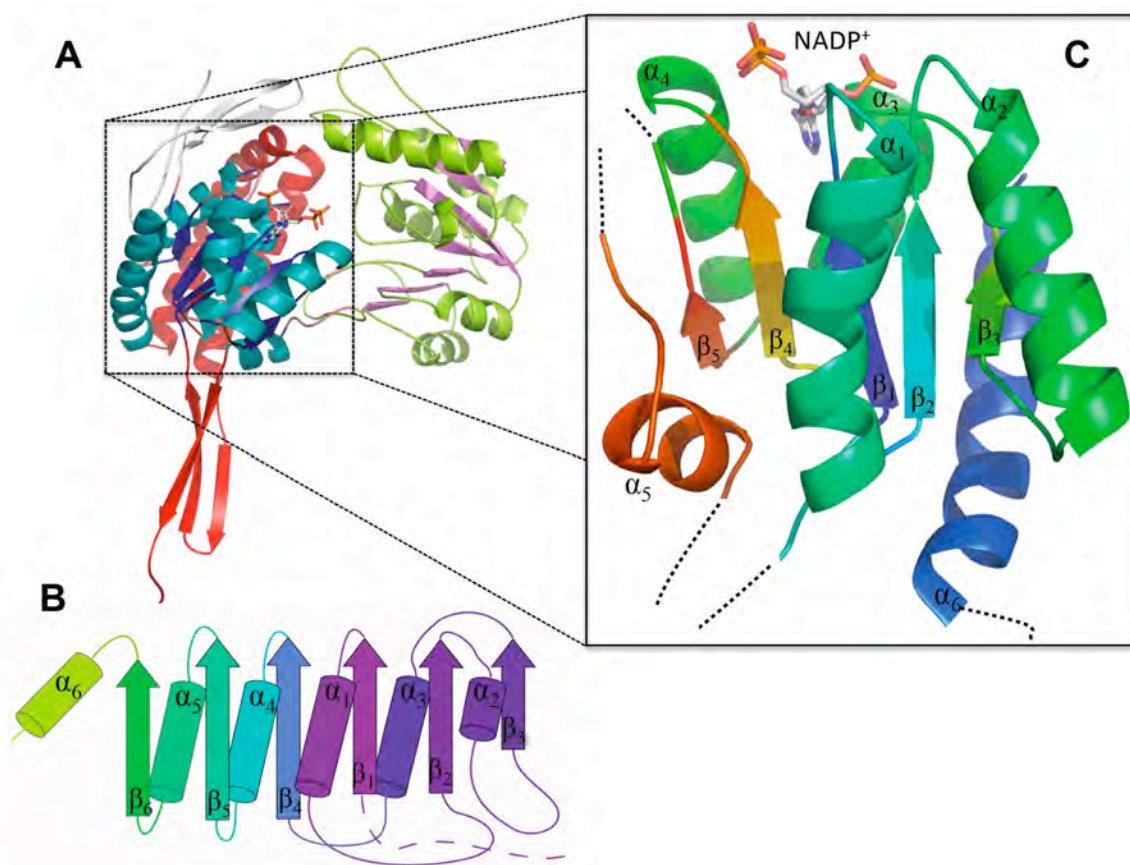
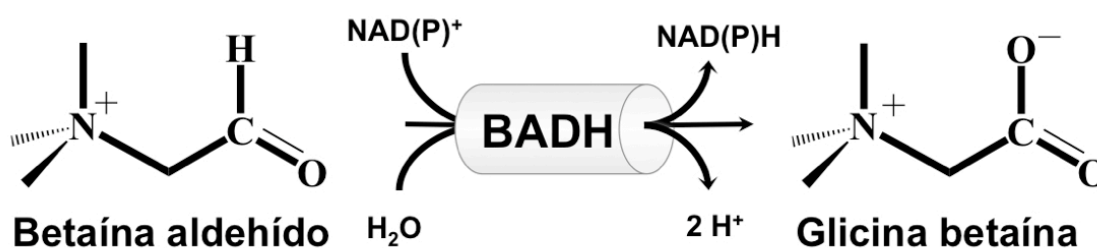


Figura 4. Estructura tridimensional de la subunidad A de la PaBADH. (A) Monómero coloreado según sus dominios: en azul, el dominio de unión a la coenzima; en amarillo, el dominio catalítico y en rojo, el dominio de oligomerización. (B) Plegamiento Rossmann en el que se muestran los motivos de hebra(β)-asa-hélice(α). (C) Tanto el dominio catalítico como el de unión a la coenzima presentan un plegamiento tipo Rossmann en el cual falta ya sea una hebra-β o un α-hélice.

III.2. Betaína aldehído deshidrogenasas

III.2.1. Generalidades de las BADHs

La enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, betaína aldehído NAD(P)⁺ oxidoreductasa, E.C. 1.2.1.8) pertenece a la superfamilia de las aldehído deshidrogenasas y cataliza la oxidación irreversible de la betaína aldehído con la simultánea reducción del NAD(P)⁺ (Rothschild y Guzmán-Barrón, 1954) de acuerdo a la siguiente reacción:



Esquema 2. Reacción de oxidación de la betaína aldehído catalizada por la BADH.

Se han purificado BADHs de distintos organismos, ya sea eucarióticos o procarióticos, como la de *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976; Velasco-García *et al.*, 1999), de *Escherichia coli* (Falkenberg y Strøm, 1990), de *Xanthomonas translucens* (Mori *et al.*, 1992), de *Bacillus subtilis* (Boch *et al.*, 1997), de *Arthrobacter globiformis* (Mori *et al.*, 2002), del hongo *Cylindrocarpon didymum* (Mori *et al.*, 1980), de hoja de espinaca (Arakawa *et al.*, 1987; Weretilnyk y Hanson, 1989), de hoja de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994), de plántulas de avena (Livingstone *et al.*, 2003), de *Pisum sativum* (Tylichová *et al.*, 2009), de corazón de cangrejo (Dragolovich y Pierce, 1994), de riñón de cerdo (Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998), de hígado de rata (Pietruszko y Chern, 2001), de hígado de bacalao (Hjelmqvist *et al.*, 2003) y de hígado de humano (Chern y Pietruszko, 1995).

Algunas BADHs se han logrado expresar como proteína recombinante en células de *E. coli* transformadas con un vector de expresión conteniendo el gen correspondiente. Las siguientes enzimas son algunas de las que se han obtenido de esta forma: la de *B.*

subtilis (Boch *et al.*, 1997), la de *Spinacia oleracea* (Incharoensakdi *et al.*, 2000), la de *Avicennia marina* (Hibino *et al.*, 2001), la de *P. aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 2006a), la de *Zoysia tenuifolia* (Oishi y Ebina, 2005), la de *Hordeum vulgare* (Fujiwara *et al.*, 2008), dos isoenzimas de *Pisum sativum* (Tylichová *et al.*, 2009) y de *Oryza sativa* (Mitsuya *et al.*, 2009), la de *Jatropha curcas* (Zhang *et al.*, 2009), entre otras.

Las BADHs tienen localizaciones subcelulares, especificidades por sustratos, funciones fisiológicas, propiedades estructurales y propiedades cinéticas diferentes. Existen revisiones recientes sobre esta enzima (Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto, 2008; Fitzgerald *et al.*, 2009; Muñoz-Clares *et al.*, 2010) que tratan diferentes aspectos. A continuación se describen algunos de los más relevantes para este trabajo.

III.2.2. Localización intracelular

En animales la actividad BADH se encuentra principalmente en el citosol (Rothschild y Guzmán-Barrón, 1954; Ambroziak y Pietruszko, 1991) y en menor proporción en la mitocondria (Pietruszko y Chern, 2001), mientras que en plantas esta actividad se localiza en el estroma del cloroplasto o en los peroxisomas, con una pequeña cantidad de actividad en el citosol (Weigel *et al.*, 1986; Nakamura *et al.*, 1997; 2001; Shirasawa *et al.*, 2006). Hasta el momento todas las BADHs purificadas son solubles y no se ha encontrado ninguna proteína asociada a membranas.

III.2.3. Relaciones filogenéticas

Proteínas con actividad de BADH y secuencias ortólogas se han encontrado ampliamente distribuidas en la escala filogenética, pero hasta la fecha no se han encontrado secuencias BADH ni en cianobacterias ni en arqueas. En un estudio en el que se hizo un alineamiento de todas las secuencias depositadas en los bancos de datos hasta esa fecha, se encontró que proteínas con actividad BADH se encuentran distribuidas en cinco familias: ALDH9 formada por proteínas de proteobacterias, hongos y animales; ALDH10 formada por proteínas de plantas y algunas de hongos y bacterias, ALDH23, ALDH25 y ALDH28 formadas por proteínas bacterianas (Julián-Sánchez *et al.*, 2007; Figura 2). Los

miembros de cada una de estas familias poseen el mismo estado de oligomerización: las BADHs de la familia ALDH9, ALDH23 y ALDH28 son tetraméricas, mientras que las de la familia ALDH10 y ALDH25 son diméricas.

III.2.4. Especificidad y función biológica

Además de betaína aldehído, la mayor parte de las BADHs pueden usar otros ω -aminoaldehídos como sustrato: el γ -amino-butiraldehído (Kuryś *et al.*, 1989), el 4-*N*-trimetil-amino-butiraldehído (Chern y Pietruszko, 1995) y el 3-amino-propionaldehído (Trossat *et al.*, 1997; Vojtěchová *et al.*, 1997). Las ALDH10 pueden también usar el 3-dimetilsulfonio-propionaldehído (Trossat *et al.*, 1997; Vojtěchová *et al.*, 1997). En lo que respecta a la coenzima, se ha encontrado que la gran mayoría de las BADHs estudiadas muestra preferencia por el NAD⁺, con la excepción de las ALDH9 de *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976; Velasco-García *et al.*, 2000), *Xanthomonas translucens* (Mori *et al.*, 1992) y *Arthrobacter globiformis* (Mori *et al.*, 2002) que pueden usar NAD⁺ o NADP⁺ casi indistintamente. Es interesante que estas últimas bacterias que poseen una BADH anfibólica, es decir, que pueden producir NADH para la generación de energía o NADPH para las biosíntesis y defensa frente a estrés oxidativo, están presentes en organismos capaces de crecer en colina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Kortstee, 1970).

El hecho de que las BADHs pueden usar una amplia variedad de sustratos sugiere que están involucradas en distintas funciones biológicas. En animales, la ALDH9 participa en la síntesis de glicina betaína, que sirve como osmoprotector de células de riñón (Grunewald y Eckstein, 1995) así como de donador de metilos en la biosíntesis de metionina (Muntz, 1950). Además participa en el catabolismo de poliaminas (Ambroziak y Pietruszko, 1991), en la producción del ácido γ -amino-butírico en las glándulas suprarrenales (Chern y Pietruszko, 1995) y en la síntesis de carnitina (Vaz *et al.*, 2000).

En plantas, las ALDH10 de cloroplasto están involucradas en la síntesis de glicina betaína (Rhodes y Hanson, 1993) y de dimetilsulfonio-propionato (Trossat *et al.*, 1997; Vojtěchová *et al.*, 1997), que son eficientes osmoprotectores. Por ello, estas enzimas se

involucran en la respuesta al estrés osmótico provocado por sequía, suelos hipersalinos o frío. Las ALDH10 peroxisomales pudieran participar en el catabolismo de poliaminas y/o en la síntesis de carnitina (Tylichová *et al.*, 2008), pero estas posibles funciones aún no han sido probadas.

En bacterias, las ALDH9 y ALDH25 están implicadas en la síntesis de glicina betaína, como parte de la respuesta de estos organismos al estrés osmótico (Falkenberg y Strøm, 1990; Boch *et al.*, 1997), o como parte del catabolismo de colina (Nagasawa *et al.*, 1976; Smith *et al.*, 1988; Meskys *et al.*, 2001; Velasco-García *et al.*, 2006a; Wargo *et al.*, 2008) en bacterias capaces de crecer en colina como su única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Kortstee, 1970). Las ALDH23 y ALDH28 son ω -aminoaldehído deshidrogenasas que participan en el catabolismo de arginina y poliaminas (Julián-Sánchez, A., Riveros-Rosas, H., Martínez-Castilla, L. y Muñoz-Clares, R.A., sometido).

Por lo anteriormente expuesto, queda claro que la función fisiológica que juegan las BADHs depende del organismo y/o el tejido en que se encuentren, de su localización intracelular y de su especificidad tanto por el aldehído como por la coenzima. Para conocer inequívocamente el papel fisiológico de las BADHs de microorganismos se ha estudiado el contexto genómico de los genes de BADH (Julián-Sánchez, A., Riveros-Rosas, H., Martínez-Castilla, L. y Muñoz-Clares, R.A., sometido). Pero para comprender mejor su función fisiológica en animales y plantas será necesario hacer caracterizaciones fenotípicas con los apropiados organismos *knock-out* y, en el caso de aquellas que sean inducibles, conocer los compuestos o condiciones que inducen su expresión.

III.2.5. Estructura tridimensional

Como ocurre con el resto de las ALDHs, todas las BADHs caracterizadas hasta la fecha son tetraméricas o diméricas (Figura 5). Hasta el momento, se conoce la estructura tridimensional de tres BADHs tetraméricas: la de hígado de bacalao, tanto en su forma apo como en complejo con NAD^+ (Johansson *et al.*, 1998, códigos de acceso pdb 1a4s y 1bpw, respectivamente), la de *P. aeruginosa* en complejo con NADP^+ (González-Segura *et al.*, 2009a, código de acceso pdb 2wme) y con NADPH (Díaz-Sánchez *et al.*, 2011; código de acceso pdb 2wox) y la de *Staphylococcus aureus* en su forma apo y en

III.2. Betaína aldehído deshidrogenasas

complejo con NAD^+ (códigos de acceso pdb 3ed6 y 3fg0, respectivamente). También se conocen las estructuras tridimensionales de tres ALDH10 de plantas: dos isoenzimas de *Pisum sativum* (Tylichová *et al.*, 2009, códigos de acceso pdb 3iwj y 3iwk) y la de la enzima de espinaca (Díaz-Sánchez A.G., González-Segura L., Mújica-Jiménez C., Rudiño-Piñera E., Montiel C., Martínez-Castilla, L. y Muñoz-Clares, R.A., sometido, código de acceso pdb 4a0m). Estas son enzimas diméricas cuyas subunidades poseen el mismo plegamiento que el resto de las ALDHs de estructura tridimensional conocida.

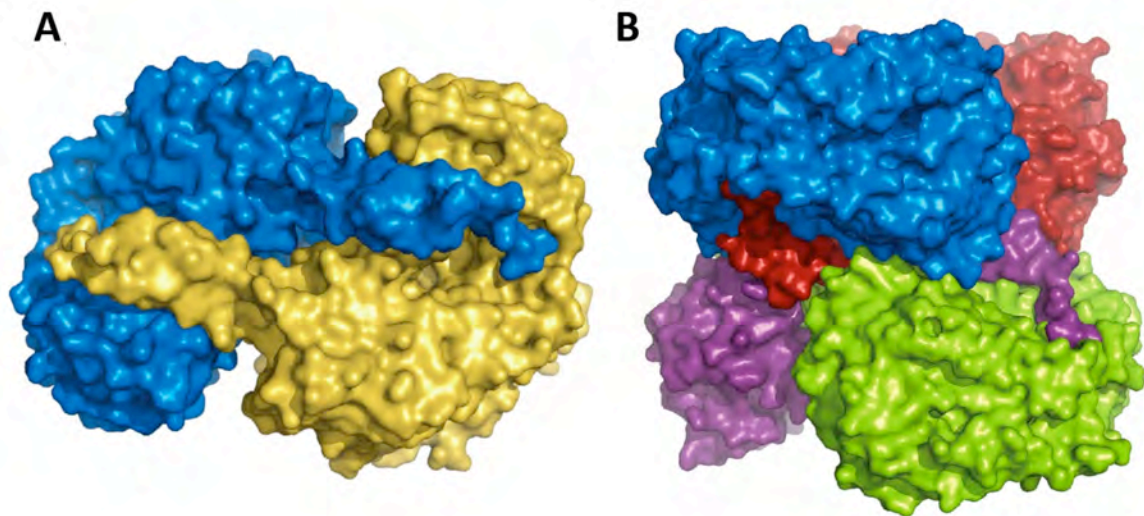


Figura 5. Estructura tridimensional de dos BADHs con diferente estado de oligomerización. (A) Dímero de la SoBADH (código de acceso pdb 4s0m) y (B) tetrámero de la GcBADH (código de acceso pdb 1a4s). Las estructuras se muestran en superficie y están coloreadas por subunidades.

III.3. *Pseudomonas aeruginosa*

III.3.1. *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas*, de la familia *Pseudomonadaceae* perteneciente a las γ - proteobacterias (Woese, 1987; Pace, 1997), está formado por una gran variedad de especies que como organismos de vida libre habitan en el suelo, en las aguas estancadas, sobre el material orgánico en descomposición (en cuya degradación juegan un importante papel) o sobre las superficies de las plantas. También pueden vivir como organismos comensales formando parte de la flora intestinal de varias especies animales y en algunas ocasiones sobre sus superficies (Hardalo y Edberg, 1997). Algunas especies de *Pseudomonas* son conocidas por ser patógenos de plantas, otras pueden producir infecciones en animales y sólo unas pocas especies, como por ejemplo *P. aeruginosa*, son patógenos humanos (Bodey *et al.*, 1983).

Los miembros del género *Pseudomonas* son bacilos Gram-negativos, miden entre 0.5 y 0.8 μm por 1.5 a 5.0 μm , son aerobios o anaerobios facultativos, no forman esporas y la mayoría son móviles gracias a un único flagelo polar (monótricos) o a un mechón de dos o tres flagelos polares (lofótricos). Casi todas las especies poseen fimbrias y pilis y algunas forman una delgada microcápsula compuesta por polisacáridos.

III.3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

De todas las especies del género *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* es el epítome de un patógeno oportunista de humanos ya que la bacteria casi nunca infecta tejidos de individuos sanos, sino que aprovecha el deterioro de sus defensas para iniciar una infección. Causa infecciones en el tracto urinario (Brantsaeter y Natas, 1994; Puzova, *et al.*, 1994), en el sistema respiratorio (de Bentzmann *et al.*, 1996), en la piel (Saint-Martin y Lasalle, 1950), en la córnea (Moriyama *et al.*, 1965; Marquart *et al.*, 2005), en los huesos y articulaciones (Miskew *et al.*, 1983), en el sistema gastrointestinal (Hayashi *et al.*, 2004) así como una amplia variedad de infecciones sistémicas, particularmente en pacientes con quemaduras extensas (Madigan *et al.*, 1997), individuos enfermos de cáncer en quimioterapia (Bergen y Shelhamer, 1996), enfermos de VIH-SIDA (Asboe *et*

al., 1998) y en un grupo poblacional, especialmente vulnerable, formado por los enfermos de fibrosis quística, en los cuales es la principal causa de mortalidad (Pier, 1985; Govan y Deretic, 1996).

Las infecciones por *P. aeruginosa* son un serio problema en pacientes hospitalizados con cáncer, quemaduras y fibrosis quística. La tasa de mortalidad en estos pacientes es del 50%. De acuerdo con el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés: Centers for Disease Control and Prevention), *P. aeruginosa* es un patógeno que genera una incidencia en las infecciones nosocomiales en hospitales de EE UU con un promedio de alrededor del 0.4%, siendo el agente etiológico en 21% de las neumonías, 10% en infecciones del tracto urinario, 8% en infecciones postquirúrgicas y 3% en bacteriemias. En las unidades de cuidado intensivo es la segunda causa de infección nosocomial, causando 30% de neumonías, 19% de infecciones urinarias y 10% de bacteriemias (Fergie *et al.*, 1994). En México se reporta dentro de los cinco primeros lugares en la etiología de infecciones nosocomiales de acuerdo a un reporte del 2004 de la Dirección General de Salud Pública, y a nivel mundial es el cuarto patógeno nosocomial más comúnmente aislado causando alrededor del 10% de todas las infecciones intrahospitalarias (Jones *et al.*, 2002).

III.3.3. Factores de patogenicidad de *P. aeruginosa*

Como ya se mencionó, *P. aeruginosa* puede instalarse en cualquier órgano o tejido. A partir de una infección localizada en alguno de estos tejidos puede diseminarse por el torrente sanguíneo, producir septicemias e instalarse en otros tejidos dando lugar a procesos supurativos. Esta bacteria cuenta con una serie de factores de virulencia que le permiten colonizar dichos tejidos (Doring *et al.*, 1987; Rahme *et al.*, 1997). Según su efecto, estos factores de virulencia se pueden agrupar en tres tipos: los factores de colonización, las endotoxinas de pared celular y las sustancias extracelulares (Liu, 1974).

Los factores de colonización conocidos son las fimbrias, que poseen todas las cepas de *P. aeruginosa* (Tennent y Mattick, 1994; Mattick *et al.*, 1996), y una capa de lipopolisacárido que se encuentra en la superficie de la pared (Goldberg *et al.*, 1995; Al-

Tahhan *et al.*, 2000). Ambos contribuyen al anclaje de la bacteria en las células de los tejidos.

La endotoxina de pared celular es, como en otros bacilos Gram-negativos, un lipopolisacárido que causa necrosis focal en el sitio de colonización.

Las sustancias extracelulares secretadas por la bacteria incluyen a dos tipos de fosfolipasa C, un glucolípido que produce hemólisis de los eritrocitos, una elastasa, la exotoxina A y la exotoxina S. *P. aeruginosa* posee dos tipos de fosfolipasa C: una hemolítica codificada por el gen *plcH* y una no hemolítica codificada por el gen *plcN* (Ostroff y Vasil, 1987; Ostroff *et al.*, 1990). Esta enzima hidroliza a la fosfatidilcolina (uno de los principales componentes de la bicapa lipídica de las células) produciendo fosforilcolina y diacilglicerol (Esselmann y Liu, 1961). Su acción sobre la esfingomielina de la membrana de células eucariontes produce necrosis tisular (Sage y Vasil, 1997). La elastasa es una enzima proteolítica que contribuye a la degradación de las paredes alveolares (Mohr *et al.*, 1990). La exotoxina A se sintetiza como una pre-toxina que contiene dos regiones intramoleculares llamadas A y B. El procesamiento proteolítico de esta proteína genera un heterodímero cuyas subunidades A y B están unidas por puentes disulfuro. La subunidad B es responsable de la unión de la toxina con los receptores localizados en la superficie de la célula blanco (Middlebrook y Dorland, 1984) mientras que la subunidad A, el componente tóxico, posee actividad enzimática: es una proenzima que se procesa al ingresar a la célula e inhibe la síntesis de proteínas por inactivación del factor de elongación (Iglewski *et al.*, 1978; Schumann *et al.*, 1998). La exotoxina S (o exoenzima S) es una ADP-ribosil transferasa que inhibe la síntesis de proteínas de las células epiteliales con lo cual se favorece la invasión del epitelio (Iglewski *et al.*, 1978; Fleiszig *et al.*, 1997).

Otra sustancia que también se ha considerado como un factor de virulencia de la bacteria es la piocianina, que es un pigmento citotóxico cuya toxicidad presumiblemente resulta de su reducción por NAD(P)H con la subsiguiente generación de peróxido y superóxido directamente en el lugar de infección de la bacteria (Reszka *et al.*, 2004, 2006; Caldwell *et al.*, 2009). Por último, pero no menos importante, es la producción del exopolisacárido alginato, el cual es un polímero de los ácidos β -D-manurónico y α -L-gulurónico (Haug *et al.*, 1966; Wozniak *et al.*, 2003). Dependiendo de su capacidad de

producir alginato, existen dos tipos de aislados clínicos de *P. aeruginosa*: mucoides y no mucoides. En pacientes con fibrosis quística, cepas no mucoides como *P. aeruginosa* PAO1 cambian su fenotipo a mucóide y producen alginato, el cual no sólo hace a las bacterias más resistentes a los mecanismos de defensa del hospedero, sino que además las protege de los antibióticos utilizados para combatir su infección (Wood *et al.*, 2007).

III.3.4. Resistencia de *P. aeruginosa* a los antibióticos

P. aeruginosa es naturalmente resistente a muchos de los antimicrobianos de uso habitual en la práctica clínica. El mecanismo de resistencia a estos antibióticos se debe principalmente a: 1) la baja permeabilidad de la membrana externa, la cual permite el paso selectivo de sustancias al interior de la bacteria (Angus *et al.*, 1982; Yoshimura y Nikaido, 1982; Nikaido, 1989); 2) la hidrólisis de antibióticos de tipo β -lactámicos por una β -lactamasa periplásmica (Li *et al.*, 1995; Weldhagen *et al.*, 2003); 3) un conjunto de bombas de expulsión (MexAB-OprM o MexXY-OprM) que excretan quinolonas y amiglicósidos (Gotoh *et al.*, 1998; Tomás *et al.*, 2010); 4) una bomba de expulsión, MexGHI-OpmD, que le confiere resistencia a metales como el vanadio (Aendekerk *et al.*, 2002) y 5) la producción de una biopelícula formada por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que envuelve a las células bacterianas y les confiere una mayor resistencia a los antibióticos, biocidas y defensas del hospedero (De Lancey Pulcini, 2001). Se ha reportado que esta matriz contiene una mezcla de polímeros, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos. El exopolisacárido alginato ha sido considerado el mayor exopolisacárido producido por cepas mucoides de *P. aeruginosa* y el principal componente de la matriz extracelular (Nivens *et al.*, 2001). Las cepas no mucoides, aunque producen mucho menos alginato, exportan otros polisacáridos para integrarlos a la matriz extracelular (Wozniak *et al.*, 2003).

III.3.5. Metabolismo de *P. aeruginosa*

En el año 2000 se completó la secuenciación del genoma de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000). Esta cepa fue aislada de la herida de un paciente (Holloway, 1955) y es la que generalmente se usa en investigación. El tamaño del

genoma es de 6.3 millones de pares de bases, arreglados en un único cromosoma circular. Contiene más familias de genes que el genoma de *E. coli*, si bien ambos genomas presentan un arreglo transcripcional en operones parecidos. El 32% de los genes de la secuencia genómica de *P. aeruginosa* no tienen homología con las secuencias depositadas en los bancos de datos, por lo que presumiblemente se trata de genes que codifican para proteínas de función novedosa. También es de destacar que muchos de los genes de *P. aeruginosa* codifican para transportadores, lo que puede estar relacionado con su alta resistencia a antisépticos débiles y muchos de los antibióticos comúnmente utilizados en clínica (Stover *et al.*, 1999; Westbrook-Wadman *et al.*, 1999).

P. aeruginosa tiene requerimientos nutricionales muy simples y una gran versatilidad metabólica que le permite utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer y colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros organismos pueden asimilar (Hardalo y Edberg, 1997). Utiliza preferentemente algunos intermediarios del ciclo de Krebs (por ejemplo el succinato), pero también metaboliza glucosa, aunque, a diferencia de otros organismos como *E. coli*, no la descompone por la vía Embden-Meyerhof sino a través de la ruta de Entner-Doudoroff (Lessie y Phibbs, 1984; Figura 8).

III.3.6. Catabolismo de colina en *P. aeruginosa*

En los sitios de infección de *P. aeruginosa* se encuentra abundantemente la colina y sus precursores (Pesin y Candia, 1982; Wright y Clements, 1987), sustancias que la bacteria es capaz de metabolizar como única fuente de carbono, nitrógeno y energía oxidándolas hasta piruvato en una ruta catabólica cuyo segundo paso está catalizado por la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) y que por tanto tiene a glicina betaína como intermediario (Figura 6).

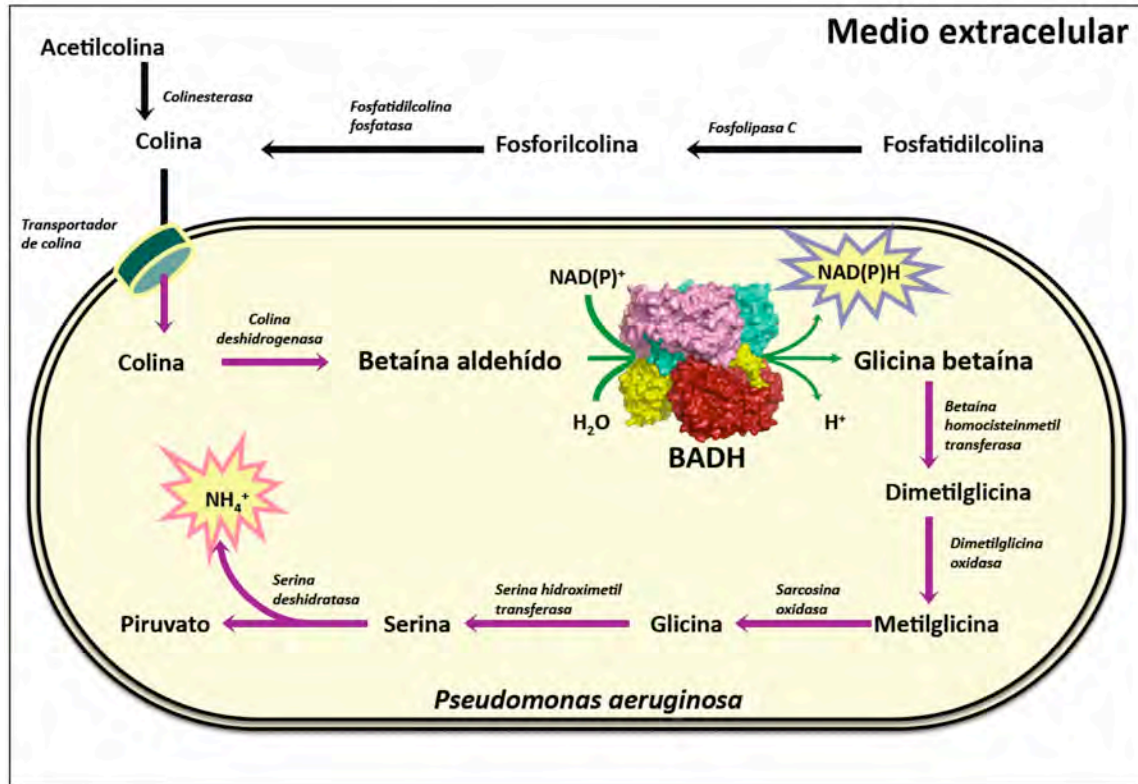


Figura 6. Catabolismo de colina y sus precursores en *P. aeruginosa*.

Cuando *P. aeruginosa* crece en presencia de colina se induce un transportador de ésta que es reprimido por succinato (Salvano *et al.*, 1989), pero la bacteria posee otro sistema transportador de colina que es constitutivo. Este otro transportador es probablemente el responsable de la toma inicial de colina cuando la bacteria se pone en presencia de este compuesto (Lucchesi *et al.*, 1998).

En el genoma de *P. aeruginosa*, los genes que codifican para la colina deshidrogenasa (CDH), la BADH y el regulador transcripcional (BetI) forman un operón *betIBA* (Velasco-García *et al.*, 2006a) similar al operón *betIBA* descrito en *E. coli* (Lamark *et al.*, 1991). Tanto el operón *betIBA* como el gen del transportador inducible de colina (*betTI*), que está cercano a este operón pero con una orientación divergente, responden a colina. En *E. coli*, en la región intergénica entre *betT* y *betIBA* se encuentran dos promotores divergentes, uno para *betIBA* y otro para *betTI* (Lamark *et al.*, 1996; Røkenes *et al.*, 1996). BetI se une al ADN de la región intergénica entre *betT* y *betIBA* y

regula la expresión de estos genes en respuesta al inductor colina (Lamark *et al.*, 1996; Røkenes *et al.*, 1996). Representa sólo un 10% del total de las proteínas BADH y CDH por lo que se cree que su síntesis está sujeta a un tipo de control postranscripcional (Røkenes *et al.*, 1996). Funciona como los reguladores de tipo procariótico MerR y LysR, los cuales se encuentran unidos a la región promotora de ADN y responden como inhibidores de la transcripción en ausencia del inductor o como activadores en presencia de su inductor (O'Halloran *et al.*, 1989; Røkenes *et al.*, 1996). Ya que BetI se une a la secuencia promotora en ausencia y en presencia del inductor colina (de hecho, la presencia de colina mejora la unión de BetI al ADN) (Røkenes *et al.*, 1996), se sugiere que en ausencia de colina BetI pudiera formar un complejo binario con el ADN de la región intergénica (BetI-ADN) cuyo estado conformacional evitaría la transcripción tanto del operón *betIBA* como del gen *betTI* y que en presencia de colina se formaría un complejo ternario (colina-BetI-ADN) cuya conformación permitiría la transcripción tanto de *betTI* como de *betIBA* (Røkenes *et al.*, 1996).

A diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, donde la BADH se induce por una alta concentración de sal y la glicina betaína (producto de la reacción catalizada por esta enzima) se usa sólo como un osmoprotector ya que no es metabolizada, en *P. aeruginosa* la expresión de la BADH sólo se induce por colina y no cuando la bacteria crece en un medio con altas concentraciones de sal (Velasco-García *et al.*, 2006a). Sin embargo, en *P. aeruginosa* una alta concentración de sal reprime la expresión de las enzimas implicadas en el catabolismo del osmoprotector glicina betaína permitiendo así su acumulación (Diab *et al.*, 2006), igual que ocurre en otras bacterias como *Rhizobium meliloti* (Smith *et al.*, 1988) y *Arthrobacter spp* (Meskys *et al.*, 2001) que también pueden usar a colina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

En *P. aeruginosa* la glucosa ejerce una represión catabólica parcial sobre la expresión de la BADH, lo que permite que cuando la bacteria se encuentra creciendo en un medio con glucosa más colina los niveles de proteína y actividad de la BADH sean casi un 50% de los presentes cuando sólo está creciendo en colina (Velasco-García *et al.*, 2006a).

El catabolismo de colina requiere que la bacteria sea capaz de degradar a la glicina betaína. Actualmente se conoce el conjunto completo de genes involucrados en el

catabolismo de colina en *P. aeruginosa*. En el 2006, Diab y colaboradores mostraron mediante un análisis proteómico que cuando *P. aeruginosa* crece en glicina betaína como única fuente de carbono, ésta induce la síntesis de la mayoría de las proteínas involucradas en su degradación. Pero, como ya se mencionó, si la bacteria crece en un medio hiperosmótico, la degradación de glicina betaína se reprime, sirviendo ésta como osmoprotector (Diab *et al.*, 2006). Estos autores también encontraron que la glicina betaína funciona como fuente de carbono y osmoprotector si la bacteria crece en un medio con glucosa. Sin embargo, si la bacteria crece en un medio con succinato, la glicina betaína actúa sólo como osmoprotector ya que el succinato reprime la síntesis de las enzimas involucradas en su catabolismo (Diab *et al.*, 2006).

III.3.7. Respuesta al estrés osmótico en *P. aeruginosa*

Una peculiaridad de *P. aeruginosa* es su capacidad de crecer en ambientes salinos porque puede almacenar osmolitos producidos intracelularmente o captados del medio externo cuando está sometida a estrés osmótico. *P. aeruginosa* sintetiza y acumula *N*-acetilglutaminilglutamina amida (NAGGN), trehalosa y ácido glutámico en ausencia de fuentes exógenas de osmoprotectores. No obstante, si en el medio extracelular están presentes osmolitos, como polioles, prolina, glicina betaína, o colina y sus precursores, *P. aeruginosa* acopia preferentemente glicina betaína. Esta acumulación hace que disminuyan los niveles de los tres osmolitos endógenos (D'souza-Ault *et al.*, 1993). Se ha reportado que 1 mM de glicina betaína en el medio de cultivo es capaz de aumentar la tolerancia al estrés osmótico en *P. aeruginosa* hasta concentraciones de 0.7 M de NaCl (D'souza-Ault *et al.*, 1993). Como ya se ha mencionado, *P. aeruginosa* es también capaz de sintetizar glicina betaína a partir de colina, una habilidad que comparte con otros muchos organismos. La glicina betaína juega por tanto un doble papel en *P. aeruginosa*: como osmoprotector y como intermediario del catabolismo de colina.

III.4. Betaína aldehído deshidrogenasa de *P. aeruginosa*

La PaBADH fue aislada por primera vez en 1976, al inducir su síntesis creciendo a la bacteria en colina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Nagasawa *et al.*, 1976). En 1999 se mejoró el protocolo de purificación, aumentando considerablemente el rendimiento (Velasco-García *et al.*, 1999). Actualmente contamos con la enzima sobre-expresada en células BL21(DE3)-pLysS (Stratagene) de *E. coli* a través del vector de expresión pCAL-BetB, que contiene el gen que codifica para la PaBADH (Velasco-García *et al.*, 2006a). Los estudios que se han realizado en nuestro grupo de trabajo sobre la enzima PaBADH nos han permitido conocer muchos detalles sobre su funcionamiento y estructura. A continuación se presentan algunos de los hallazgos relevantes de estos estudios.

III.4.1. Papel fisiológico de la BADH de *P. aeruginosa* (PaBADH)

En *P. aeruginosa*, el segundo paso de la ruta de degradación de la colina es catalizado por la PaBADH, siempre y cuando la bacteria se encuentre creciendo en un medio que contenga a este compuesto y/o a alguno de sus precursores (Lisa *et al.*, 1983; Figura 5). Gracias a la actividad de la PaBADH la bacteria no sólo puede obtener carbono, nitrógeno y energía a partir de colina o sus precursores, compuestos muy abundantes en los sitios de infección, sino que además obtiene un osmoprotector muy eficiente (glicina betaína) y equivalentes de reducción (NADPH) para el anabolismo y defensa frente al estrés oxidativo que le imponen las defensas del hospedero (Miller y Britigan, 1997). Proponemos por ello que esta enzima juega un importante papel en la fisiopatología de la bacteria y es un blanco potencial de agentes antimicrobianos. A este respecto es importante destacar que cepas de *P. aeruginosa* con el gen que codifica para la BADH mutado crecen muy lentamente en presencia de colina, aun cuando exista otra fuente de carbono en el medio de cultivo o se añada a éste glicina betaína (Sage *et al.*, 1997). Ello es probablemente debido al efecto tóxico de la betaína aldehído que se acumula en la mutante, aunque los niveles de este compuesto que se alcanzan bajo estas condiciones no

III.4. Betaína aldehído deshidrogenasa de *P. aeruginosa*

han sido determinados. La inhibición específica de la enzima llevaría también a la acumulación de betaína aldehído, un compuesto altamente tóxico (Rathinasabapathi *et al.*, 1994) que si alcanza niveles altos, podría matar a la bacteria o al menos detener su crecimiento, coadyuvando así a la acción de otros agentes antimicrobianos. Para poder seleccionar o diseñar un inhibidor que pudiera llegar a usarse como fármaco en el combate de las infecciones causadas por este importante patógeno, se requiere conocer a fondo las características cinéticas y estructurales de esta enzima.

Puesto que el primer paso del mecanismo químico de esta enzima, y en general de las ALDHs, es el ataque nucleofílico del grupo tiol del residuo de la cisteína catalítica sobre el carbono carbonílico del aldehído, en nuestro grupo de trabajo se ha probado el disulfiram, un reactivo específico de tioles, como inhibidor de la actividad de la PaBADH (Velasco-García *et al.*, 2003, 2006b). Este compuesto pudiera tener un uso en el combate de la infección por *P. aeruginosa* ya que es un fármaco actualmente aprobado y usado en la clínica para otros fines.

III.4.2. Mecanismo cinético

Se trata de un mecanismo Bi-Bi secuencial preferentemente ordenado en estado estacionario. Es decir, que la enzima libre une en primera instancia al nucleótido oxidado y el nucleótido reducido es el último producto en liberarse (Velasco-García *et al.*, 2000), si bien en la reacción NAD^+ -dependiente existe cierto grado de unión al azar del sustrato y la coenzima.

III.4.3. Estructura tridimensional

La PaBADH es un homotetrámero de 490 aminoácidos y una masa molecular de 53.3 kDa por subunidad. La cristalografía de rayos X (González-Segura *et al.*, 2009; Díaz-Sánchez *et al.*, 2011) mostró que su estructura tridimensional es semejante a la de todas las ALDHs cristalizadas hasta la fecha (ver Figura 3). Esta enzima posee dos sitios de unión a cationes monovalentes por subunidad (González-Segura *et al.*, 2009; Figura 7). Uno de ellos se localiza en una cavidad intra-subunidad que está presente en todas las

III.4. Betaína aldehído deshidrogenasa de *P. aeruginosa*

estructuras cristalinas de las ALDHs conocidas aunque sólo se había reconocido como sitio de unión a Na^+ en la ALDH2 de humano (Pérez-Miller y Hurley, 2003). Nosotros pensamos que fisiológicamente este sitio une a K^+ , cuya unión podría contribuir a que la enzima adopte una conformación óptima para la unión del nucleótido, como se sugirió para el ión Na^+ (Pérez-Miller y Hurley, 2003), aunque esto aún no se ha probado. El otro sitio de unión a K^+ , que no había sido reportado antes en ninguna ALDH pero que parece también estar presente en la mayoría de estas enzimas cuya estructura tridimensional se conoce, se localiza entre los monómeros de la unidad dimérica (los tetrámeros son en realidad dímeros de dímeros), en una región involucrada en la unión de la coenzima, por lo que se piensa que juega un papel tanto en la estabilización de la unidad dimérica de una enzima tetramérica, o del dímero de una dimérica, como en la unión del nucleótido (González-Segura *et al.*, 2009). La estructura de la BADH dimérica de espinaca recientemente determinada (Díaz-Sánchez A.G., González-Segura L., Mújica-Jiménez C., Rudiño-Piñera E., Montiel C. y Muñoz-Clares, R.A., sometido, código de acceso pdb 4a0m) muestra a iones K^+ unidos a los dos sitios encontrados en la PaBADH, confirmando así que estos sitios de unión a cationes monovalentes no son exclusivos de las enzimas tetraméricas.

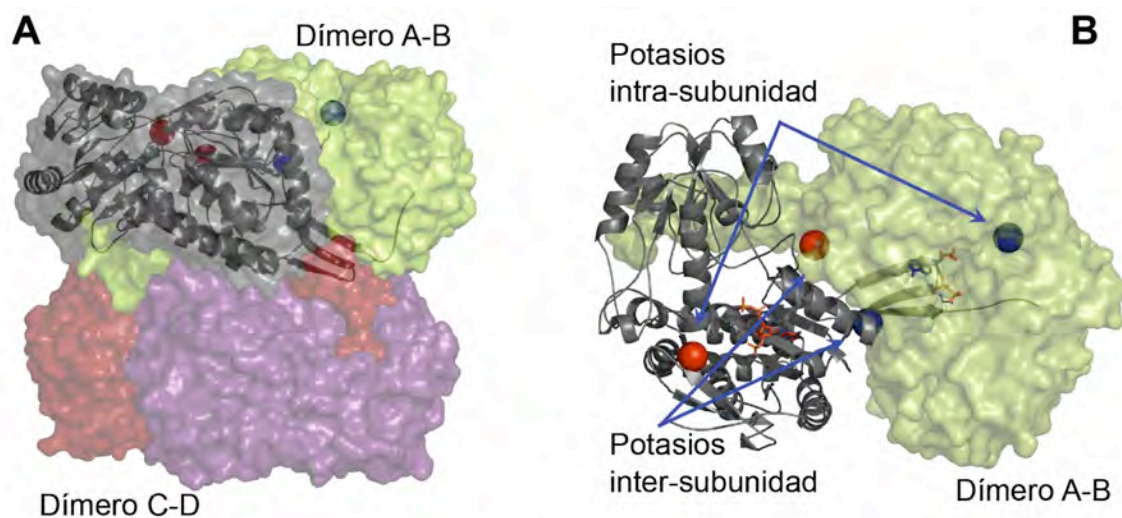


Figura 7. Sitios de unión a cationes monovalentes en la unidad dimérica de la PaBADH. (A) Estructura tridimensional de la PaBADH que muestra su estado de oligomerización tetramérica como un dímero de dímeros. **(B)** En la unidad dimérica de la PaBADH se muestran los potasios intra-subunidad e inter-subunidad como esferas.

III.4.4. Utilización de la coenzima

La PaBADH es capaz de utilizar tanto al NAD^+ como al NADP^+ casi con la misma eficiencia (Velasco-García *et al.*, 2000). Este uso dual de la coenzima refleja los roles metabólicos que juega la enzima. Si *P. aeruginosa* se encuentra creciendo en un medio de cultivo con glucosa puede producir NADH o NADPH a partir del catabolismo de ésta por la vía de Entner-Doudoroff (Hunt y Phibbs, 1983), gracias a la acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Por otro lado, cuando la bacteria crece en un medio de cultivo con colina, o los precursores de colina, la PaBADH puede llevar a cabo un papel anfibólico similar al que realiza la glucosa-6-P-deshidrogenasa (Figura 8) y producir ya sea NADH o NADPH (Velasco-García *et al.*, 2000). Es probable que ambas enzimas se encuentren sometidas a los mismos mecanismos de regulación metabólica que le permitan a la bacteria mantener sus requerimientos tanto de NADH como de NADPH. En este sentido es interesante que los parámetros cinéticos por las coenzimas y los sustratos tengan un valor muy cercano en ambas enzimas (Ma *et al.*, 1998; Velasco-García *et al.*, 2000).

III.4. Betaína aldehído deshidrogenasa de *P. aeruginosa*

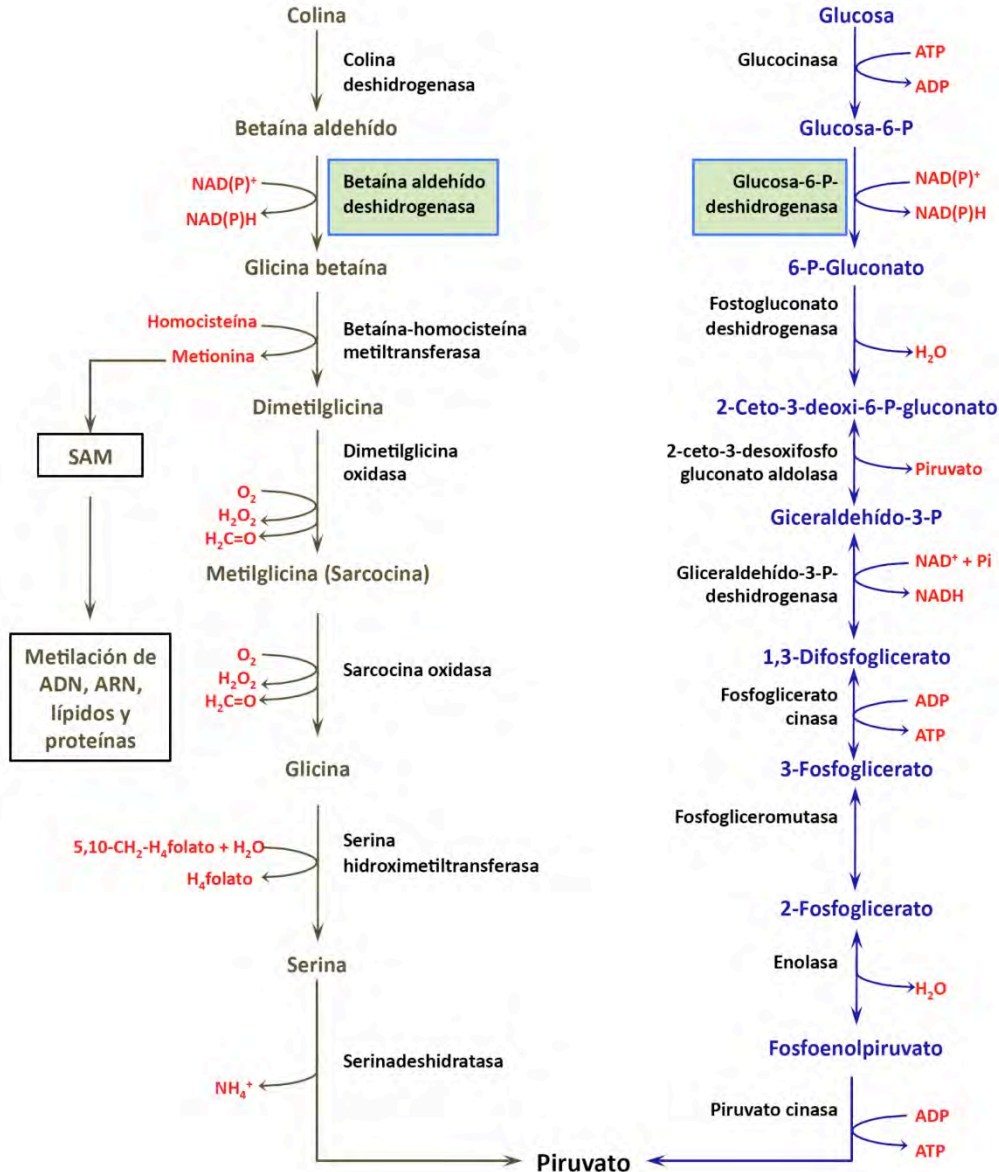


Figura 8. Vías de degradación de la colina y de la glucosa (vía de Entner-Doudoroff) en *P. aeruginosa*.

El dominio de unión a la coenzima de la BADH, de manera similar a los de las otras ALDHs (Liu *et al.*, 1997), carece de la última parte del motivo $\alpha\beta$ típico del plegamiento tipo Rossmann (Rossmann *et al.*, 1974) descrito para las alcohol deshidrogenasas (Eklund *et al.*, 1984). Los nucleótidos se unen al sitio activo de las ALDHs principalmente por puentes de hidrógeno entre los residuos de algunas enzimas y

III.4. Betaína aldehído deshidrogenasa de *P. aeruginosa*

los grupos hidroxilo de la ribosa de la mitad adenosina (Liu *et al.*, 1997; Steinmetz *et al.*, 1997). El modo en el que se acomoda el grupo de 2'-fosfato en algunas ALDHs que unen NADP(H) no está tan conservado. En la mayoría de las deshidrogenasas dependientes de nucleótidos de piridina que prefieren NAD⁺ en vez de NADP⁺ existe un residuo de aminoácido cargado negativamente, que en el caso de la ALDHs es un glutamato, el equivalente al E195 de la ALDH2 (Liu *et al.*, 1997; Steinmetz *et al.*, 1997; Johansson, *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1998; Gruez *et al.*, 2004; Di Constanzo *et al.*, 2007) interaccionando con la ribosa de la adenosina, mientras que en las deshidrogenasas dependientes de NADP⁺ existe un residuo no cargado en la posición equivalente (Figura 9A; Bränden y Tooze, 1991). De acuerdo con esto, las ALDHs que unen NADP⁺ con mayor afinidad que el NAD⁺ tienen un residuo no cargado en una posición equivalente a la del E195 de la ALDH2 (Ahvazi *et al.*, 2000; Cobessi *et al.*, 2000; Lorentzen *et al.*, 2004; Tsybovsky *et al.*, 2007; Bains y Boulanger, 2008). Sin embargo, la PaBADH (que tiene especificidad dual por el nucleótido) sí posee este glutamato pero mantiene su grupo carboxilo lejos del 2'-fosfato de la ribosa del adenosina por medio de una fuerte interacción iónica entre este grupo carboxilo y un residuo de arginina (González-Segura *et al.*, 2009; Figura 9B). Esta forma de unión del grupo de 2'-fosfato de NADP⁺ (no descrita anteriormente para ninguna deshidrogenasa de piridina) probablemente le proporcione a la enzima un mecanismo tipo *interruptor* para cambiar de la conformación que une al NAD⁺ a la conformación que une al NADP⁺. El equivalente del residuo de arginina R40 de la PaBADH sólo se encuentra en el 0,4% de las secuencias de ALDHs conocidas (Martínez-Castilla, comunicación personal) y todas ellas son enzimas bacterianas que presumiblemente sean enzimas anfibólicas capaces de utilizar tanto al NAD⁺ como NADP⁺ con una eficiencia catalítica similar. De hecho, una sorbosona deshidrogenasa que también contiene el residuo de arginina puede usar ambos nucleótidos con igual eficiencia (Hoshino *et al.*, 1991).

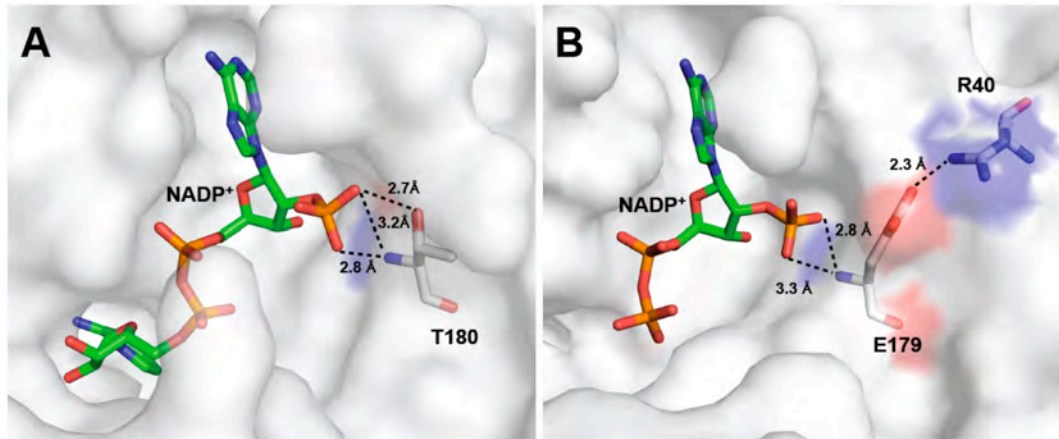


Figura 9. Diferentes modos de unión del NADP⁺ por las enzimas ALDH. A) Unión del grupo 2'-fosfato del NADP⁺ en la SmGANP dependiente de NADP⁺ (Cobessi *et al.*, 2000, código de acceso pdb 2euh), esta enzima tiene un residuo de treonina en la posición equivalente al E195 de ALDH2. B) Unión del grupo 2'-fosfato de NADP⁺ en la PaBADH dependiente de NAD(P)⁺ (González-Segura *et al.*, 2009, código de acceso pdb 2wme), esta enzima conserva el residuo de ácido glutámico presente en la mayoría de las ALDHs dependientes de NAD⁺, pero evita la repulsión electrostática con el grupo fosfato mediante la formación de un enlace iónico con un residuo de arginina cercano. La figura fue adaptada de Muñoz-Clares *et al.* (2010).

III.4.5. Estabilidad

La presencia de una fuerza iónica fisiológica y de iones K⁺ estabiliza el estado tetramérico nativo de la PaBADH (Velasco-García *et al.*, 1999; Valenzuela-Soto *et al.*, 2003; Garza-Ramos, G., Mújica-Jiménez, C., y Muñoz-Clares, R.A., sometido). En ausencia de iones K⁺ y baja fuerza iónica en el medio, la PaBADH es básicamente monomérica (Valenzuela-Soto *et al.*, 2003). Además se sabe que la mutación del residuo no esencial de cisteína C439, localizado en el dominio de oligomerización, se traduce en la desestabilización de la estructura nativa tetramérica, dando lugar a dímeros inactivos e inestables (González-Segura *et al.*, 2005).

Por medio de calorimetría diferencial de barrido y de dicroísmo circular se ha estudiado la estabilidad térmica de la PaBADH y cómo se afecta por la fuerza iónica y por la presencia de iones monovalentes, K⁺ y Na⁺. La desnaturalización térmica de la proteína a baja fuerza iónica forma agregados solubles que retienen hasta un 80% de

III.4. Betaina aldehído deshidrogenasa de *P. aeruginosa*

estructura secundaria mientras que a alta fuerza iónica se forman agregados visibles a altas temperaturas. Los iones K^+ evitan la agregación a bajas temperaturas (Garza-Ramos *et al.*, 2007; Garza-Ramos, G., Mújica-Jiménez, C. y Muñoz-Clares, R.A., sometido).

III.5. Inhibidores enzimáticos

III.5.1. Generalidades del los inhibidores enzimáticos

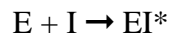
Un inhibidor es una sustancia que interfiere con la reacción que cataliza una enzima disminuyendo o anulando su actividad al unirse a ella. Muchos medicamentos, herbicidas y pesticidas actúan como inhibidores enzimáticos, ya que el bloqueo de una enzima puede matar a un organismo patógeno o corregir un desequilibrio metabólico. La unión de un inhibidor a una enzima puede impedir la entrada del sustrato al sitio activo de ésta y/u obstaculizar que la enzima catalice su reacción correspondiente. Se puede obtener mucha información sobre las reacciones enzimáticas observando los cambios en la reacción causados por la presencia de inhibidores. Los inhibidores pueden afectar una reacción enzimática de dos formas: reversible o irreversiblemente. Un inhibidor reversible se puede unir y desunir de la enzima, por lo que se establece un equilibrio entre las formas libres y el complejo enzima-inhibidor. En cambio, un inhibidor irreversible reacciona con la enzima, en una reacción que consiste en uno o más pasos, al menos uno de ellos irreversible, para producir una proteína modificada que no es enzimáticamente activa o que es menos activa que la enzima no modificada por el inhibidor.

III.5.2. Inhibidores irreversibles

Normalmente los inhibidores irreversibles reaccionan con la enzima de forma covalente y modifican su estructura química a nivel de residuos de aminoácidos que son necesarios para la actividad enzimática o la estabilidad estructural. Los inhibidores irreversibles suelen contener grupos funcionales electrofílicos como mostazas nitrogenadas, aldehídos, haloalcanos o alquenos, que reaccionan con las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos que poseen grupos nucleofílicos, modificando a las proteínas mediante uniones covalentes. Los inhibidores irreversibles causan así una alteración en la estructura del sitio activo, inhabilitándolo, o destruyen la estructura tridimensional de la proteína.

III.5.3. Análisis de la inhibición irreversible

Un inhibidor irreversible I reacciona con la enzima E para producir un complejo EI* inactivo, generalmente mediante una modificación covalente de la proteína.



Aunque esta reacción es de orden dos, para su caracterización cinética se suele convertir en una de pseudoprimer orden usando concentraciones del inhibidor muy superiores a las de la enzima. Si hay un gran exceso de I con relación a E ($[I]_0 \gg [E]_0$), la concentración de I no presentará un cambio significativo durante la reacción y la ecuación de velocidad de ésta se puede escribir de la siguiente forma:

$$v = -d[E]/dt = k_{\text{inact}}[E][I]_0 = k_{\text{obs}}[E]$$

Donde k_{inact} es la constante de velocidad de inactivación de segundo orden y k_{obs} la constante de velocidad de inactivación de pseudo-primer orden ($k_{\text{obs}} = k_{\text{inact}}[I]_0$).

La manipulación de las concentraciones iniciales del inhibidor nos permite convertir una reacción bimolecular en una reacción de pseudo-primer orden, cuya ecuación de velocidad tiene la misma forma y la misma solución integrada que una reacción de primer orden. La constante de velocidad de inactivación observada (k_{obs}) es en estos casos una constante de pseudoprimer orden

El experimento de inactivación bajo condiciones de pseudo-primer orden se lleva a cabo incubando la enzima con un exceso del inhibidor irreversible y midiendo la actividad residual de la enzima a lo largo del tiempo. La actividad irá disminuyendo de forma paulatina en función del tiempo, siguiendo una cinética de decaimiento exponencial. Ajustando estos datos a una ecuación de decaimiento exponencial podemos obtener la constante de velocidad de inactivación a la concentración de inhibidor usada en el experimento (k_{obs}). Graficando los valores de k_{obs} frente a la concentración de reactivo a la que se obtuvieron se determina la constante de velocidad de segundo orden (k_{inact}), que en el caso más simple es la pendiente de la recta que se obtiene en esta gráfica (Fersht, 1985).

III.5.4. Descubrimiento y diseño de inhibidores

La investigación y desarrollo de nuevos fármacos es un largo proceso en el cual el primer

paso casi siempre es el descubrimiento de un nuevo inhibidor enzimático. En el pasado, la única forma de descubrir estos nuevos inhibidores era mediante el sistema de prueba y error: probando un elevado número de compuestos contra la enzima a la cual se quería inhibir y esperando conseguir alguno que fuera efectivo. Esta estrategia, si bien se basa en la fuerza bruta, sigue siendo actualmente exitosa gracias a la existencia de nuevos sistemas de rastreo, como la química combinatoria, que rápidamente producen un gran número de compuestos novedosos, y a la tecnología de procesamiento de alto-rendimiento, mediante la cual se pueden revisar rápidamente estas enormes bibliotecas químicas de posibles inhibidores útiles (Koppitz y Eis, 2006).

Otra estrategia consiste en el diseño racional de fármacos, usando el conocimiento de la estructura tridimensional del sitio activo de una enzima o de la estructura del estado de transición para predecir qué moléculas podrían ser inhibidores (Scapin, 2006). Una vez realizada la predicción, se prueban y se selecciona la mejor. Este nuevo inhibidor se usa para obtener una estructura de la enzima en un complejo enzima-inhibidor que muestre cómo se une la molécula al sitio activo. El análisis de este complejo permite llevar a cabo ciertos cambios en la estructura del inhibidor con el fin de optimizar la unión con la enzima. Este ciclo de prueba y optimización se repite de forma sucesiva hasta obtener un inhibidor lo suficientemente potente, es decir, cuando se alcanza un valor de la constante de disociación que esté en torno a $<10^{-9}$ M (Hunter, 1995). Un ejemplo notable de esta aproximación experimental lo constituyen los inhibidores desarrollados por el Dr. Vern L. Schramm y su equipo de colaboradores. Basándose en el conocimiento de las características geométricas y de carga del estado de transición de ciertas reacciones enzimáticas (Lee *et al.*, 2005; Schramm, 2005), diseñaron un tipo de inhibidores muy potentes con constantes de disociación de alrededor de 10^{-15} M (Schwartz y Schramm, 2009). Esta información se utiliza para el diseño racional de los inhibidores del estado de transición, que tienen el potencial de ser nuevos agentes biológicamente activos (Gutiérrez *et al.*, 2009).

En el diseño de inhibidores que funcionen como fármacos antibióticos se aprovechan las diferencias en la estructura de los ribosomas. Cuando se inhibe una enzima, ésta debe ser esencial para la supervivencia del patógeno y no estar presente o no ser inhibida en humanos. A este respecto, si se desea eliminar a un organismo por la

III.5. Inhibidores Enzimáticos

inhibición de una enzima no se logrará disminuyendo el flujo a través de una vía esencial, sino al aumentar la concentración de algún(os) metabolito(s) a niveles tóxicos, siendo esta última una estrategia mucho más eficaz que la anterior (Cornish-Bowden y Cárdenas, 2003)

III.6. Modificación química de aminoácidos

III.6.1. Grupos reactivos de aminoácidos

Los grupos reactivos de los aminoácidos de péptidos y proteínas incluyen los grupos α -amino y α -carboxilo terminales (α -NH₃⁺ y α -COO⁻), los grupos carboxilo de la cadena lateral de los ácidos glutámico y aspártico, el amino de la cadena lateral de la lisina (ϵ -NH₃⁺), el guanidinio de la arginina ($-\text{NH}_2-(\text{C}=\text{NH})-\text{NH}_2^+$), los grupos hidroxilo de la serina y treonina ($-\text{OH}$), el fenol de la tirosina ($-\text{PhOH}$), el tioéter de la metionina ($-\text{S}-\text{CH}_3$) y el grupo tiol de la cisteína ($-\text{SH}$), que es el más reactivo de todos estos.

III.6.2. Modificación de grupos tiol

La cisteína es uno de los residuos de aminoácidos menos abundante en las proteínas. La capacidad de su grupo tiol para donar electrones y oscilar entre un estado reducido y diversos estados oxidados le permiten participar en muchos aspectos de la estructura y función de las proteínas (González-Segura y Muñoz-Clares, 2003), por lo que la modificación química de este residuo puede eliminar más de una función de la proteína en cuestión. Los reactivos que derivatizan el grupo tiol de la cisteína son de los más utilizados en la modificación química de proteínas y la gran mayoría de ellos son altamente específicos. Se pueden agrupar de manera general como: **1)** Agentes alquilantes que modifican la cisteína por adición de un grupo alquilo o arilo al azufre de la cisteína (E-S-R); éstos incluyen a los iones de metales pesados (E-S-M). **2)** Agentes oxidantes que llevan a la formación de especies oxidadas del tiol de la cisteína como son: los oxiácidos sulfénico (E-SOH), sulfínico (E-SO₂H) o sulfónico (E-SO₃H), o a la formación de un puente disulfuro intra- o inter-molecular (E-S-S-E). El estado de oxidación del átomo de azufre en el sulfénico o en el puente disulfuro puede revertirse por agentes reductores, mientras que la oxidación hasta ácido sulfínico o sulfónico es irreversible. **3)** Reactivos con grupos tiol o disulfuros los cuales forman un disulfuro mixto entre el tiol de la cisteína y el tiol del reactivo modificante (E-S-SR). Con este tipo de reactivos se puede formar un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína si sus

tioles se encuentran enfrentados entre sí a la distancia y geometría adecuadas para que una vez que se ha formado el disulfuro mixto con el primer residuo, el segundo residuo ataque a este disulfuro liberando al reactivo.

III.6.2.1. Modificación de grupos tiol por agentes alquilantes

Para la modificación de grupos tiol de los residuos de cisteína de las proteínas se usan varios agentes alquilantes como el monobromobimano (mBBBr), un compuesto heterocíclico cuyos derivados fluorescen a una $\lambda_{\text{emisión}}$ de 478 nm (Chinn *et al.*, 1986); la *N*-etilmaleimida (1-etilpirrol-2,5-diona; NEM), un derivado del ácido maleico (Gregory *et al.*, 1971), y sus análogos el *p*-*N,N'*-fenilbismaleimida y el *N,N'*-etilbismaleimida los cuales no sólo derivatizan el tiol de la cisteína, sino que además son reactivos que reaccionan con cisteínas enfrentadas, entrecruzando las subunidades donde se encuentran cada una de éstas (Knight y Offer, 1978; Chen *et al.*, 1991); y el ácido yodoacético (IAcH) y la yodoacetamida (IAA), que al reaccionar con la cisteína generan un aducto de menor tamaño que los reactivos anteriores (Smythe, 1936; Anson, 1940). Otros reactivos incluyen metales pesados, como mercurio en el caso del *p*-hidroximercuribenzoato (PHMB), del *p*-cloromercuribenzoato (PCMB) y del HgCl_2 (Bednar *et al.*, 1989), o plata como el AgNO_3 (Lu y Miller, 1995).

Además de los compuestos anteriores, existe un grupo de compuestos alquilantes de cisteína derivados del ácido carbámico: los carbamatos, tiocarbamatos o ditiocarbamatos (Figura 10). Los tiocarbamatos se forman cuando se sustituye un oxígeno del carbamato por un azufre, mientras que los ditiocarbamatos cuando los dos oxígenos se sustituyen por azufre. Son compuestos utilizados como herbicidas, insecticidas o fungicidas. Son liposolubles, no bioacumulables por su rápido metabolismo y eliminación y la mayoría son estables en condiciones alcalinas pero inestables a bajo pH y susceptibles a la foto-oxidación (WHO, 1988).

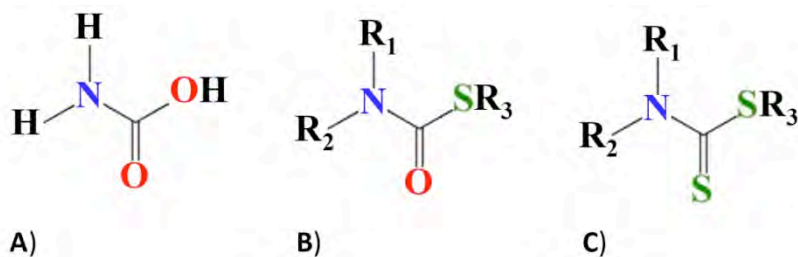


Figura 10. Estructura química del ácido carbámico (A) y sus derivados de azufre tiocarbamatos (B) y ditiocarbamatos (C). R₁, R₂ y R₃ pueden ser átomos de hidrógeno o radicales de alquilo o arilo.

III.6.2.2. Modificación de grupos tiol por agentes oxidantes

Existe una amplia variedad de agentes oxidantes que se utilizan en la investigación bioquímica, de entre los cuales sobresale el peróxido de hidrógeno (Miller y Claiborne, 1991; Rhee *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2008) que puede llevar a la oxidación total del tiol de la cisteína; el óxido nítrico (NO) o sus derivados (como el nitrito, el nitrato, o el peroxinitrito), que oxidan a los grupos tiol mediante *S*-nitrosilación (Rundlöf *et al.*, 2000; Banno *et al.*, 2005; Hess *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2005); el óxido de fenilarsina (PAO, por sus siglas en inglés) y el arsenito-BAL (British anti Lewisita; (*RS*)-2,3-dimercaptopropanol), que son reactivos que se han utilizado ampliamente para la identificación de residuos de cisteína vecinales aunque también pueden reaccionar con un solo residuo de cisteína (González-Segura *et al.*, 2009b).

III.6.2.3. Modificación de grupos tiol por tioles y disulfuros

El grupo tiol de la cisteína puede reaccionar con reactivos disulfuros como el metil metanotiosulfonato (MMTS), un disulfuro *S*-óxido que forma un disulfuro mixto (Daly *et al.*, 1986), o el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditio-bis[2-nitrobenzoico]; DTNB), un reactivo utilizado como estándar para la determinación espectrofotométrica del número o la concentración de tioles reactivos en una muestra (Ellman, 1959). Los tioles reaccionan con el enlace disulfuro del DTNB para generar un disulfuro mixto de cisteín-5-tio-2-nitro-benzoil y un ión 5-tio-2-nitro-benzoato (TNB⁻), el cual, en agua a pH neutro o alcalino, se di-ioniza a TNB²⁻. Este dianión tiene un color amarillo que absorbe luz visible a una λ de 412 nm, con un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $14\ 150\ M^{-1}\ cm^{-1}$

III.6. Modificación química de aminoácidos

en soluciones diluidas y de $13\,700\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ en soluciones con una alta concentración de solutos como 8 M de urea o 6 M de cloruro de guanidinio (Collier, 1973; Riddles *et al.*, 1983). Un error común en la actualidad es el de usar el valor de $\epsilon = 13\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, calculado por Ellman en 1959. Otros disulfuros incluyen reactivos como el difenil disulfuro (Egan y Gale, 1985), el tiram (Garbrecht *et al.*, 2006) o el disulfiram, un inhibidor de ALDHs del cual hablaremos en el siguiente capítulo.

III.7. Disulfiram y sus metabolitos

III.7.1. Disulfiram

El disulfiram (bis[dietiltiocarbamoil]-disulfuro; DSF, Figura 10) es un reactivo específico de grupos tiol que se utiliza como fármaco desde hace más de 60 años en el tratamiento del alcoholismo (Hald y Jacobsen, 1948; Brien y Loomis, 1985). El DSF es un inhibidor potente e irreversible de la ALDH1 (citósólica) y de la ALDH2 (mitocondrial) *in vitro* (Vallari y Pietruszko, 1982; Kitson, 1983) e *in vivo* (Kitson, 1977). La inhibición de la ALDH2, enzima que participa en el metabolismo del etanol, produce niveles elevados de acetaldehído después de una ingestión de alcohol, lo que resulta en una serie de manifestaciones físicas indeseables, entre las que se encuentran náuseas, vómito, taquicardia e hipotensión (Kitson, 1977). En relación al efecto que el DSF tiene sobre las BADHs, se ha encontrado que la BADH de hígado humano (ALDH9) es, *in vitro*, insensible al DSF (Kurys *et al.*, 1989). En nuestro grupo de trabajo se encontró que el DSF es un buen inhibidor de la enzima PaBADH (Velasco-García *et al.*, 2003).

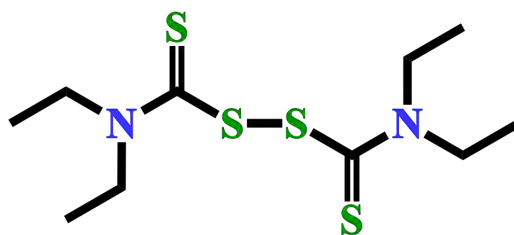


Figura 10. Estructura química del bis[dietiltiocarbamoil]-disulfuro; disulfiram; DSF.

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que el DSF inhibe directamente a la ALDH2 de rata al promover la formación de un enlace disulfuro intramolecular entre dos de los tres residuos de cisteína contiguos presentes en el sitio activo de la enzima (Lipsky *et al.*, 2001b). Sin embargo, estudios *in vivo* señalan que son los metabolitos que se producen por la biodegradación del DSF y no éste los que ejercen su efecto inhibitorio sobre la ALDH2 de hígado (Johansson, 1989; Yourick y Faiman, 1989; Hart y Faiman, 1992).

El uso del DSF como fármaco ha sido propuesto para tratar diferentes problemas de salud además del alcoholismo. Debido a su habilidad para quelar metales y modificar tioles de proteínas, el DSF se ha sugerido como un posible fármaco de uso en clínica. En el tratamiento de melanomas actúa como un quelante de iones cobre o zinc formando un complejo DSF-M²⁺ citotóxico que las células de melanoma introducen con una alta afinidad (Cen *et al.*, 2004). En células de mieloma, el DSF actúa como un inhibidor de un factor de crecimiento celular ya que induce la formación de puentes disulfuro entre las subunidades de este complejo proteínico (Wickstrom *et al.*, 2007). En células de glioblastoma, inactiva a las ALDHs que se encuentran sobre-expresadas en este tipo de células, lo que se traduce en una cito-toxicidad por el aumento de los aldehídos intracelulares (Kast y Belda-Iniesta, 2009). También se ha propuesto su uso en el tratamiento de la dependencia de cocaína, ya que al inhibir a una de las enzimas implicadas en el metabolismo de la dopamina (un neurotransmisor que se libera en grandes cantidades cuando se toma cocaína) se producen ansiedad, inquietud, aumento de la tensión arterial y otros síntomas desagradables (Gaval-Cruz *et al.*, 2008; Gaval-Cruz y Weinshenker, 2009). En el tratamiento de la diabetes tipo 2, el DSF es considerado un poderoso antioxidante ya que en las células β de los islotes de Langerhans el DSF reacciona con las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) previniendo el deterioro de estas células (Nagai *et al.*, 2009). El DSF se considera un antitrombótico debido a que este compuesto inhibe la formación de un puente disulfuro inter-molecular entre la integrina plaquetaria α IIb β 3 y el fibrinógeno, evitando así que las plaquetas se agreguen (Manaster *et al.*, 2009). El DSF además ha sido utilizado como un agente antifúngico contra la levadura multi-fármaco resistente *Candida albicans*, al inhibir una glicoproteína-P que es un transportador dependiente de ATP (Sauna *et al.*, 2005), y como un agente antimalárico, ya que inhibe de manera selectiva la actividad de muchas metaloxigenasas del parásito (Scheibel *et al.*, 1979). Además, en un medio de cultivo *in vitro* el DSF inhibe la glucólisis del parásito (por inhibición de la hexocinasa) sin inhibir la glucólisis de los eritrocitos del medio de cultivo (Scheibel *et al.*, 1979). También se ha probado su uso como un agente antibacterial contra *S. aureus* (Phillips *et al.*, 1991), aunque su mecanismo de acción no está determinado.

III.7.2. Metabolismo del DSF

In vivo, el DSF es rápidamente metabolizado siguiendo la ruta descrita en Hu y colaboradores (1997; Figura 11A). Primero, cuando el DSF se encuentra en el torrente sanguíneo es reducido a ácido dietilditiocarbámico (DDC) por la glutatión reductasa y por la albúmina, aunque ésta última tiene una menor contribución (Cobby *et al.*, 1977b). El DDC es entonces metilado a *S*-metil-*N,N*-dietilditiocarbamoil sulfuro (MeDDTC) (Cobby *et al.*, 1977a), con la subsecuente oxidación ya sea a *S*-metil-*N,N*-dietilditiocarbamoil sulfóxido (MeDDTC-SO) (Madan y Faiman, 1994b), o a *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamoil sulfóxido (MeDTC-SO) (Madan *et al.*, 1995). Por último, los sulfóxidos son re-oxidados a sus respectivas sulfonas: *S*-metil-*N,N*-dietilditiocarbamoil sulfona (MeDDTC-SO₂) y *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamoil sulfona (MeDTC-SO₂) (Jin *et al.*, 1994). Sólo los sulfóxidos y las sulfonas forman aductos de *S,N,N*-dietil-(di)tioarbamoilo con la cisteína catalítica de algunas ALDHs (Jin *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 2000; Lipsky *et al.*, 2001a; Figura 11B). De hecho, como ya se había mencionado, se sugiere que estos metabolitos del DSF son los responsables de la inhibición *in vivo* de la ALDH2 mitocondrial hepática que lleva a la “reacción etanol-disulfiram” (Madan y Faiman, 1994a; Nagendra *et al.*, 1994; Lipsky *et al.*, 2001a).

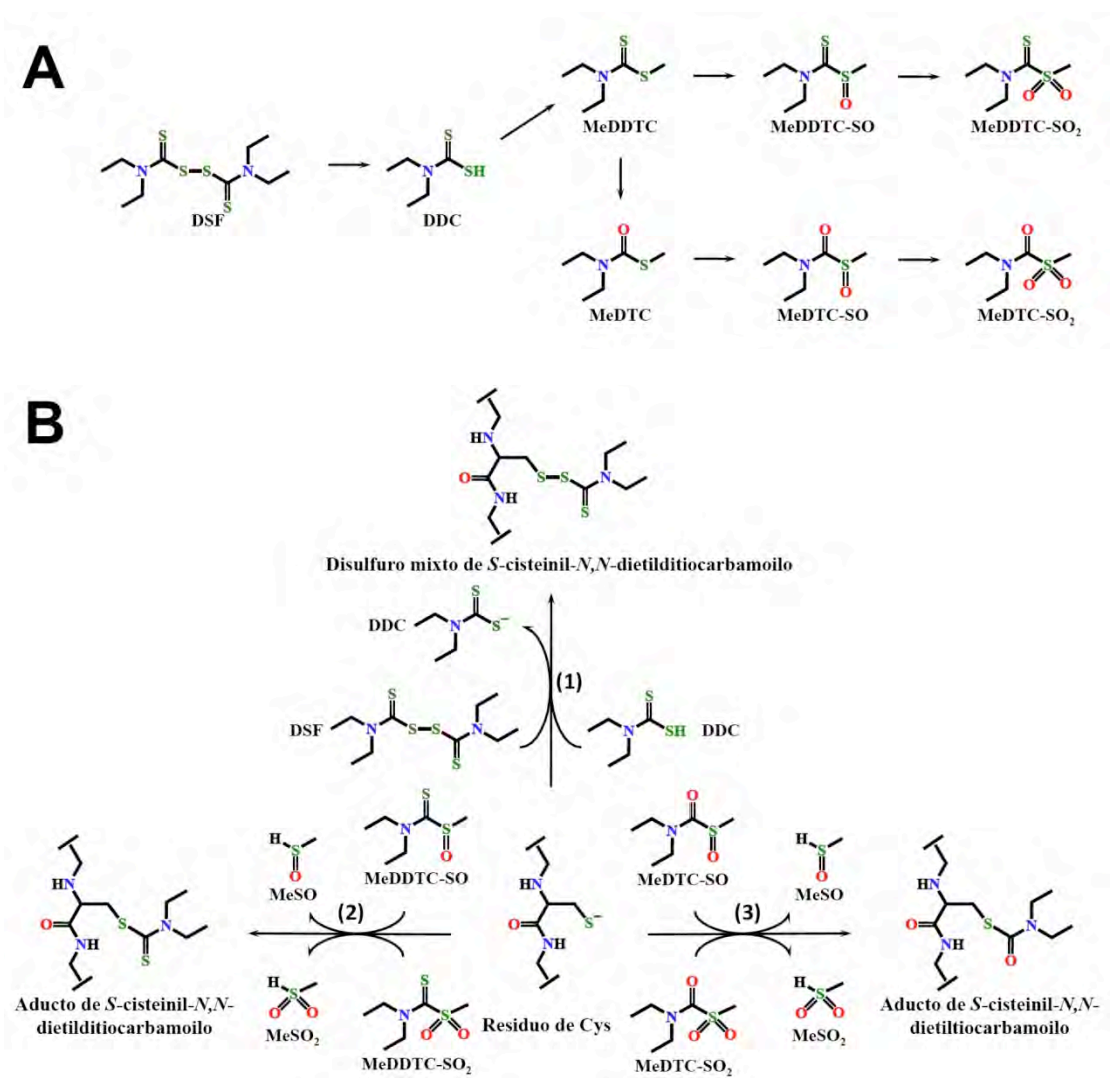


Figura 11. A) Ruta propuesta para la biotransformación del DSF (adaptado de Hu *et al.*, 1997). B) Reacciones propuestas de los metabolitos del DSF con el grupo tiolato de las proteínas (adaptado de Jin *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 2000; Lipsky *et al.*, 2001): (1) Formación de un disulfuro mixto como resultado del ataque nucleofílico de un grupo tiolato sobre el enlace disulfuro del DSF o sobre el tiol del DDC. El DDC es liberado de la reacción con DSF. (2) Cuando el ataque nucleofílico del tiolato es sobre el grupo tiocarbonílico (C=S) del MeDDTC-SO o de la MeDDTC-SO₂ se forma un aducto S-cisteinil-N,N-dietil-ditiocarbamoilo. (3) Si el ataque del tiolato es sobre el grupo carbonilo (C=O) del MeDTC-SO o de la MeDTC-SO₂ se forma un aducto S-cisteinil-N,N-dietil-tiocarbamoilo. MeSO y MeSO₂ son liberados de las reacciones (2) o (3).

III.8. Planteamiento del problema

Dada la abundancia de colina o sus precursores en los tejidos que infecta *P. aeruginosa* (Kilbourn, 1978; Pesin y Candia, 1982; Wrigth y Clements, 1987) y las condiciones de estrés osmótico y oxidativo que imperan en estos sitios (Rennick, 1981; D'Souza-Ault, *et al.*, 1993), pensamos que la PaBADH podría ser una enzima clave para el establecimiento y crecimiento de este importante patógeno durante la infección al proporcionar tanto esqueletos carbonados y nitrógeno como glicina betaína y NADPH. Su inhibición, por tanto, afectaría seriamente a la bacteria. Pero sobre todo, la inhibición de la PaBADH *in vivo* llevaría a la acumulación de la betaína aldehído en el interior de la bacteria hasta concentraciones tóxicas. Por lo tanto esta enzima podría ser un blanco potencial de agentes antimicrobianos contra este importante patógeno altamente resistente a los antibióticos. De aquí nuestro interés la búsqueda o el diseño de inhibidores específicos de la PaBADH que pudieran tener un uso potencial como fármacos frente a la infección por esta bacteria. Además, los estudios de inhibición de la PaBADH nos permitirán avanzar en el conocimiento de su estructura, mecanismo de reacción y papel en la fisiopatología de la bacteria.

Por ello en este trabajo probamos al DSF y a sus metabolitos (DDC, MeDDTC-SO, MeDTC-SO, MeDDTC-SO₂ y MeDTC-SO₂) como inhibidores tanto *in vitro* como *in situ* de la PaBADH, así como inhibidores *in vitro* del crecimiento de *P. aeruginosa*.

IV. Hipótesis

Si el crecimiento de *P. aeruginosa* en los lugares que infecta requiere de la actividad de la enzima PaBADH, su inhibición afectará negativamente el crecimiento de la bacteria o incluso podrá matarla si se acumula betaína aldehído en concentraciones tóxicas, por lo que esta enzima constituiría un nuevo blanco potencial de fármacos contra este importante patógeno humano.

V. Objetivos

V.1. Objetivo general

Investigar la capacidad del DSF y sus metabolitos (MeDDTC-SO, MeDDTC-SO₂, MeDTC-SO y MeDTC-SO₂) para inhibir *in vitro* e *in situ* a la PaBADH así como para impedir el crecimiento *in vitro* de *P. aeruginosa*.

V.2. Objetivos particulares

1. Estudiar la inhibición *in vitro* e *in situ* de la PaBADH por DSF y sus metabolitos.
Para ello:
 - a. Determinar la cinética de inactivación de la PaBADH *in vitro* por DSF y por sus metabolitos, en ausencia y presencia de sus sustratos.
 - b. Investigar si la PaBADH inactivada por los compuestos anteriores recupera su actividad por acción de reductores fisiológicos como el glutatión reducido, o no fisiológicos como el DTT y el 2-mercaptoetanol.
 - c. Determinar la cinética de inactivación de la PaBADH *in situ* por DSF y por sus metabolitos utilizando células de *P. aeruginosa* crecidas en presencia de colina e incubadas con el inhibidor seleccionado.
2. Investigar los cambios estructurales de la PaBADH debidos a la modificación química por DSF y sus metabolitos. Para ello:
 - a. Determinar el efecto de las modificaciones por DSF y sus metabolitos sobre la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la PaBADH.
 - b. Determinar el efecto de las modificaciones por DSF y sus metabolitos sobre la termoestabilidad de la enzima.
3. Investigar el efecto inhibitorio del DSF y sus metabolitos sobre el crecimiento *in vitro* de *P. aeruginosa*. Para ello:

V. Objetivos

- a. Determinar el efecto del DSF y sus metabolitos sobre el crecimiento de la bacteria a 37 °C en medios de cultivo que contengan colina, glucosa más colina o glucosa más colina y NaCl.
- b. Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de estos compuestos.
- c. Si se observa inhibición del crecimiento bacteriano, investigar si se debe, al menos en parte, a la modificación química de la PaBADH por DSF o sus metabolitos.

VI. Materiales y métodos

VI.1. Reactivos

ANS, DSF, DDC (sal sódica), cloruro de dietil-tiocarbamoilo, tiometóxido de sodio, metaperyodato de sodio, betaína aldehído (clorhidrato), NADP⁺ (sal sódica), DTT, 2-mercaptoetanol, DTNB, GSH reducido, EDTA (sal potásica), y DMSO fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Toluca, México). Los metabolitos del DSF: MeDTC, MeDDTC-SO, MeDTC-SO, MeDDTC-SO₂ y MeDTC-SO₂ se sintetizaron en el Laboratorio de Síntesis Orgánica, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, por la M. en C. Patricia Demare con la asesoría del Dr. Ignacio Regla. Todos los demás reactivos utilizados en este estudio fueron de grado analítico.

VI.2. Microorganismos, medios de cultivo y conservación de las cepas

En este trabajo se utilizó una cepa de *P. aeruginosa* PAO1, la cual se creció aeróbicamente a 37 °C en medio líquido Luria-Bertani (LB) más 20 mM de colina y se almacenó en glicerol estéril al 50% (v/v) a -80 °C hasta su uso. Los efectos del DSF y sus metabolitos, *in vivo* e *in situ*, se probaron en células de *P. aeruginosa* PAO1 crecidas a 37 °C, pH 7.2, en los siguientes medios de cultivo: 1) medio mínimo M9, el cual contiene 16 mM de glucosa y 15 mM de NH₄Cl como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente (Sambrook *et al.*, 1989); 2) medio M9 más 20 mM de colina (M9+C); 3) medio M9 modificado (M9C) en el cual la glucosa y el NH₄Cl se sustituyeron por 20 mM de colina como única fuente de carbono y nitrógeno; 4) medio nutritivo Mueller-Hinton, (este medio es utilizado universalmente para la prueba de sensibilidad de los antimicrobianos) más 20 mM de colina (MH+C). El crecimiento bacteriano se siguió por el cambio en la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀). La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS que contiene el plásmido pCALbetB clonado con el gen de la PaBADH (*betB*) (Velasco-García *et al.*, 2006a), se creció en medio líquido LB a 37 °C hasta una DO₆₀₀ de 0.6, tras lo cual se le adicionó 50% (v/v) de glicerol estéril y se conservó a -80 °C hasta su uso.

VI.3. Síntesis química de los metabolitos del DSF

La pureza de los compuestos sintetizados fue confirmada por espectroscopía de RMN (^1H , ^{13}C), IR y EI-MS. Los espectros de RMN se obtuvieron en un aparato JEOL Eclipse a 300 y 75 MHz, usando tetrametilsilano como estándar interno y CDCl_3 como solvente. Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrómetro Perkin Elmer 203-B en la región espectral de 4000–400 cm^{-1} . La espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5989-A.

El MeDTC se sintetizó por dos métodos. El primero, a partir de cloruro de *N,N*-dietil-tiocarbamoilo y tiometóxido de sodio mediante una modificación del método reportado por Gray y Joo (1986). Esta modificación consistió en agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente en metil *tert*-butil éter durante 20 h. El segundo, siguiendo una modificación del método descrito por Mizuno *et al.* (2004), que brevemente consistió en una reacción multi-componente con CO, azufre y dietilamina a 25 °C y 413.7 kPa. El producto de esta reacción se alquiló a 15 °C adicionando sulfato de dimetilo a la mezcla e incubando a 25 °C durante 16 h. En ambos casos se obtuvo un líquido incoloro con un 83% de rendimiento. IR_{película}: 2975.6, 2932.7, 1649.8, 1458.8, 1407, 1307.8, 1250.6, 1117.5, 861.1 cm^{-1} ; ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 1.17 [t, $J=7$ Hz, 6H], 2.32 [s, 3H], 3.39 [c, $J=6.93$ Hz, 4H]; ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 12.7, 13.3, 41.9, 167.5.

El MeDTC-SO se preparó por oxidación del MeDTC con metaperyodato de sodio, siguiendo el método descrito por Hart y Faiman (1992). Se obtuvo un líquido naranja con un 73% de rendimiento. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 1.23 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, H-a), 1.28 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, H-a'), 2.77 (s, 3H, H-c), 3.47 (dc, $J=7.1$ Hz, 2H, H-b), 3.58 (dd, $J=3.6$ Hz, 2H, H-b'); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 12.54 (CH_3 , C-a), 14.52 (CH_3 , C-a'), 37.38 (S- CH_3), 41.08 (CH_2 , C-b), 42.89 (CH_2 , C-b'), 167.95 (C=O); MS (m/z , %): 44(82) [$^+\text{CO}_2$], 47 (3) [$^+\text{SCH}_3$], 64 (11) [$^+\text{OSCH}_3$], 72 (96) [$(\text{CH}_2)_2\text{N}^+$], 100(100) [$(\text{CH}_2)_2\text{NCO}^+$], 116(1) [$(\text{CH}_2)_2\text{NCO}_2^+$].

La MeDTC-SO₂ se preparó por oxidación del MeDTC siguiendo el método publicado por Nagendra *et al.* (1994) con una modificación que consistió en la incubación del MeDTC con un exceso de ácido peracético en acetonitrilo por 4 h a 25 °C. Por este método se obtuvo un líquido incoloro con un rendimiento del 77%. IR_{película}:

2980.1, 2938.3, 1648.9, 1460.4, 1428.4, 1301.4, 1262.8, 1151.6, 1115.9 cm^{-1} ; ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 1.22 [t, $J_1 = 7.2$ Hz], 1.30 [t, $J_2 = 7$ Hz, 3H], 3.13 [s, 3H], 3.42 [c, $J = 7.1$ Hz, 2H], 3.75 [c, $J = 7$, 3H]; ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 12.1, 13.7, 39.5, 41.4, 42.6, 160.6.

El MeDDTC-SO se preparó siguiendo la metodología descrita por Madan y Faiman (1994a) pero con una modificación que consistió en mezclar 1.32 mL de una solución de peróxido de hidrógeno al 30% (v/v) con 2 g de DDC en solución acuosa a 0 °C con agitación suave durante dos minutos. Después se adicionaron 100 mL de metanol y 1.6 g de yoduro de metilo con agitación continua durante 12 h a 4 °C. El exceso de metanol se evaporó a 25 °C en un evaporador rotatorio y el residuo orgánico resultante se extrajo con 30 mL de cloruro de metileno ($\times 3$ veces); después se secó y purificó por cromatografía en columna de sílica-gel, eluyendo con una mezcla de hexano:acetona 85:15. Como producto final se obtuvieron cristales amarillos con un punto de fusión de 50-52 °C, con un 36% de rendimiento. IR_{película}: 3423.6, 2972.2, 1672.2, 1505.6, 1463.9, 1427.9, 1353.7, 1276.2, 1081.5 cm^{-1} ; ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 1.33 [t, $J = 7.2$ Hz, 3H], 1.36 [t, $J = 7$ Hz, 3H], 2.83 [s, 3H], 3.82-4.13 [m, 4H]; ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 10.8, 14.3, 42.4, 44.9, 50.3, 201.0.

La MeDDTC-SO₂ se preparó siguiendo el método descrito por Hu *et al.* (1997) obteniéndose un líquido amarillo pálido con un 77% de rendimiento. IR_{película}: 2978.1, 2935.9, 2877.2, 1670.0, 1504.1, 1430.7, 1301.6, 1131.4; ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 1.30 [t, $J = 7$ Hz, 3H], 1.37 [t, $J = 7$ Hz, 3H], 3.46 [s, 3H], 3.87 [c, $J = 7$ Hz, 2H], 4.08 [c, $J = 7$ Hz, 2H]; ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 10.1, 13.4, 43.5, 47.9, 49.7, 188.1.

VI.4. Sobre-expresión, purificación y ensayo de actividad estándar de la PaBADH

La PaBADH recombinante se expresó en células de *E. coli* como está reportado en Velasco-García *et al.* (2006a) y se purificó a homogeneidad siguiendo el procedimiento previamente descrito en González-Segura *et al.* (2005). La actividad de PaBADH se midió espectrofotométricamente monitoreando la formación de NADPH a 340 nm como está descrito en Velasco-García *et al.* (1999). La concentración de proteína se determinó

usando el método colorimétrico descrito por Bradford (1976) o por absorción a 280 nm siguiendo el método de Gill y von Hippel (1989).

VI.5. Inactivación *in vitro* de la PaBADH

Las muestras de PaBADH (a una concentración de 5 μ M como sitios activos) se incubaron con DSF o sus metabolitos (a 50 μ M de concentración final), o con MMTS y DTNB (5 μ M y 0.4 mM de concentración final, respectivamente) a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas en un amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM, pH 6.9, que además contenía EDTA 1 mM, KCl 50 mM, y 10% glicerol (v:v) (amortiguador de inactivación) y en ausencia o presencia de NADP⁺ 0.6 mM. Como control, se utilizaron 5 μ L de etanol absoluto en vez del inhibidor. Las soluciones concentradas de MMTS, DTNB, DSF o los metabolitos del DSF se prepararon en etanol absoluto (a 50 μ M, 100 mM y 5 mM respectivamente) y los ligandos de la enzima se disolvieron en agua saturada con N₂ gaseoso. Antes de la modificación química, el 2-mercaptoetanol se eliminó de la solución concentrada de enzima por filtración rápida en mini-columnas de Sephadex G-25 (GE, Healthcare), previamente equilibradas con el amortiguador de inactivación sin O₂ y saturado con N₂. Para evitar la oxidación de todos los residuos de cisteína de la PaBADH, todas las soluciones usadas se saturaron con N₂ gaseoso inmediatamente antes de su uso. La actividad enzimática remanente se determinó a 30 °C mediante el ensayo de actividad estándar. Las constantes de velocidad de inactivación de segundo orden se calcularon a partir de las constantes de velocidad de pseudo-primer orden estimadas por ajuste de los datos de velocidad inicial a una ecuación de decaimiento exponencial simple, usando regresión no lineal. Para tratar de reactivar a las muestras de PaBADH totalmente inactivadas, se realizó la incubación de cada muestra a 37 °C por 24 h con DTT 5 mM o GSH 10 mM.

VI.6. Inactivación *in situ* de la PaBADH

Volúmenes apropiados de DSF o de sus metabolitos, disueltos en DMSO a una concentración 100 mM, se adicionaron al medio de cultivo para dar una concentración final de 50 μ M cuando se alcanzó una DO₆₀₀ de 0.1. Al tiempo de incubación indicado se

cosecharon las células y se lavaron con una solución de NaCl al 0.9% por centrifugación a $24,927 \times g$ durante 3 minutos ($\times 4$ veces), para eliminar el exceso de reactivo. Después, las células se resuspendieron en un volumen apropiado de amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM, pH 6.9 (el cual contenía 1 mM de EDTA, 10% de glicerol [v/v] y 20 mM de 2-mercaptoetanol) y se desintegraron por oscilación sónica en un desintegrador (Sonics Vibra-Cells) con pulsos intermitentes (30% de amplitud de onda) de 10 s de sonicación y 10 s de descanso en un tiempo total de 3 min. El extracto celular crudo se centrifugó a $24,150 \times g$ durante 15 min. Todas las operaciones se realizaron a 4 °C. La actividad de PaBADH del sobrenadante (extracto libre de restos celulares) se determinó mediante el ensayo de actividad estándar (Velasco-García *et al.*, 1999), la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976) y el contenido relativo de la proteína PaBADH de estos extractos por Western blot como está descrito en Velasco-García *et al.* (2006a).

VI.7. Inhibición del crecimiento bacteriano en agar y medio líquido

La actividad antimicrobiana del DSF, el DDC, el MeDDTC-SO, la MeDDTC-SO₂, el MeDTC-SO, y la MeDTC-SO₂ se probó determinando su efecto sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 a 37 °C por el método de difusión de disco en agar o en medio líquido. En el primer caso, el agar M9C se inoculó de forma masiva con una suspensión de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 (0.08 - 0.1 de DO₆₀₀). Sobre el medio inoculado se colocó un disco de papel filtro con 5 μ moles del reactivo a probar, disueltos en DMSO, y después de 18 h de incubación a 37 °C se midió el diámetro de la zona de inhibición. En el segundo caso, el medio líquido (M9, M9+C, o M9C) se inoculó con la cepa y al tiempo indicado se le adicionó DSF o cada uno de sus metabolitos a una concentración final de 50 μ M. A la muestra control se le adicionó el mismo volumen de DMSO.

VI.8. Determinación del MIC en medio líquido

La concentración mínima de inhibitoria de MeDDTC-SO y MeDTC-SO₂ necesaria para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 a 37 °C, se determinó por el método de dilución en tubo en un volumen final de 1 mL de cada uno de los siguientes medios de

cultivo: M9C, M9+C y MH+C, en ausencia y presencia de 700 mM de NaCl. La bacteria se creció a en cada uno de los medios de cultivo a ensayar en ausencia de NaCl a una DO_{600} de 0.6 ($\times 2$ veces). De cada uno de los cultivos anteriores se preparó una suspensión bacteriana a una DO_{600} de 0.1 en el medio de cultivo apropiado \pm NaCl. Se preparó una serie de diluciones de los reactivos a probar, al doble de concentración, en el medio de cultivo indicado. Cada una de las diluciones de los reactivos se mezcló con el mismo volumen de la suspensión de la cepa (0.5 mL) y se incubaron a 37 °C. El crecimiento bacteriano se siguió por inspección visual cada 2 h hasta que fuera claro al ojo humano (durante 18-24 h). La concentración más baja de reactivo que muestra la inhibición del crecimiento de la bacteria se considera como su MIC. Para cada medio de cultivo se realizó un control de crecimiento el cual consistió en un medio inoculado con la cepa bajo las mismas condiciones de estudio pero sin el reactivo a probar.

VI.9. Evaluación de la estructura secundaria de la PaBADH químicamente modificada

La estructura secundaria de la enzima químicamente modificada se determinó a 20 °C por espectropolarimetría de DC en la región del UV lejano en un espectropolarímetro Jasco J-715. Las muestras de PaBADH (0.3 mg/mL) se modificaron con DSF o sus metabolitos a 25 °C en presencia de 0.6 mM de $NADP^+$ bajo las mismas condiciones de inactivación *in vitro* y se desalaron por filtración rápida en mini-columnas de Sephadex G25 para eliminar el exceso de reactivo. El espectro de DC se determinó en un intervalo de 190-260 nm (UV lejano) con un ancho de banda de 1 nm, en una celda de cuarzo de 0.1 cm de recorrido óptico. Cada espectro fue el promedio de tres barridos consecutivos los cuales se corrigieron restándoles la señal producida por el amortiguador. La elipticidad molar por residuo $[\theta]$ se calculó utilizando una masa promedio de 108.8 gramos por mol de aminoácido, 489 residuos por monómero de PaBADH y una concentración final de enzima de 0.28 mg/mL.

VI.10. Desnaturalización térmica de la PaBADH químicamente modificada

La estabilidad térmica de la PaBADH químicamente modificada por DSF o por sus metabolitos se determinó por desplegamiento térmico de la enzima siguiendo los cambios de elipticidad molar a 222 nm ocasionados por el incremento de la temperatura desde los 20 hasta los 90 °C, usando una velocidad de calentamiento de 0.4 °C min⁻¹.

VI.11. Fluorescencia intrínseca y extrínseca de la PaBADH químicamente modificada

La fluorescencia intrínseca de las muestras de PaBADH químicamente modificadas se determinó a 25 °C en un espectrofluorímetro Shimadzu RF5000U (Kyoto, Japón). El espectro de emisión se obtuvo excitando las muestras de proteína a 296 nm y colectando los datos de emisión en un intervalo de 300 a 400 nm, con incrementos de 0.5 nm de longitud de onda. Los espectros de fluorescencia extrínseca se obtuvieron mediante la fluorescencia de emisión del ANS (a una concentración final de 100 mM) unido a la enzima modificada, excitando a 370 nm y registrando su intensidad de emisión en un intervalo de 390 a 600 nm. Los espectros de fluorescencia intrínseca y extrínseca se corrigieron por sustracción del espectro generado por el amortiguador sin la enzima. El ancho de banda del haz de luz utilizado para la excitación y la emisión, tanto en la fluorescencia intrínseca como en la extrínseca, fue de 5 nm.

VI.12. Cromatografía de exclusión molecular de la PaBADH químicamente modificada

El estado de asociación de la enzima químicamente modificada se determinó por cromatografía de exclusión molecular (SEC, por sus siglas en inglés) en una columna Superdex 200 HR-10/30 (Pharmacia Uppsala, Suiza) acoplada a un equipo de HPLC (Waters Milford, MA, USA). La columna se equilibró y eluyó a temperatura ambiente con el amortiguador de modificación a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. La elución de la proteína se monitoreó siguiendo la absorbancia a 280 nm. Para eliminar los posibles

agregados moleculares de las muestras de enzima antes de la SEC, todas las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a $24,166 \times g$ y el sobrenadante se pasó por un filtro de membrana hidrofílica de PVDF no estéril para jeringa con un poro de $0.22 \mu m$ de diámetro (Millipore, Millex-GV).

VI.13. Estudios de agregación de la PaBADH químicamente modificada

Para estimar la cantidad de agregados de PaBADH formados en la preparación de PaBADH modificada por DSF o sus metabolitos, las muestras de enzima tratadas con el reactivo modificante a $37^\circ C$ hasta la pérdida total de actividad se centrifugaron durante 15 min a $24,166 \times g$. La cantidad de proteína soluble remanente en el sobrenadante se midió por absorbancia a 280 nm.

Las cinéticas de formación de agregados, a $37^\circ C$, se siguieron por dos técnicas. La primera, por turbidimetría, midiendo la dispersión de luz de los agregados de proteína a 450 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 7000 (Fullerton, CA, USA). Antes de cada medida, las muestras se agitaron en un vórtex durante 30 s. La segunda, por fluorescencia extrínseca del ANS (20 veces en exceso de la proteína) unido a las cavidades hidrofóbicas expuestas en la superficie de la enzima durante y después de la modificación. Las muestras de enzima-ANS se excitaron a 370 nm y su intensidad de emisión de fluorescencia se registró a 486.4 nm. El ancho de banda del haz de luz de excitación y de emisión fue de 5 nm.

VI.14. Modelado del sitio activo de la PaBADH modificada covalentemente por DSF o sus metabolitos

Las estructuras de los aductos de *S*-cisteinil-*N,N*-dietil-ditiocarbamoilo, del *S*-cisteinil-*N,N*-dietil-tiocarbamoilo y del disulfuro mixto de *S*-cisteinil-*N,N*-dietil-ditiocarbamoilo se modelaron dentro del sitio activo de la PaBADH usando como templado las coordenadas cristalográficas de la enzima acomplejada con $NADP^+$ (código de acceso pdb 2wme) y el modo de construcción de PyMol (DeLano, 2002).

VII. Resultados y discusión

VII.1. Efectos de la modificación química de la PaBADH *in vitro*

Los resultados que se describen en este apartado forman parte de los artículos publicados: Velasco-García *et al.*, 2006b; Zaldívar-Machorro *et al.*, 2007; Zaldívar-Machorro *et al.*, 2011. (Anexos 1, 2 y 3, respectivamente).

VII.1.1. Inactivación *in vitro* de la PaBADH por DSF y sus metabolitos

Todos los metabolitos del DSF (con excepción del DDC, el cual *in vivo* resulta de la reducción del disulfuro del DSF) causan la pérdida de actividad de la PaBADH siguiendo una cinética de pseudo-primer orden (Figura 12A) como se había encontrado previamente por el DSF (Velasco-García *et al.*, 2003). No se observaron cambios en una muestra de enzima incubada únicamente con 1% (v:v) de etanol absoluto, el cual se usó como vehículo de los reactivos en estos experimentos. Aunque la PaBADH tiene cuatro residuos de cisteína por subunidad, la cisteína catalítica esencial (C286) y tres no esenciales, dos de estos últimos residuos (C353 y C377) tienen su grupo tiol en el interior de la proteína sin acceso al solvente mientras que C439 se localiza en la interfaz entre monómeros que forman una unidad dimérica (González-Segura *et al.*, 2005, 2009b). Sólo la C286 es susceptible a la modificación química por reactivos específicos de grupos tiol, como se probó al modificar químicamente a mutantes individuales de la PaBADH en las que cada uno de los residuos de cisteína no esenciales habían sido cambiados por un residuo de serina por medio de mutagénesis sitio-dirigida (González-Segura *et al.*, 2005, 2009a).

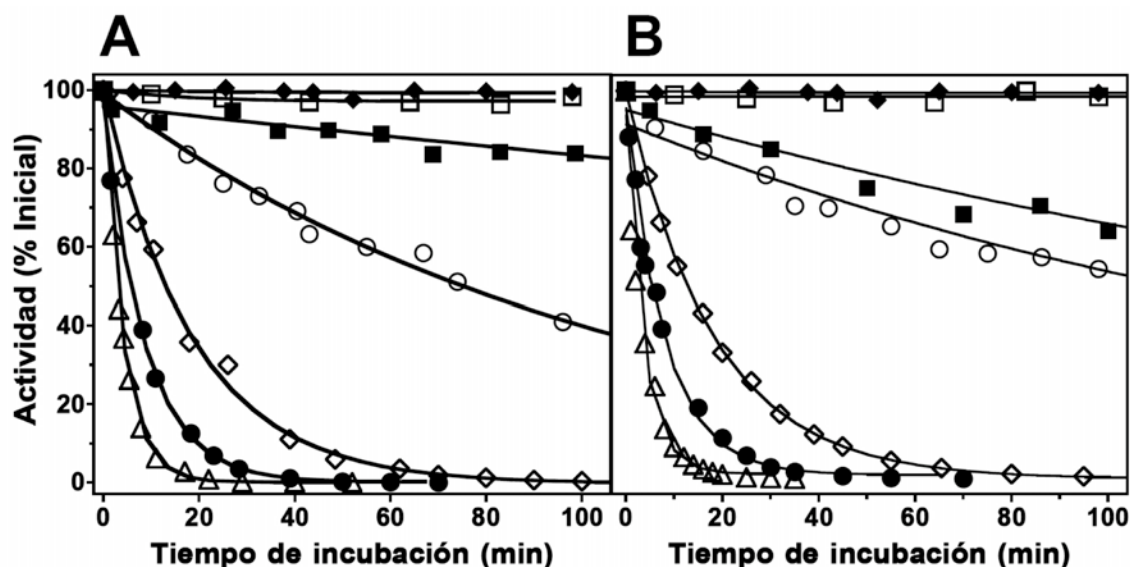
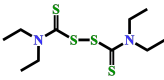






Figura 12. Inactivación *in vitro* de la PaBADH por DSF y sus metabolitos. A) Curso temporal de inactivación de la enzima (5 μM de sitios activos) por incubación a pH 6.9 y 37 $^{\circ}\text{C}$ en el amortiguador de inactivación en ausencia (\blacklozenge) o presencia de 50 μM de cada uno de los siguientes compuestos: DSF (\bullet), DDC (\square), MeDDTC-SO (\circ), MeDDTC-SO₂ (\triangle), MeDTC-SO (\blacksquare) y MeDTC-SO₂ (\diamond). B) Igual que en A, pero la incubación se efectuó en presencia de 600 μM de NADP⁺. En los paneles A y B, los puntos son el promedio de los datos experimentales (obtenidos por triplicado en experimentos independientes) mientras que las líneas son el resultado del mejor ajuste a una ecuación de decaimiento exponencial simple.

Las constantes inactivación de segundo orden dadas en la Tabla 1 indican que el orden de potencia como inhibidores de la PaBADH fue: MeDDTC-SO₂>DSF>MeDTC-SO₂>MeDDTC-SO>MeDTC-SO. *In vitro*, la reactividad relativa de estos compuestos hacia la cisteína catalítica está totalmente de acuerdo con su respectiva electrofilicidad, la cual está dictada por sus estructuras químicas.

Tabla 1. Cinéticas de inactivación^a de la PaBADH por DSF y sus metabolitos

| Compuesto | k_{inact} (M ⁻¹ s ⁻¹) ^b | |
|--|---|----------------------------|
| | – NADP ⁺ | + 0.6 mM NADP ⁺ |
| DSF  | 38.7 ± 1.4 | 40.1 ± 2.0 |
| MeDDTC-SO  | 2.9 ± 0.2 | 2.5 ± 0.2 |
| MeDDTC-SO ₂  | 81.4 ± 1.3 | 86.1 ± 5.4 |
| MeDTC-SO  | 0.5 ± 0.0 | 1.3 ± 0.1 |
| MeDTC-SO ₂  | 18.0 ± 0.7 | 18.3 ± 0.2 |

^aLos experimentos de inactivación se realizaron a pH 6.9 y 37 °C. Otros detalles experimentales se presentan en la sección de Material y métodos. ^bLos valores de las constantes de velocidad de inactivación de segundo orden ± E.S. se calcularon a partir de las constantes de velocidad de inactivación de pseudo-primer orden estimadas por ajuste de los datos de inactivación a una ecuación de decaimiento exponencial simple usando regresión no lineal. Los datos experimentales corresponden a la Figura 12.

Dado que el nucleótido es el primero en unirse al sitio activo en el mecanismo cinético ordenado de la PaBADH, y que la constante de disociación del complejo enzima-nucleótido está por debajo de la concentración intracelular de nucleótidos (Velasco-García *et al.*, 2000), pensamos que *in vivo* una gran proporción de la enzima tiene unido al nucleótido. Debido a esto, probamos la susceptibilidad de la PaBADH a la inactivación por los metabolitos del DSF en presencia de NADP⁺ en el medio de inactivación a una concentración de cerca de 10 veces la K_d para este nucleótido (Velasco-García *et al.*, 2000). Cuando la inactivación se hizo a 37 °C, las constantes de inactivación no cambiaron significativamente por la presencia de este nucleótido (Figura 12B y Tabla 1). Ello contrasta con el incremento que la presencia del NAD(P)⁺ produce en la velocidad de inactivación por DSF a 23 °C (Velasco-García *et al.*, 2003), y sugiere que a 23 °C la unión del nucleótido produce un cambio conformacional en el sitio activo

de la enzima haciendo más reactiva la Cys catalítica, probablemente porque obliga a este residuo a adquirir la conformación de “ataque” (Muñoz-Clares *et al.*, 2010), mientras que a 37 °C es probable que este residuo esté cambiando rápidamente desde la conformación de “descanso” a la de “ataque”, por lo que la presencia del nucleótido no incrementaría la reactividad, ni por ende la velocidad de inactivación.

La PaBADH que ha sido inactivada por alguno de los metabolitos del DSF no puede ser reactivada por un exceso de DTT, una vez más en contraste con la enzima modificada con DSF, cuyo enlace disulfuro mixto se rompe fácilmente por este agente reductor (Velasco-García *et al.*, 2003). La falta de efecto del DTT en la enzima químicamente modificada es compatible con la propuesta de formación de aductos de dietil-(di)tiocarbamoilo estables como resultado de la modificación por estos reactivos (Jin *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 2000b; Lipsky *et al.*, 2001b).

VII.1.2. Efecto del DSF y sus metabolitos sobre la estructura de la PaBADH

Para observar el efecto que la modificación de la PaBADH por DSF y sus metabolitos tiene sobre la estructura, se trataron muestras de enzima a 25 °C con estos reactivos como se describe en Materiales y métodos y se determinó su efecto sobre la estructura cuaternaria, terciaria y secundaria de la enzima, así como sobre su estabilidad térmica.

VII.1.2.1 Efecto del DSF y sus metabolitos sobre la estructura cuaternaria de la PaBADH

El estado de oligomerización de la PaBADH modificada con DSF y sus metabolitos se determinó por SEC. La enzima modificada con DSF parcialmente se disocia en monómeros a 23 °C y a 37 °C forma grandes agregados insolubles de manera irreversible (Figura 13). En contraste, ninguno de los metabolitos del DSF produjo un cambio en el estado oligomérico de la enzima (Figura 14).

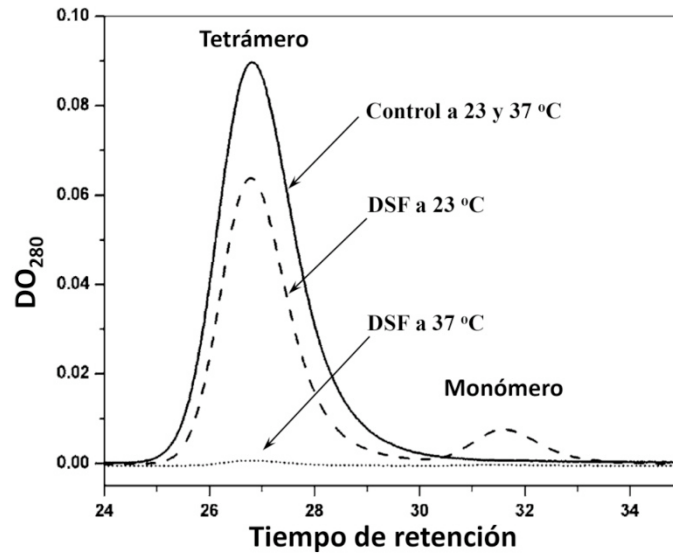


Figura 13. Perfiles de elución de SEC de PaBADH modificada con DSF. La enzima (0.3 mg/mL, 5 μ M como sitios activos) se incubó por 2 h a pH 6.9 con 50 μ M de DSF a 23 °C (+ 0.6 mM de NADP⁺) y 37 °C. Como control se incubó a la enzima en las mismas condiciones pero con 2% (v:v) de etanol, que es el vehículo del DSF. Los agregados visibles de alto peso molecular que se formaron durante la incubación la enzima con DSF a 37 °C se eliminaron por centrifugación antes de aplicar la muestra a la columna de SEC.

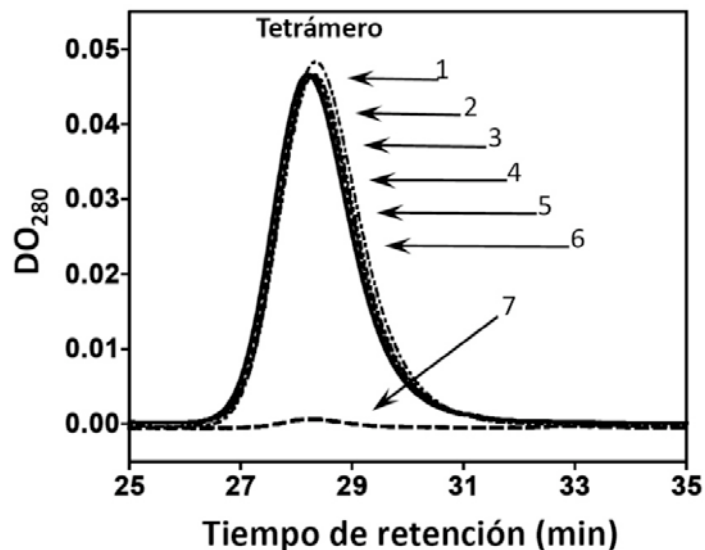


Figura 14. Perfiles de elución de SEC de PaBADH modificada con DSF y sus metabolitos. La enzima (0.3 mg/mL, 5 μ M como sitios activos) se incubó por 2 h a pH 6.9 y 37 °C con 2% (v:v) de etanol el cual es el vehículo de los reactivos, línea 1, o con 50 μ M de DDC, línea 2;

MeDDTC-SO, línea 3; MeDDTC-SO₂, línea 4; MeDTC-SO, línea 5; MeDTC-SO₂, línea 6; DSF, línea 7. En el caso de la muestra de enzima inactivada con DSF, los agregados de alto peso molecular que se formaron durante la incubación se eliminaron por centrifugación de la muestra antes de pasarla por SEC.

La pérdida de estructura cuaternaria que produce la modificación de la cisteína catalítica por DSF probablemente se deba al grupo introducido en el sitio activo, como lo sugiere el hallazgo de que la modificación de la PaBADH con el DTNB, un reactivo de grupos tiol de gran tamaño, también provoca disociación de la enzima, mientras que la modificación con MMTS, de pequeño tamaño, no afecta su estado tetramérico (Velasco-García *et al.*, 2006b). El modelo computacional del disulfuro mixto que se produce por la modificación de la enzima con el DSF (ver Figura 11B) estéricamente puede entrar en conflicto con la cadena lateral del W161 (uno de los átomos de carbono de los etílenos del grupo ditiocarbamato se encuentra a 1.8 Å de distancia del anillo benzílico de la cadena lateral del W161), el desplazamiento que el W161 hace para evitar este choque empujaría al residuo de N465, el cual pertenece a un asa situada en la interfaz entre los monómeros (Figura 15C). Ésta puede ser la razón de la desestabilización de la estructura cuaternaria de la enzima producida por su modificación con el DSF. Sin embargo, los grupos introducidos por los metabolitos del DSF son más cortos y tienen menor grado de libertad debido al carbono trigonal del grupo (di)tiocarbamato generado con el tiol de la cisteína catalítica, probablemente por eso no afectan la estructura cuaternaria. Para investigar si éste era el caso, se construyeron modelos de los aductos de dietil-(di)tiocarbamoilo dentro del sitio activo de la PaBADH y observamos que el residuo introducido por los sulfóxidos o las sulfonas, al azufre de la C286 después de su modificación, no tiene efectos desestabilizadores de la enzima debido a que las cadenas de los aductos son más cortas y no entran en conflicto con la cadena lateral del residuo W161 (Figura 15A y B). De acuerdo con los modelos, la PaBADH permanece en su estado nativo tetramérico después de la inactivación completa por cualquiera de los (di)tiosulfóxidos o las (di)tiosulfonas (ver Figura 14), lo que es consistente con los datos experimentales obtenidos por filtración en gel.

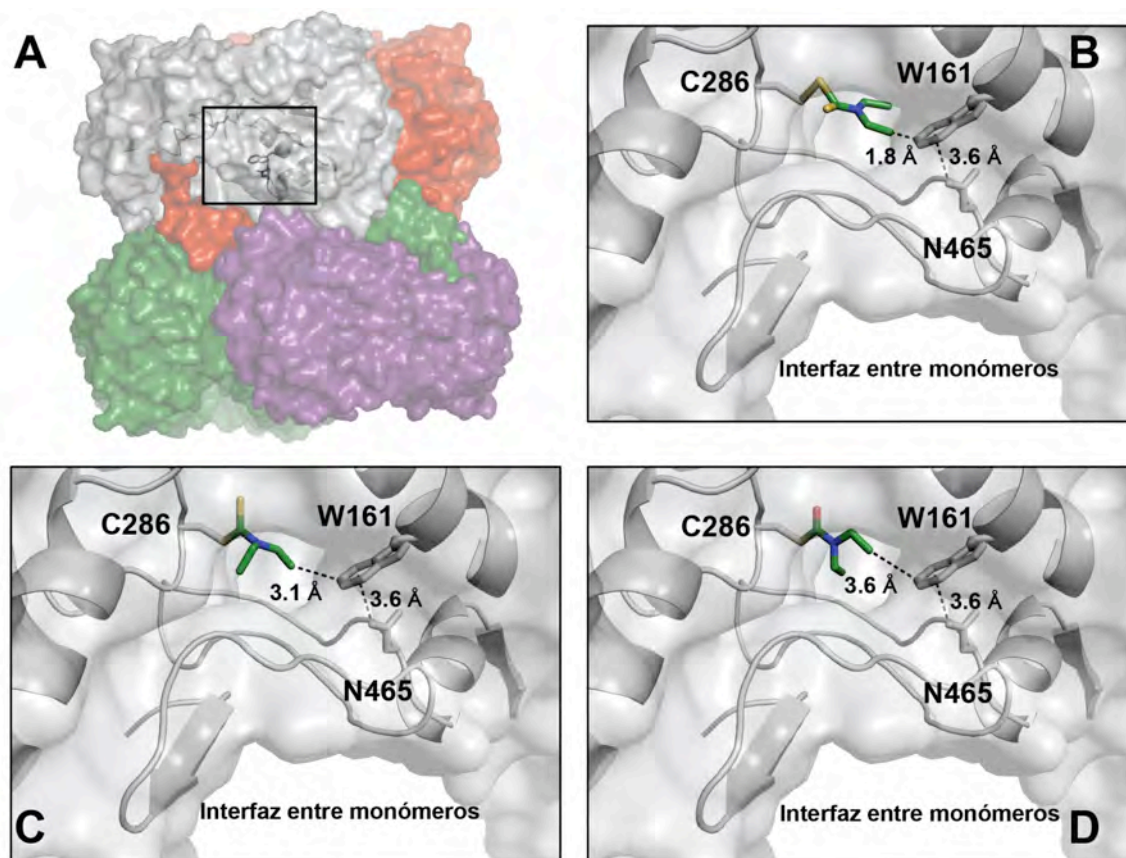


Figura 15. Modelos del sitio activo de la subunidad A del tetrámero de la PaBADH. En el panel (A) se muestra la estructura tridimensional del tetrámero de la enzima y las subunidades están coloreadas como sigue: subunidad A, blanco; subunidad B, rojo; subunidad C, verde y subunidad D, morado. Bajo la superficie de la subunidad A se muestran algunos elementos de estructura secundaria y en el recuadro a su sitio activo. Modelos de la cisteína catalítica modificada con DSF (B); con MeDDTC-SO o con MeDDTC-SO₂ (C) y con MeDTC-SO o con MeDTC-SO₂ (D). En (B) se muestra el aducto disulfuro mixto y en (C) y (D) a los aductos de *S*-cisteinil-*N,N*-dietil(di)tio-carbamoilo. Las cadenas laterales de la C286, el W161 y la N465 se muestran como bastones de color gris y los carbonos de los aductos de color verde. Las distancias se muestran como líneas punteadas de color negro y se miden en ångströms. La figura se hizo usando el programa PyMol (DeLano, 2002).

VII.1.2.2. Efecto del DSF y sus metabolitos sobre la estructura terciaria de la PaBADH

Los cambios en la fluorescencia intrínseca y extrínseca de la enzima tratada con DSF o con sus metabolitos a 25 °C se incluyen en la Tabla 2. DSF, MeDTC-SO₂ y MeDDTC-

SO₂ producen inactivación total de la enzima en un tiempo inferior a las 2 h de la incubación, mientras que MeDTCSO y MeDDTCSO requieren de 21 a 24 h para que produzcan la inactivación total (Figura 12), por lo que las medidas se realizaron tras dos h de incubación en el primer grupo y tras 24 h en el segundo.

La fluorescencia intrínseca sólo se afectó significativamente en la enzima modificada con DSF. La disminución de la intensidad máxima de fluorescencia observada en este último caso podría deberse a la cercanía de uno de los etilos del tiocarbamato del disulfuro mixto con el W161 indicado por el modelo computacional (Figura 15). En cuanto a la fluorescencia extrínseca, los cambios más importantes se observaron en la enzima modificada con MeDTC-SO₂ o MeDDTC-SO₂. En ambos casos hubo una disminución significativa de la fluorescencia máxima de emisión del ANS sin que cambie la longitud de onda de máxima emisión, lo que sugiere que en la proteína modificada hay menos cavidades hidrofóbicas accesibles al ANS que en la no modificada. Esta observación sugiere cambios conformacionales en la enzima provocados por la modificación química de la cisteína catalítica con estos dos reactivos.

Tabla 2. Intensidad de fluorescencia intrínseca^a y extrínseca^b de la PaBADH modificada^c con DSF o sus metabolitos

| Compuesto | Intensidad de fluorescencia máxima | |
|------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| | Intrínseca ^a | Extrínseca ^b |
| E no tratada | 61.0 (100) ^c | 54.9 (100) |
| DSF | 43.6 (72) | 50.9 (93) |
| MeDDTC-SO | 53.6 (88) | 31.7 (58) |
| MeDDTC-SO ₂ | 48.6 (80) | 25.8 (47) |
| MeDTC-SO | 62.0 (102) | 46.5 (85) |
| MeDTC-SO ₂ | 58.4 (96) | 13.0 (24) |

^aLa excitación de los triptófanos se realizó a una λ de 296 nm y se registró su intensidad de fluorescencia de emisión a una λ_{\max} de 340 nm (unidades arbitrarias).

^bEl fluoróforo ANS se excitó a 370 nm y se registró su intensidad de fluorescencia de emisión a una λ_{\max} de 482 nm. ^cEntre paréntesis se indica el porcentaje de la emisión con respecto a la de la enzima no tratada. Las muestras de PaBADH (0.3 mg/mL) se trataron a 25 °C con los diferentes reactivos hasta la pérdida total de actividad.

VII.1.2.3. Efecto del DSF y sus metabolitos sobre la estructura secundaria de la PaBADH

Los posibles cambios en estructura secundaria debidos a la modificación de la enzima con DSF o sus metabolitos se exploraron mediante DC en el UV lejano. Los espectros de DC de la PaBADH modificada resultaron ser prácticamente idénticos a los de la enzima no tratada. Es decir, ni el DSF ni sus metabolitos producen un cambio en la estructura secundaria cuando la enzima es tratada con estos a 25 °C (Figura 16).

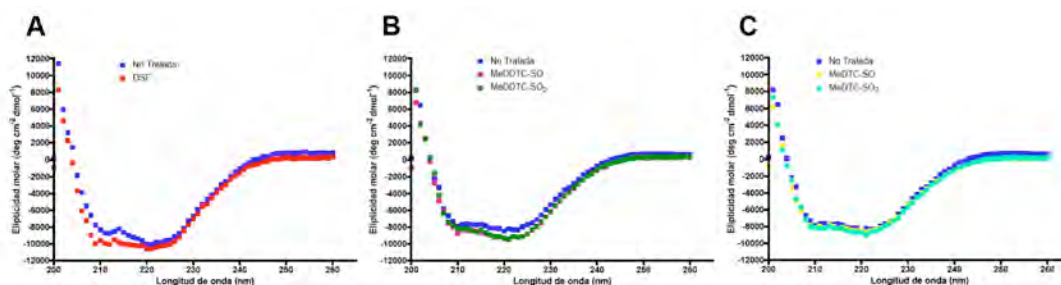


Figura 16. Espectros de DC de la PaBADH no modificada y modificada con DSF y sus metabolitos. La modificación de la enzima (0.3 mg/mL) se efectuó a 25 °C como está descrito en Materiales y métodos. La concentración de enzima, después de eliminar el exceso de reactivo, fue de 0.28 mg/mL. Los espectros de DC de las muestras de enzima modificadas con DSF (A), con MeDDTC-SO/MeDDTC-SO₂ (B) o con MeDTC-SO/MeDTC-SO₂ (C), se compararon con el espectro de DC de una muestra de enzima no modificada tratada bajo las mismas condiciones. Resultados no publicados.

VII.1.2.4. Efecto del DSF y sus metabolitos sobre la estabilidad térmica de la PaBADH

En la Figura 17 se muestran los termogramas obtenidos con la enzima no tratada y tratada con DSF o sus metabolitos y en la Tabla 3 se dan los valores de la temperatura media de desnaturalización térmica (T_m), la cual es un valor aparente debido a que el proceso de desnaturalización por calor no fue reversible, y el grado de cooperatividad del proceso de desnaturalización térmica, medido por el valor de la pendiente de la sigmoide en el punto de inflexión. Ambos valores se obtuvieron siguiendo los cambios en la señal de DC a 222 nm inducidos por el incremento de la temperatura.

La modificación química de la PaBADH con DSF disminuyó la T_m aparente de la enzima ~ 3 °C aunque la enzima comienza a desnaturalizarse alrededor de los 35 °C, unos 22 °C por debajo de la temperatura a la que empieza a observarse la desnaturalización en la enzima no tratada (Figura 17A). Las muestras de enzima tratadas con cada uno de los metabolitos del DSF, con excepción de la MeDTC-SO₂, mostraron una T_m aparente similar a la de la enzima no modificada (Figura 17B y C; Tabla 3).

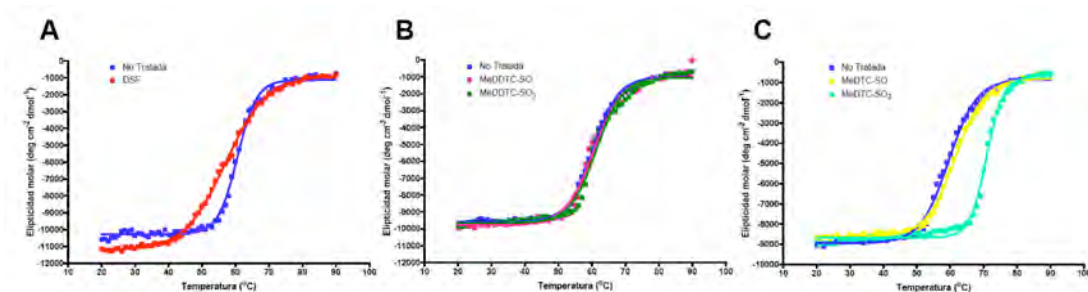


Figura 17. Desnaturalización térmica de la PaBADH modificada con DSF y sus metabolitos.

La modificación de la enzima (0.3 mg/mL) se efectuó a 25 °C con DSF (A), con MeDDTC-SO/MeDDTC-SO₂ (B) o con MeDTC-SO/MeDTC-SO₂ (C), como está descrito en Materiales y métodos. La concentración de enzima, después de eliminar el exceso de reactivo, fue de 0.28 mg/mL. Los termogramas se obtuvieron midiendo la señal de DC a 222 nm durante el calentamiento de las muestras de enzima previamente modificadas y se compararon con el termograma de una muestra de enzima no modificada tratada bajo las mismas condiciones. Resultados no publicados.

Tabla 3. Temperatura media de desnaturalización térmica de la PaBADH modificada con DSF o sus metabolitos

| Compuesto ^a | T_m aparente (°C) | ΔT_m ^b |
|------------------------|---------------------|---------------------------|
| No tratada | 59.6 ± 0.1 | 0 |
| DSF | 57.0 ± 0.1 | -2.6 |
| MeDDTC-SO | 60.6 ± 0.2 | 1 |
| MeDDTC-SO ₂ | 61.3 ± 0.2 | 1.7 |
| MeDTC-SO | 61.6 ± 0.1 | 2 |
| MeDTC-SO ₂ | 70.9 ± 0.1 | 11.3 |

^aLas muestras se trataron a 25 °C con los diferentes reactivos hasta la pérdida total de actividad, después se obtuvieron los termogramas de desnaturalización térmica midiendo la señal de DC a 222 nm durante el calentamiento de las muestras. Los valores de T_m aparentes se obtuvieron por ajuste de los datos experimentales a la ecuación sigmoideal de Boltzmann. ^bDiferencia de T_m aparente de las muestras, medida como la diferencia de la T_m aparente de la muestra de enzima modificada y la T_m aparente de la muestra de enzima sin tratar; el valor negativo indica menos estabilidad.

Sorprendentemente, la enzima modificada con la MeDTC-SO₂ mostró una T_m aparente 13.9 °C mayor que la de la enzima no modificada. Por tanto, la modificación con este último reactivo le confiere a la enzima una gran estabilidad, como lo indica la alta T_m aparente (70.9 °C) como la gran cooperatividad del proceso de desnaturalización térmica (Figura 17C y Tabla 3). Esto podría deberse a la interacción del oxígeno carbonílico del aducto con los grupos que forman el hoyo del oxianión, el nitrógeno de la C286 y el nitrógeno del grupo amida de la N153, que son los que estabilizan a los intermediarios tiohemiacetal y tioéster del mecanismo catalítico (Steinmetz *et al.*, 1997; Figura 18). Puesto que este aducto de *S*-cisteín-*N,N*-dietil-tiocarbamoilo es un análogo del intermediario tioéster en la reacción catalizada por la PaBADH, es probable que el intermediario tioéster también estabilice a la enzima durante la catálisis.

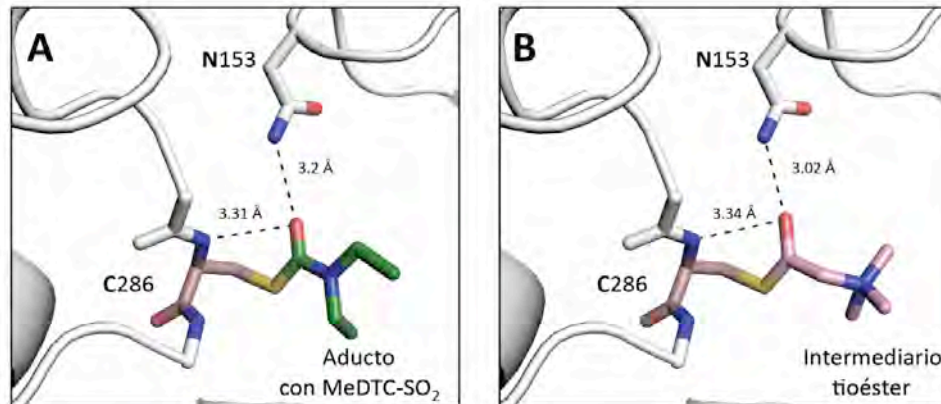


Figura 18. Modelos del sitio activo de la PaBADH mostrando el aducto de la C286 con la MeDTC-SO₂ (A) y el intermediario tioéster formado en la reacción con betaína aldehído (B). Las cadenas laterales de los residuos C286 y N153 se muestran como bastones (rojo, oxígeno; azul, nitrógeno y amarillo, azufre). Las distancias están dadas en ångströms y se muestran como líneas punteadas de color negro. El modelo se construyó dentro del sitio activo de la PaBADH usando como templado las coordenadas cristalográficas de la enzima acomplejada con NADP⁺ (código de acceso pdb 2wme). Los valores se calcularon utilizando el programa PyMol (DeLano, 2002).

VII.2. Efectos de la modificación química de la PaBADH *in situ*

Los resultados que se describen en este apartado forman parte de los artículos publicados: Zaldívar-Machorro *et al.*, 2007; Zaldívar-Machorro *et al.*, 2011. (Anexos 2 y 3, respectivamente).

VII.2.1. Inactivación *in situ* de la PaBADH por DSF y sus metabolitos

La irreversibilidad de la modificación de la PaBADH por los metabolitos del DSF, aunada a la falta de protección del NADP⁺ contra esta modificación, fue un importante hallazgo que nos animó a estudiar el efecto de estos reactivos en células de *P. aeruginosa* con el propósito de explorar el uso potencial de estos reactivos como agentes antimicrobianos. Por lo tanto, investigamos la capacidad del DSF y sus metabolitos para inactivar a la PaBADH en células de *P. aeruginosa* crecidas en un medio de cultivo líquido, como se describe en Materiales y métodos. En estos experimentos los diferentes medios de cultivo contenían 20 mM de colina, ya que este compuesto es requerido para la expresión de BADH en células de *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976; Velasco-García *et al.*, 2006a). En el medio mínimo M9C, los metabolitos del DSF, con excepción del DDC, MeDDTC-SO₂ y del mismo DSF, fueron capaces de disminuir la actividad de la PaBADH, aunque en diferente grado. (Figura 19A). La actividad enzimática no pudo recuperarse por la adición de 20 mM de 2-mercaptoetanol al extracto libre de células (resultado no mostrado). Ninguno de estos metabolitos afectaron el contenido intracelular de la proteína PaBADH, determinado en forma relativa por Western blot (Figura 19A, parte inferior). Las cinéticas de inactivación *in situ* de la PaBADH por el MeDDTC-SO y la MeDTC-SO₂ fueron de pseudo-primer orden (Figura 19B) con constantes de inactivación de 0.020 (± 0.002) min⁻¹ para la MeDTC-SO₂ y 0.009 (± 0.001) min⁻¹ para el MeDDTC-SO, correspondientes a los tiempos medios de inactivación de 0.6 y 1.3 h, respectivamente. Estas constantes de inactivación determinadas *in situ* son similares a las determinadas *in vitro* a la misma concentración de reactivos: 0.053 (± 0.003) min⁻¹ para la MeDTC-SO₂ y 0.009 (± 0.001) min⁻¹ para el MeDDTC-SO, lo que sugiere que no existen restricciones en el transporte de estos compuestos al interior de las células bacterianas.

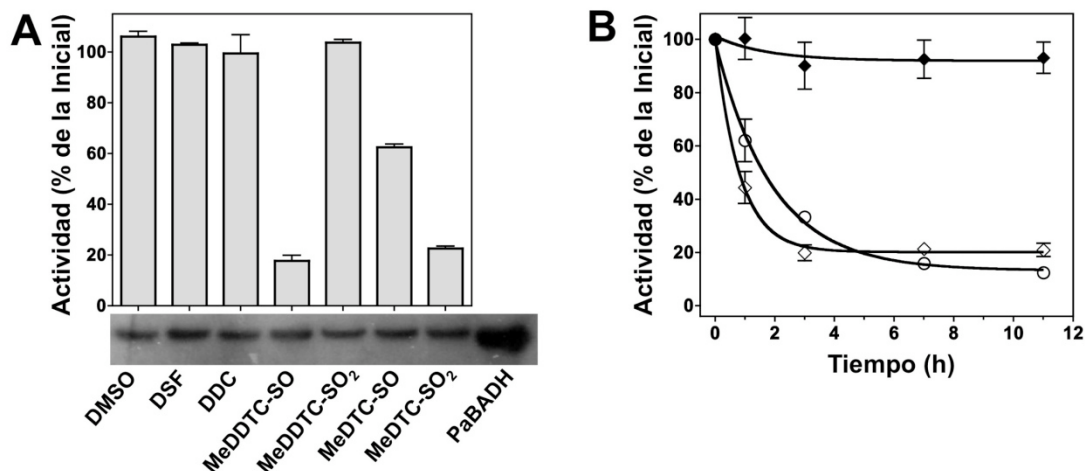


Figura 19. Inactivación *in situ* de la PaBADH por DSF y sus metabolitos. A) A muestras de una suspensión de células de *P. aeruginosa* crecidas a 37 °C en medio M9C (hasta alcanzar una 0.6 DO₆₀₀) se les adicionó una concentración final de 50 μM de DSF o sus metabolitos. Después de 7 h de incubación, las células se cosecharon, se lavaron para eliminar el inhibidor, se sonicaron y se midió la actividad residual de PaBADH en los extractos libres de células (expresada como porcentaje de la actividad medida en células a las que se les adicionó DMSO en vez del reactivo que fue de 587 mU/mg de proteína). También se muestra el contenido de proteína PaBADH de los extractos libres de células estimado por Western-blot (parte inferior del panel A). La misma cantidad de proteína soluble (40 μg) se cargó en todos los carriles, excepto en el carril marcado como PaBADH que corresponde a la enzima pura (2.5 μg). La cantidad de proteína cargada se confirmó por densitometría de un gel de SDS-PAGE, corrido en paralelo al gel que se transfirió a la membrana del inmunoblot, teñido con Azul de Coomassie. B) Cursos temporales de inactivación de la PaBADH *in situ* por incubación de células de *P. aeruginosa*, crecidas en medio M9C a 37 °C, con 50 μM de MeDTC-SO₂ (rombos abiertos) o 50 μM de MeDDTC-SO (círculos abiertos). No se observaron cambios significativos en la actividad de la enzima en células tratadas únicamente con DMSO (rombos cerrados). Los datos mostrados son el promedio ± D.S. (mostrada como barras) de tres experimentos independientes.

VII.2.2. Efecto del DSF y sus metabolitos sobre el crecimiento *in vitro* de *P. aeruginosa*

La actividad antimicrobiana del DSF y sus metabolitos se ensayó en primer lugar usando el método de difusión de disco sobre placas de agar a 37 °C en medio M9C, como está descrito en Materiales y métodos. En las cajas que contenían los discos con DMSO o

DSF no se observó inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa*, pero sí en las que contenían los discos con los metabolitos del DSF, siendo la MeDTC-SO₂ y el MeDDTC-SO los inhibidores más potentes (Figura 20), lo cual concuerda con los experimentos de inhibición *in situ* de la PaBADH. En medio líquido M9C, bajo las mismas condiciones experimentales en las que se observó la inactivación *in situ* de la enzima, sólo la MeDTC-SO₂ y el MeDDTC-SO detuvieron el crecimiento de *P. aeruginosa*; el DSF y los otros metabolitos del DSF no tuvieron un efecto significativo (Figura 21A).

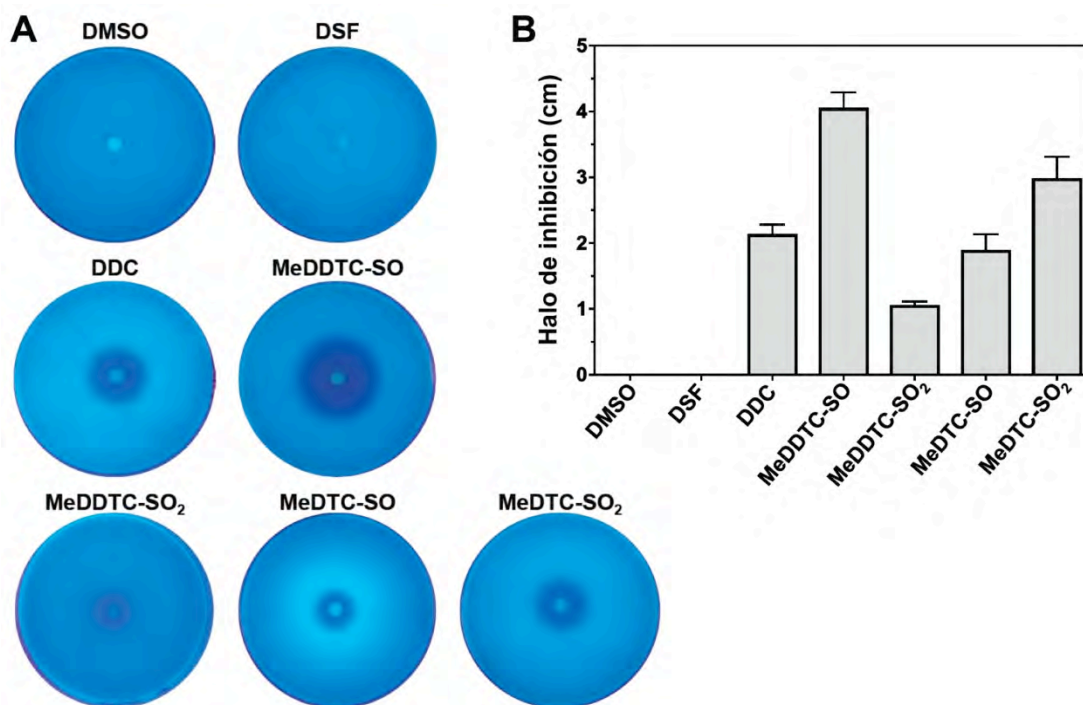


Figura 20. Inhibición del crecimiento células de *P. aeruginosa* por DSF y sus metabolitos en agar M9C. **A)** Discos de papel filtro impregnados con DMSO o 5 μ moles (disueltos en DMSO) de los reactivos se colocaron sobre cajas de agar M9C previamente inoculados con 100 μ L de una suspensión de bacterias (0.1 a una DO₆₀₀). La imagen muestra el resultado representativo de tres repeticiones. **B)** Diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano de las cajas del panel A después de 18 h de incubación a 37 °C. Los datos mostrados son el promedio \pm D.S. (mostrada como barras) de tres experimentos independientes.

Como ya mencionamos en el capítulo de Antecedentes, en 1991 Phillips y colaboradores encontraron que el DSF podía usarse como un agente antibacterial contra

S. aureus, aunque no se determinó su mecanismo de acción. Sin embargo, cuando el DSF se probó como agente antibacterial contra *P. aeruginosa* encontraron que este reactivo no es efectivo para detener el crecimiento de la bacteria (Phillips *et al.*, 1991), lo que hemos confirmado en este estudio (Figura 21A). En contraste con su efectividad *in vitro* como un inhibidor de la PaBADH pura, el DSF fue incapaz de modificar intracelularmente a la enzima, lo que podría deberse a su rápida eliminación ya sea por ser convertido a DDC por reducción del disulfuro (en cuyo caso habría que postular una incapacidad de las células bacterianas de metabolizar el DDC hasta algunos de los metabolitos del DSF más reactivos), o por formar disulfuros mixtos con tioles intracelulares no esenciales para el crecimiento bacteriano.

También se observaron diferencias importantes en los efectos de la MeDDTC-SO₂ como un inhibidor *in vitro* de la PaBADH y como un inhibidor *in situ* de la enzima y del crecimiento bacteriano. La MeDDTC-SO₂ es *in vitro* el inhibidor más potente de la PaBADH pero no inhibe a la enzima dentro de las células de *P. aeruginosa*, ni afecta el crecimiento bacteriano. Como discutíamos en el caso del DSF, estas diferencias pueden deberse a que la concentración intracelular efectiva de este reactivo sea muy baja, debido probablemente a su alta reactividad hacia tioles intracelulares (tales como el reductor fisiológico glutation), más bien que a su incapacidad para ingresar al interior de las células bacterianas. La similitud en las cinéticas de inactivación *in vitro* e *in situ* por el MeDDTC-SO y la MeDTC-SO₂ es una prueba indirecta de la toma sin restricción de estos compuestos por parte de las células bacterianas y se puede suponer que esto puede aplicarse a compuestos químicamente análogos como lo es la MeDDTC-SO₂. La alta reactividad hacia grupos tioles de esta sulfona probablemente resulta en su rápida eliminación por agentes reductores intracelulares o grupos tiol no esenciales. Por el contrario, el MeDTC-SO (el menos reactivo de todos los metabolitos del DSF hacia la PaBADH *in vitro*) mostró un efecto inhibitorio, aunque pequeño, tanto sobre la actividad enzimática intracelular como sobre el crecimiento bacteriano. Pareciera que la baja reactividad del MeDTC-SO resulta en una vida media dentro de las células mayor que la del compuesto más reactivo. Una explicación similar fue dada por Mays y colaboradores (1996) quienes encontraron que el MeDTC-SO es un inhibidor de la ALDH2 diez veces más potente que la MeDTC-SO₂ en experimentos en los que se usan mitocondrias

intactas, aunque *in vitro* este último compuesto es más reactivo que el primero. El inhibidor de la PaBADH más efectivo *in vivo* no sería, por lo tanto, el compuesto más reactivo hacia la enzima *in vitro*, ya que éste sería fácilmente eliminado por tioles de bajo peso molecular que sirven como protectores intracelulares. Así, compuestos con una reactividad lo suficientemente baja para escapar de la eliminación por las defensas celulares, pero con una reactividad lo suficientemente alta para modificar tioles altamente reactivos dentro de los sitios activos de ciertas enzimas, tales como el de la cisteína catalítica de las ALDHs, serán los inhibidores más efectivos. Nuestros resultados indican que dos de los metabolitos del DSF, la MeDTC-SO₂ y el MeDDTC-SO, cumplen con estos requisitos.

Dados estos resultados, nos concentramos en evaluar el efecto de la MeDTC-SO₂ y del MeDDTC-SO sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* en diferentes medios de cultivo líquidos. En células que se crecieron previamente en un medio rico (Luria-Bertani; LB) y que se transfirieron luego al medio mínimo M9C, el crecimiento se detuvo completamente cuando al medio se le adicionó 50 µM de MeDTC-SO₂ después de que se alcanzara una DO₆₀₀ de 0.1. Sin embargo, el crecimiento bacteriano se reanudó después de 20 h de incubación. Una dosis adicional de 50 µM de MeDTC-SO₂ a las 18 h de incubación retardó la iniciación del crecimiento por otras 12 h (Figura 21B). Cuando se adicionaron repetidas dosis de 50 µM de MeDTC-SO₂ o de MeDDTC-SO, cada 8 h durante la incubación, el crecimiento bacteriano se detuvo por más de 70 h (Figura 21C). Resultados similares se obtuvieron en células crecidas en medio M9 y transferidas luego a M9C (Figura 21D), aunque la fase de retraso del crecimiento de las células, a las que se adicionó DMSO en vez de reactivo, fue significativamente más grande que la de las células provenientes de un medio rico.

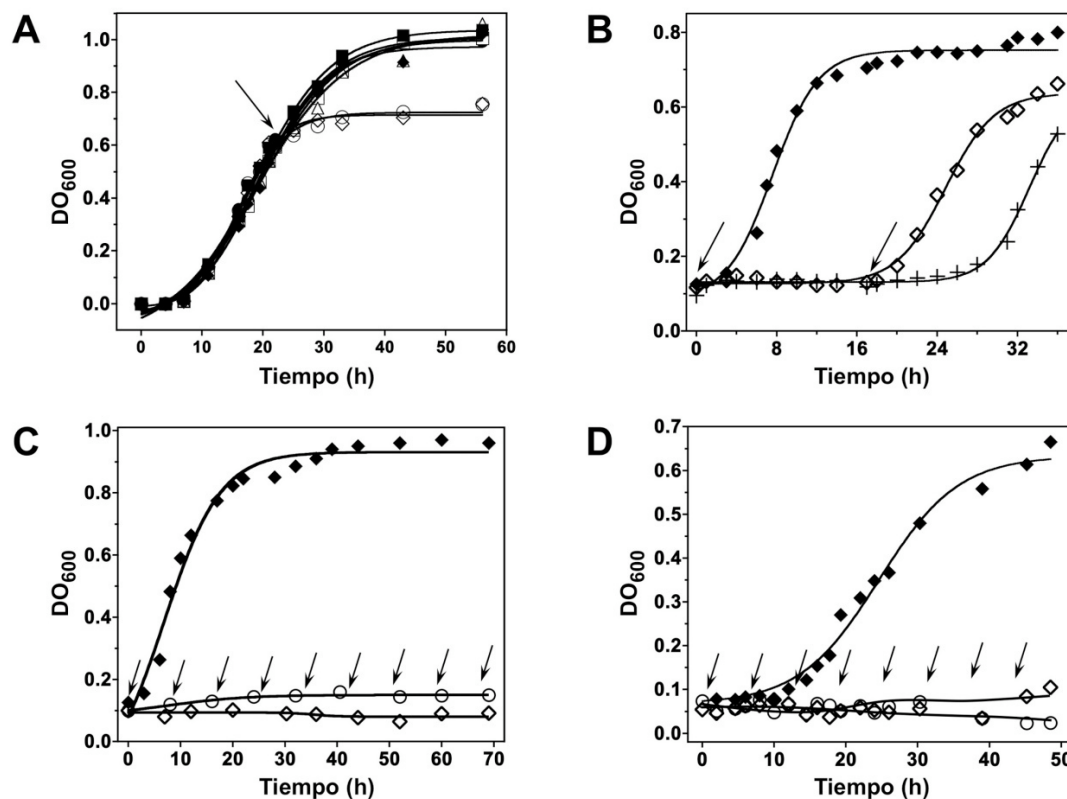


Figura 21. Efecto del MeDDTC-SO y de la MeDTC SO₂ sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* en medio líquido M9C. **A)** Una sola dosis de 50 µM de DSF (●) o DDC (□), MeDDTC-SO (○), MeDDTC-SO₂ (△), MeDTC-SO (■), y MeDTC-SO₂ (◇) fue agregada cuando las células alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,6. **(B y C)** Las células fueron cultivadas en medio nutritivo LB y luego transferidas al medio M9C. Una sola dosis de 50 µM MeDTC-SO₂ (◇) se añadió al medio de cultivo cuando la DO₆₀₀ fue de 0,1. En **(B)** una segunda dosis se añadió después de 18 h (+). En **(C)** dosis repetidas de 50 µM de MeDTC-SO₂ (◇) o de MeDDTC-SO (○) se adicionaron cada 8 h. **D)** Las células fueron cultivadas en medio M9 y luego transferidas al medio M9C. Dosis repetidas de 50 µM de MeDTC-SO₂ (◇) o de MeDDTC-SO (○) se agregaron al medio de cultivo cada 8 h como en (C). El DMSO (◆) se añadió a las células no tratadas con los metabolitos del DSF a la misma hora que los reactivos se adicionaron a las células tratadas. Las flechas indican el momento de las adiciones.

Si la inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* por MeDTC-SO₂ o por MeDDTC-SO es causada por la inhibición de la PaBADH, estos compuestos no tendrían

efecto alguno sobre células crecidas en medio M9 (que sólo contiene glucosa como fuente de carbono), ya que la síntesis de PaBADH requiere de la presencia de colina en el medio de cultivo (Nagasawa *et al.*, 1976; Velasco-García *et al.*, 2006a). Esto fue lo que se observó experimentalmente (Figura 22A), consistente con los niveles muy bajos de actividad de la PaBADH encontrados en estas células (14 mU/mg de proteína) comparado con los niveles de actividad encontrados en células en medio M9C (660 mU/mg de proteína). Pero, contrario a lo que esperábamos encontrar, la MeDTC-SO₂ y el MeDDTC-SO no inhibieron el crecimiento bacteriano de células crecidas en medio M9+C (el cual contiene colina además de glucosa) a pesar de que las células poseían una actividad significativa de PaBADH (225 mU/mg de proteína), si bien ésta era más baja que la observada en células crecidas en medio M9C (Figura 22B). Las diferencias observadas entre los dos medios en el grado de inhibición del crecimiento por estos reactivos puede deberse a la menor inducción en el medio M9+C que en el medio M9C del operón *betB*, el cual también incluye a la colina deshidrogenasa que cataliza la formación del sustrato betaína aldehído y que al estar menos expresada produciría una acumulación menor de este compuesto tóxico. La inhibición del crecimiento bacteriano por la MeDTC-SO₂ o por el MeDDTC-SO sí se observó en el medio M9+C más 700 mM de NaCl (Figura 22C). A pesar de que las actividades de la PaBADH en células de crecidas en M9+C más 700 mM de NaCl fueron similares a las crecidas en medio M9+C (alrededor de 225 mU/mg de proteína en ambos casos), la división celular en este último es muy rápida, más rápida que la cinética de inactivación de la enzima, resultando en la dilución de la betaína aldehído producida por la inhibición de la PaBADH. En el medio M9+C más NaCl la lenta división celular probablemente permite la acumulación del aldehído dentro de las células bacterianas resultando en la inhibición del crecimiento bacteriano. Por lo tanto, la habilidad de la MeDTC-SO₂ y del MeDDTC-SO para detener el crecimiento de *P. aeruginosa* no sólo depende de la presencia de colina en el medio de cultivo, que es necesaria para inducir la expresión de la proteína PaBADH, sino también de la velocidad de crecimiento de las células bacterianas.

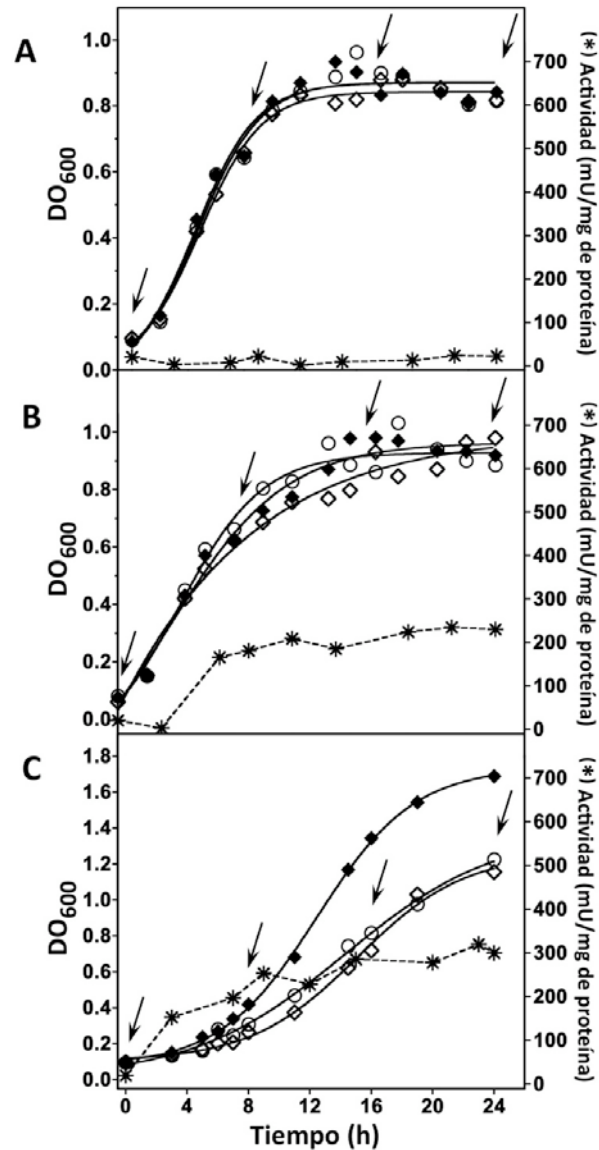


Figura 22. Efecto del MeDDTC-SO o de la MeDTC-SO₂ sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* en los medios líquidos M9 y M9+C. Células de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* se cultivaron en medio líquido M9 y luego se transfirieron a M9 (A), M9+C (B), o M9+C más 700 mM de NaCl (C). A los medios de cultivo se agregaron dosis repetidas de 50 μ M de MeDTC-SO₂ (\diamond) o de MeDDTC-SO (\circ) cada 8 h. El DMSO se añadió a las células sólo como vehículo de los reactivos (\blacklozenge) al mismo tiempo que los reactivos se adicionaron a las células tratadas. El crecimiento bacteriano se siguió midiendo la DO₆₀₀. También se muestran en los paneles A, B y C los niveles de expresión de la PaBADH, medidos por los cambios en la actividad de la enzima durante la incubación en los tres medios de cultivo en ausencia del reactivo (—*—).

Nuestros hallazgos de que el MeDDTC-SO y la MeDTC-SO₂ no pueden detener el crecimiento de la bacteria en un medio en el que está ausente la colina, ya que la actividad de PaBADH de las células es muy baja, ni cuando la velocidad de crecimiento es mayor a la velocidad de inactivación enzimática causada por estos compuestos son consistentes con: (i) que la PaBADH es el blanco intracelular más importante de la MeDTC-SO₂ y del MeDDTC-SO, e (ii) que la acumulación del compuesto tóxico, betaína aldehído, es el mecanismo más probable por el cual se produce la inhibición del crecimiento. Es muy posible que la MeDTC-SO₂ y el MeDDTC-SO (así como los otros metabolitos del DSF) puedan modificar otros tioles proteicos o reductores intracelulares. Pero si lo hacen, parece que estas modificaciones no tienen consecuencias importantes para el crecimiento bacteriano.

Por otra parte, resulta interesante que la composición del medio M9+C más sal es similar a las condiciones que existen en los sitios infectados por *P. aeruginosa* en humanos (Kilbourn, 1978), sugiriendo que la inhibición de la PaBADH *in vivo* por la MeDTC-SO₂ y/o el MeDDTC-SO (ya sea por administración directa o por su formación después de la administración del DSF que podría así tener un nuevo uso terapéutico) puede ser de ayuda en el combate de las infecciones por este importante patógeno. Sin embargo, claramente se necesita una evaluación de estos compuestos más allá de pruebas *in vitro* o *in situ*, ya sea usando modelos animales o en pruebas clínicas.

VII.2.3. Determinación de la MIC de MeDDTC-SO y de MeDTC-SO₂ para *P. aeruginosa*

Tanto la MeDTC-SO₂ como el MeDDTC-SO fueron capaces de inactivar intracelularmente a la PaBADH y de detener el crecimiento de *P. aeruginosa* cuando la bacteria está creciendo en un medio que contiene colina en el que las células exhiben una significativa actividad de PaBADH (Figura 22B y C). Por esta razón decidimos determinar el MIC para estos compuestos en los siguientes medios de cultivo: M9C, M9+C, MH+C con y sin NaCl 700 mM (Tabla 4).

Tabla 4. Determinación del MIC para el MeDDTC-SO y la MeDTC-SO₂ en *P. aeruginosa* por el método de dilución en tubo.

| Medio de cultivo ^a | MIC (μM) | | | |
|-------------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|------------|
| | MeDDTC-SO | | MeDTC-SO ₂ | |
| | - NaCl | + NaCl | - NaCl | + NaCl |
| M9C | 89 (16) ^b | 89 (16) | 290 (52) | 145 (26) |
| M9+C | 290 (52) | 145 (26) | 390 (70) | 200 (36) |
| MH+C ^c | ND | 2790 (499) ^d | ND | 4560 (816) |

^a Todos los medios de cultivo contenían 20 mM de colina ya que este compuesto es necesario para la expresión de la PaBADH. Las muestras se incubaron a 37 °C y las lecturas se determinaron por observación visual cada 2 horas hasta observar un claro crecimiento. ^b Entre paréntesis se dan los valores MIC en μg mL⁻¹. ^c En este medio la bacteria se encuentra creciendo a una velocidad muy rápida por lo que no se puede determinar el MIC sin la adición de sal, que hace más lento el crecimiento bacteriano. ^d Este valor de MIC se determinó a las 16 h de incubación debido al rápido crecimiento bacteriano. ND: no determinado.

Bajo las condiciones experimentales en las que los probamos, tanto la MeDTC-SO₂ como el MeDDTC-SO son eficaces antimicrobianos a concentraciones demasiado altas (Tabla 4), por lo que no podrían funcionar como fármacos. Pero sí podrían usarse como compuestos modelo a partir de los cuales se desarrollen compuestos más específicos que puedan ser efectivos a concentraciones mucho más bajas. No son deseables compuestos más reactivos, porque serían destruidos rápidamente por las defensas celulares (como es el caso de la MeDDTC-SO₂) o podrían producir efectos adversos en el hospedero, sino más específicos para la PaBADH. Para diseñar estos compuestos se necesita conocer mejor los determinantes estructurales de la especificidad de la PaBADH por el sustrato aldehído.

Con el propósito de diseñar un inhibidor de la PaBADH que sea específico para ésta, se comenzó a investigar la especificidad que la PaBADH tiene por el sustrato aldehído, y para ello se realizaron cinéticas de saturación de la enzima con los siguientes

ω -aminoaldehídos: betaína aldehído (BA), γ -aminobutiraldehído (γ -AB) y γ -trimetil-aminobutiraldehído (γ -TMAB) a una concentración fija saturante de NAD^+ (Figura 23). Los valores de los parámetros cinéticos se incluyen en la Tabla 5. Aunque la enzima une mejor al γ -AB y al γ -TMAB que a la BA, a juzgar por los valores de K_M observados, la V_{\max} para la BA es 180 y 85 veces más alta que la V_{\max} para el γ -AB y el γ -TMAB respectivamente. Por tanto, el orden de preferencia de la enzima por los sustratos probados, medida por el valor de V_{\max}/K_M , fue: $\text{BA} > \gamma\text{-AB} > \gamma\text{-TMAB}$ (Tabla 5). Éste es por tanto un caso interesante en que la enzima discrimina a sus sustratos posibles más que por la afinidad, por la catálisis. Las razones de esto no las conocemos por el momento.

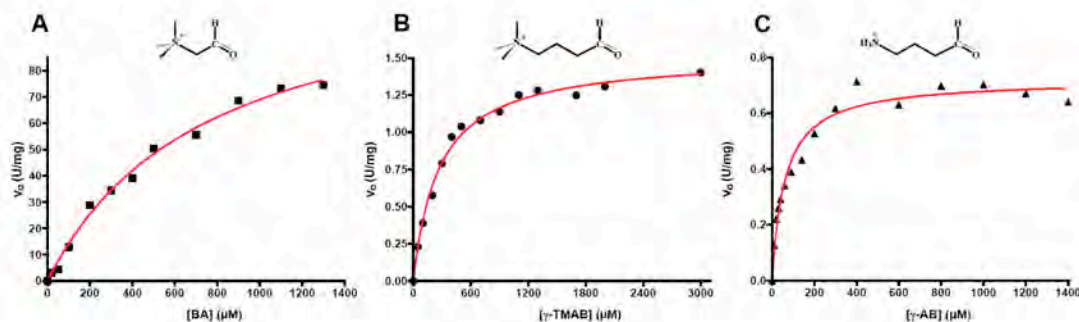


Figura 23. Cinéticas de saturación de la PaBADH con distintos ω -aminoaldehídos. Los ensayos de actividad de la enzima se realizaron como está descrito en Materiales y métodos. **A)** Betaína aldehído, **(B)** γ -trimetil-aminobutiraldehído, **(C)** γ -aminobutiraldehído. En todos los ensayos de actividad se utilizó una concentración fija de NAD^+ de 0.5 mM. Resultados no publicados.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de la PaBADH por el sustrato ω -aminoaldehído

| Aldehído | K_M^a (μM) | V_{\max}^a (U mg^{-1}) | V_{\max}/K_M | $\frac{(V_{\max}/K_M)_{\text{BA}}}{(V_{\max}/K_M)_{\text{aldehído}}}$ |
|----------------|------------------------------|--|----------------------|---|
| BA | 751.5 | 128.4 | 1.6×10^{-1} | 1 |
| γ -TMAB | 271.7 | 1.5 | 5.5×10^{-3} | 29 |
| γ -AB | 61.7 | 0.7 | 1×10^{-2} | 16 |

^aLos parámetros cinéticos se obtuvieron ajustando los datos experimentales a la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten. Cociente de la constante de especificidad del sustrato BA entre la constante de especificidad para cada aldehído. La enzima prefiere 16 y 29 veces menos al γ -AB y γ -TMAB, respectivamente, con respecto al BA.

VIII. Conclusiones

El análisis de los resultados de los estudios realizados en este trabajo de tesis de doctorado nos permiten concluir que:

1. La inactivación *in vitro* de la enzima por DSF puede revertirse por el tratamiento de la enzima modificada con DTT, lo que confirma que se debe a la formación de un disulfuro mixto entre este reactivo y la cisteína catalítica. Sin embargo no se revierte por el reductor fisiológico glutation, probablemente porque el tamaño de este compuesto le impide el acceso al disulfuro que debe atacar.
2. La modificación *in vitro* de la PaBADH con DSF a 23 °C produce su disociación en monómeros. El modelo computacional del sitio activo con el disulfuro mixto resultado de la modificación química indica que estos efectos estructurales se deben a que el grupo que se adiciona a la cisteína catalítica provoca choques estéricos con residuos del sitio activo, lo que probablemente lleva a cambios en la interfaz monómero-monómero que causan la disociación parcial de la proteína.
3. La alteración estructural provocada por la modificación con DSF se refleja en la formación de grandes agregados de la proteína modificada a 37 °C.
4. Los metabolitos del DSF, con la excepción del DDC, inactivan *in vitro* a la PaBADH con una velocidad de inactivación que depende de su reactividad intrínseca, siendo las sulfonas más reactivas que los sulfóxidos.
5. Las coenzimas NAD(P)⁺ no afectan la velocidad de inactivación de la PaBADH ni DSF ni por sus metabolitos, por lo que la inactivación puede darse *in vivo* aun cuando la enzima tenga unida a alguna de las coenzimas.
6. La inactivación con los metabolitos del DSF, MeDDTC-SO, MeDTC-SO, MeDDTC-SO₂ y MeDTC-SO₂, no puede revertirse por DTT, lo que apoya el que forman aductos de *S*-cisteinil-*N,N*-dietil-(di)tiocarbamoilo.
7. La inactivación de la PaBADH por los metabolitos del DSF se debe a su reacción con la cisteína catalítica y no a cambios en la estructura cuaternaria de la enzima modificada, lo cual es consistente con el menor tamaño del grupo que adicionan.

- De acuerdo con esto, los modelos computacionales indican que hay suficiente espacio en el sitio activo para acomodar a estos grupos.
8. Ninguno de los metabolitos del DSF disminuye la estabilidad térmica de la enzima, lo que es consistente con que no producen alteraciones estructurales importantes en la enzima. Por el contrario, la modificación con MeDTC-SO₂ aumenta la T_m aparente del proceso de desnaturalización térmica cerca de 11 °C.
 9. El incremento en la estabilidad de la PaBADH que produce su modificación con la MeDTC-SO₂ podría deberse a los puentes de hidrógeno que el oxígeno del grupo tiocarbamato hace con el sitio activo de acuerdo al modelo computacional. Estas interacciones son las mismas que hacen los intermediarios tiohemiacetal y tioéster producidos durante el ciclo catalítico. Pareciera, por tanto, que la estabilización del sitio activo por medio de estos puentes de hidrógeno tiene un efecto muy importante sobre la estabilidad global de la enzima.
 10. Ni DSF ni MeDDTC-SO₂ inactivan a la PaBADH en el interior de la célula bacteriana, a pesar de ser los dos reactivos que inactivan más rápidamente a la enzima *in vitro*. Su incapacidad de inactivar *in situ* puede deberse a su alta reactividad hacia tioles, lo que les haría reaccionar con el glutatión y/o con tioles no esenciales para la bacteria con el resultado de que sus concentraciones intracelulares serían muy bajas. De acuerdo con esto, ambos reactivos no afectan el crecimiento de *P. aeruginosa* ni cuando la bacteria se crece en placa de agar ni en medio líquido.
 11. Sólo la MeDTC-SO₂ y el MeDDTC-SO inactivan a la PaBADH *in situ*, y la inactivación ocurre a una velocidad semejante a la que inactivan a la enzima *in vitro*, lo que indica que no hay impedimento para que penetren al interior de la célula bacteriana y que no son agotados por los tioles intracelulares, debido probablemente a su relativamente baja reactividad.
 12. La MeDTC-SO₂ y el MeDDTC-SO inhiben el crecimiento de la bacteria cuando ésta se encuentra creciendo en medios que contienen colina, pero no en medios que carecen de este inductor de la síntesis de la PaBADH, lo cual prueba que su blanco intracelular es esta enzima.

13. Además de la presencia de colina en el medio, la inhibición del crecimiento bacteriano requiere que la bacteria esté creciendo lentamente, como ocurre en presencia de una concentración alta de sal, lo que probablemente permite que la betaína aldehído se acumule hasta niveles tóxicos.
14. A pesar de que los valores MIC para la MeDTC-SO₂ y el MeDDTC-SO son más altos que los comúnmente aceptados para un buen compuesto antimicrobiano, su actividad antimicrobiana *in vivo*, es decir en un animal infectado, podría ser mayor, puesto que en los sitios de infección existen concentraciones altas de colina o sus precursores y condiciones hiperosmóticas, además de otras condiciones que probablemente hagan que la bacteria crezca más lentamente de lo que lo hace en un medio rico *in vitro*, lo que permitirá la acumulación de betaína aldehído.

Conclusión general

Se demuestra en este trabajo la hipótesis de que la enzima PaBADH es un blanco potencial de fármacos contra el patógeno humano *P. aeruginosa* y que reactivos que bloqueen específicamente la cisteína catalítica de la enzima son efectivos con este fin.

IX. Perspectivas

Hasta ahora hemos podido inactivar a la PaBADH con el MeDDTC-SO y la MeDTC-SO₂, tanto *in vitro* como *in situ* e inhibir el crecimiento bacteriano bajo condiciones de cultivo en el laboratorio. Sería interesante inactivar a esta enzima *in situ* en un sistema *in vivo*, es decir, dentro de la bacteria pero cuando ésta se encuentran infectando un organismo vivo. Esto último nos daría una idea del efecto que estos compuestos tienen sobre el crecimiento de la bacteria bajo condiciones de crecimiento fisiológicas, ya que el crecimiento de la bacteria dentro de un organismo, aún habiendo nutrientes en abundancia para ésta, pudiera ser más lento de lo que lo es en un medio de cultivo nutritivo de laboratorio y por lo tanto la eficacia de los metabolitos del DSF se incrementaría.

Por otro lado, con el propósito de diseñar un inhibidor de la PaBADH que sea específico para ésta, se realizaron estudios preliminares sobre la especificidad que la enzima PaBADH tiene por el sustrato aldehído, con los siguientes aldehídos: el γ -trimetilaminobutiraldehído, el γ -aminobutiraldehído, la betaína aldehído y el butiraldehído. Observamos que la enzima prefiere al sustrato betaína aldehído pero, sería conveniente que se completara este estudio ampliando el número de aldehídos a usar, ya que nuestro interés es encontrar un aldehído, además de la betaína aldehído, por el cual la enzima tenga una K_d baja, que nos sirva como modelo (además del MeDDTC-SO y la MeDTC-SO₂) para generar un reactivo que la enzima una lo mejor posible, y mejor aún, que produzca su agregación, esto último le produciría más daño a la célula bacteriana.

Además de completar el estudio de especificidad de la enzima por el sustrato aldehído, sería muy interesante diseñar un reactivo por el cual la enzima PaBADH tuviera una alta afinidad y cuya modificación sea irreversible como lo hace la MeDTC-SO₂. Así, esperaríamos que la potencia del nuevo compuesto sea muy alta con lo que se necesitarían dosis muy bajas para inhibir a la PaBADH de manera intracelular, y así, que el crecimiento de la bacteria, aún en condiciones de abundancia de nutrientes, sea abolido por la acumulación del intermediario metabólico tóxico betaína aldehído.

X. Bibliografía

- Ader, F., de Saint-Blanquat, G., and Derache, R. 1976. Variations in circulating bradykinin and its precursor during treatment with ethanol and disulfiram in the dog. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **283**: 1551-1554.
- Aendekerck, S., Ghysels, B., Cornelis, P., and Baysse, C. 2002. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* **148**: 2371-2381.
- Ahvazi, B., Coulombe, R., Delarge, M., Vedadi, M., Zhang, L., Meighen, E., and Vrieling, A. 2000. Crystal structure of the NADP⁺-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity. *Biochem J* **349 Pt 3**: 853-861.
- Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A., and Maier, R.M. 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3262-3268.
- Ambroziak, W. and Pietruszko, R. 1991. Human aldehyde dehydrogenase. Activity with aldehyde metabolites of monoamines, diamines, and polyamines. *J Biol Chem* **266**: 13011-13018.
- Angus, B.L., Carey, A.M., Caron, D.A., Kropinski, A.M., and Hancock, R.E. 1982. Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild-type with an antibiotic-supersusceptible mutant. *Antimicrob Agents Chemother* **21**: 299-309.
- Anson, M.L. 1940. The reactions of iodine and iodoacetamide with native egg albumin. *J Gen Physiol* **23**: 321-331.
- Arakawa, K., Takabe, T., Sugiyama, T., and Akazawa, T. 1987. Purification of betaine-aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. *J Biochem (Tokyo)* **101**: 1485-1488.
- Asboe, D., Gant, V., Aucken, H.M., Moore, D.A., Umasankar, S., Bingham, J.S., Kaufmann, M.E., and Pitt, T.L. 1998. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* strains in respiratory infection in AIDS patients. *AIDS* **12**: 1771-1775.

- Bains, J. and Boulanger, M.J. 2008. Structural and biochemical characterization of a novel aldehyde dehydrogenase encoded by the benzoate oxidation pathway in *Burkholderia xenovorans* LB400. *J Mol Biol* **379**: 597-608.
- Banno, M., Mizuno, T., Kato, H., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Wang, J., Kuno, R., Jin, S., Takeuchi, H., and Suzumura, A. 2005. The radical scavenger edaravone prevents oxidative neurotoxicity induced by peroxynitrite and activated microglia. *Neuropharmacology* **48**: 283-290.
- Bartels, D. 2001. Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? *Trends Plant Sci* **6**: 284-286.
- Bednar, R.A., Fried, W.B., Lock, Y.W., and Pramanik, B. 1989. Chemical modification of chalcone isomerase by mercurials and tetrathionate. Evidence for a single cysteine residue in the active site. *J Biol Chem* **264**: 14272-14276.
- Bergen, G.A. and Shelhamer, J.H. 1996. Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem. *Infect Dis Clin North Am* **10**: 297-325.
- Boch, J., Nau-Wagner, G., Kneip, S., and Bremer, E. 1997. Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch Microbiol* **168**: 282-289.
- Bodey, G.P., Bolivar, R., Fainstein, V., and Jadeja, L. 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* **5**: 279-313.
- 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.
- Bränden, C. and Tooze, J. 1991. *Introduction to protein structure*. Garland, New York.
- Brantsaeter, A.B. and Natas, O.B. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of urinary tract infections. *Tidsskr Nor Laegeforen* **114**: 572-574.
- Brien, J.F. and Loomis, C.W. 1985. Aldehyde dehydrogenase inhibitors as alcohol sensitizing drugs: a pharmacological perspective. *Trends Pharmacol. Sci.* **6**: 477-480.
- Caldwell, C.C., Chen, Y., Goetzmann, H.S., Hao, Y., Borchers, M.T., Hassett, D.J.,

- Young, L.R., Mavrodi, D., Thomashow, L., and Lau, G.W. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. *Am J Pathol* **175**: 2473-2488.
- Cen, D., Brayton, D., Shahandeh, B., Meyskens, F.L., Jr., and Farmer, P.J. 2004. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J Med Chem* **47**: 6914-6920.
- Chen, H., Xu, G., Zhao, Y., Tian, B., Lu, H., Yu, X., Xu, Z., Ying, N., Hu, S., and Hua, Y. 2008. A novel OxyR sensor and regulator of hydrogen peroxide stress with one cysteine residue in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One* **3**: e1602.
- Chen, L.L., Rosa, J.J., Turner, S., and Pepinsky, R.B. 1991. Production of multimeric forms of CD4 through a sugar-based cross-linking strategy. *J Biol Chem* **266**: 18237-18243.
- Chern, M.K. and Pietruszko, R. 1995. Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* **213**: 561-568.
- Chinn, P.C., Pigiet, V., and Fahey, R.C. 1986. Determination of thiol proteins using monobromobimane labeling and high-performance liquid chromatographic analysis: application to *Escherichia coli* thioredoxin. *Anal Biochem* **159**: 143-149.
- Cobby, J., Mayersohn, M., and Selliah, S. 1977a. Methyl diethyldithiocarbamate, a metabolite of disulfiram in man. *Life Sci* **21**: 937-942.
- Cobby, J., Mayersohn, M., and Selliah, S. 1977b. The rapid reduction of disulfiram in blood and plasma. *J Pharmacol Exp Ther* **202**: 724-731.
- Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, S., Branlant, G., and Aubry, A. 2000. Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J Mol Biol* **300**: 141-152.
- Collier, H.B. 1973. Letter: A note on the molar absorptivity of reduced Ellman's reagent, 3-carboxylato-4-nitrothiophenolate. *Anal Biochem* **56**: 310-311.
- Cornish-Bowden, A. and Cardenas, M.L. 2003. Metabolic analysis in drug design. *C R Biol* **326**: 509-515.

- D'Souza-Ault, M.R., Smith, L.T., and Smith, G.M. 1993. Roles of *N*-acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl Environ Microbiol* **59**: 473-478.
- Daly, T.J., Olson, J.S., and Matthews, K.S. 1986. Formation of mixed disulfide adducts at cysteine-281 of the lactose repressor protein affects operator and inducer binding parameters. *Biochemistry* **25**: 5468-5474.
- de Bentzmann, S., Roger, P., Dupuit, F., Bajolet-Laudinat, O., Fuchey, C., Plotkowski, M.C., and Puchelle, E. 1996. Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect Immun* **64**: 1582-1588.
- De Lancey Pulcini, E. 2001. Bacterial biofilms: a review of current research. *Nephrologie* **22**: 439-441.
- DeLano, W.L. 2002. The PyMol molecular graphics system on world wide web. <http://www.pymol.org>.
- Di Costanzo, L., Gómez, G.A., and Christianson, D.W. 2007. Crystal structure of lactaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli* and inferences regarding substrate and cofactor specificity. *J Mol Biol* **366**: 481-493.
- Diab, F., Bernard, T., Bazire, A., Haras, D., Blanco, C., and Jebbar, M. 2006. Succinate-mediated catabolite repression control on the production of glycine betaine catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under low and elevated salinities. *Microbiology* **152**: 1395-1406.
- Díaz-Sánchez, A.G., González-Segura, L., Rudino-Piñera, E., Lira-Rocha, A., Torres-Larios, A., and Muñoz-Clares, R.A. Novel NADPH-cysteine covalent adduct found in the active site of an aldehyde dehydrogenase. *Biochem J* **439**: 443-452.
- Doring, G., Maier, M., Muller, E., Bibi, Z., Tummler, B., and Kharazmi, A. 1987. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother* **39**: 136-148.
- Dragolovich, J., and Pierce, S.K. 1994. Characterization of partially purified betaine aldehyde dehydrogenase from horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) cardiac

- mitochondria. *J Exp Biol* **270**: 417-425.
- Duester, G. 1991. A hypothetical mechanism for fetal alcohol syndrome involving ethanol inhibition of retinoic acid synthesis at the alcohol dehydrogenase step. *Alcohol Clin Exp Res* **15**: 568-572.
- Egan, R.W. and Gale, P.H. 1985. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase by aromatic disulfides. *J Biol Chem* **260**: 11554-11559.
- Eklund, H., Samama, J.P., and Jones, T.A. 1984. Crystallographic investigations of nicotinamide adenine dinucleotide binding to horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **23**: 5982-5996.
- Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**: 70-77.
- Esselmann, M.T. and Liu, P.V. 1961. Lecithinase production by gramnegative bacteria. *J Bacteriol* **81**: 939-945.
- Falkenberg, P. and Strøm, A.R. 1990. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1034**: 253-259.
- Fergie, J.E., Shema, S.J., Lott, L., Crawford, R., and Patrick, C.C. 1994. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in immunocompromised children: analysis of factors associated with a poor outcome. *Clin Infect Dis* **18**: 390-394.
- Fersht, A. 1985. *Enzyme structure and mechanism*. Freeman, W. H., NY, 2nd edn. pp. 475.
- Fitzgerald, T.L., Waters, D.L., and Henry, R.J. 2009. Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. *Plant Biol (Stuttg)* **11**: 119-130.
- Fleiszig, S.M., Wiener-Kronish, J.P., Miyazaki, H., Vallas, V., Mostov, K.E., Kanada, D., Sawa, T., Yen, T.S., and Frank, D.W. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infect Immun* **65**: 579-586.
- Fujiwara, T., Hori, K., Ozaki, K., Yokota, Y., Mitsuya, S., Ichiyanagi, T., Hattori, T., and Takabe, T. 2008. Enzymatic characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases in barley. *Physiol Plant* **134**: 22-30.
- Garbrecht, M.R., Krozowski, Z.S., Snyder, J.M., and Schmidt, T.J. 2006. Reduction

- of glucocorticoid receptor ligand binding by the 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 inhibitor, Thiram. *Steroids* **71**: 895-901.
- Garza-Ramos, G., Carrilla-Nava, E., Costas, M., Mújica-Jiménez, C., Velasco-García, R., and Muñoz-Clares, R.A. 2007. Effects of monovalent cations on the structure and thermal stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*. (eds. Weiner, H., Maser, E., Lindahl, R., and Plapp, B.): 83-90. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana.
- Gaval-Cruz, M., Schroeder, J.P., Liles, L.C., Javors, M.A., and Weinshenker, D. 2008. Effects of disulfiram and dopamine beta-hydroxylase knockout on cocaine-induced seizures. *Pharmacol Biochem Behav* **89**: 556-562.
- Gaval-Cruz, M. and Weinshenker, D. 2009. mechanisms of disulfiram-induced cocaine abstinence: antabuse and cocaine relapse. *Mol Interv* **9**: 175-187.
- Gill, S.C. and von Hippel, P.H. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**: 319-326.
- Goldberg, J.B., Coyne, M.J., Jr., Neely, A.N., and Holder, I.A. 1995. Avirulence of a *Pseudomonas aeruginosa* algC mutant in a burned-mouse model of infection. *Infect Immun* **63**: 4166-4169.
- González-Segura, L., Velasco-García, R., and 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.
- González-Segura, L., y Muñoz-Clares, R.A. 2003. El papel de los residuos de cisteína en la estructura y función de las proteínas. *REB* **22**: 2-10.
- González-Segura, L., Velasco-García, R., Rudiño-Piñera, E., Mújica-Jiménez, C., and Muñoz-Clares, R.A. 2005. Site-directed mutagenesis and homology modeling indicate an important role of cysteine 439 in the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* **87**: 1056-1064.
- González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C., and Muñoz-Clares, R.A. 2009a. Reaction of the catalytic cysteine of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* with arsenite-BAL and phenylarsine oxide. *Chem Biol Interact* **178**: 64-69.

- González-Segura, L., Rudiño-Pinera, E., Muñoz-Clares, R.A., and Horjales, E. 2009b. The crystal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* provides new insight into the reaction mechanism and shows a novel binding mode of the 2'-phosphate of NADP⁺ and a novel cation binding site. *J Mol Biol* **385**: 542-557.
- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Tsuda, M., Okamoto, K., Nomura, A., Wada, T., Nakahashi, M., and Nishino, T. 1998. Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in DeltamexA-mexB-oprM mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1938-1943.
- Govan, J.R., and Deretic, V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**: 539-574.
- Gray, R.A., and Joo, G.K. 1986. S-Methyl-N,N-diethylthiocarbamate as a selective herbicide in rice. *United States Patent* 4,582,528.
- Gregory, E.M., Yost, F.J., Jr., Rohrbach, M.S., and Harrison, J.H. 1971. Selective chemical modification of malate dehydrogenase. N-ethylmaleimide modification of active center sulfhydryl residues. *J Biol Chem* **246**: 5491-5497.
- Gruez, A., Roig-Zamboni, V., Grisel, S., Salomoni, A., Valencia, C., Campanacci, V., Tegoni, M., and Cambillau, C. 2004. Crystal structure and kinetics identify *Escherichia coli* YdcW gene product as a medium-chain aldehyde dehydrogenase. *J Mol Biol* **343**: 29-41.
- Grunewald, R.W. and Eckstein, A. 1995. Osmotic regulation of the betaine metabolism in immortalized renal cells. *Kidney Int* **48**: 1714-1720.
- Guex, N. and Peitsch, M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714-2723.
- Gutiérrez, J.A., Crowder, T., Rinaldo-Matthis, A., Ho, M.C., Almo, S.C., and Schramm, V.L. 2009. Transition state analogs of 5'-methylthioadenosine nucleosidase disrupt quorum sensing. *Nat Chem Biol* **5**: 251-257.
- Guzmán-Partida, A.M. and Valenzuela-Soto, E.M. 1998. Porcine kidney betaine

- aldehyde dehydrogenase: purification and properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **119**: 485-491.
- Hald, J. and Jacobsen, E. 1948. A drug sensitizing the organism to the ethyl alcohol. *Lancet* **2**: 1001-1004.
- Hardalo, C. and Edberg, S.C. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol* **23**: 47-75.
- Hart, B.W. and Faiman, M.D. 1992. *In vitro* and *in vivo* inhibition of rat liver aldehyde dehydrogenase by *S*-methyl *N,N*-diethylthiolcarbamate sulfoxide, a new metabolite of disulfiram. *Biochem Pharmacol* **43**: 403-406.
- Haug, A., Larsen, B., and Smidsrod, O. 1966. A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta chemica scandinavica* **20**: 183-190.
- Hayashi, Y., Shima, M., Kanehiro, H., Nakajima, Y., Daikoku, N., Higuchi, M., Miyagawa, S., Kamisue, S., Fukuda, K., Tanaka, I., Giddings, J.C., and Yoshioka, A. 2004. Ecthyma gangrenosum combined with multiple perforations of the small intestine associated with *Pseudomonas aeruginosa*. *Pediatr Int* **46**: 104-108.
- Hempel, J., Buhler, R., Kaiser, R., Holmquist, B., de Zalenski, C., von Wartburg, J.P., Vallee, B., and Jornvall, H. 1984. Human liver alcohol dehydrogenase. 1. The primary structure of the beta 1 beta 1 isoenzyme. *Eur J Biochem* **145**: 437-445.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E., and Stamler, J.S. 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 150-166.
- Hibino, T., Meng, Y.L., Kawamitsu, Y., Uehara, N., Matsuda, N., Tanaka, Y., Ishikawa, H., Baba, S., Takabe, T., Wada, K., and Ishii, T. 2001. Molecular cloning and functional characterization of two kinds of betaine-aldehyde dehydrogenase in betaine-accumulating mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Plant Mol Biol* **45**: 353-363.
- Hjelmqvist, L., Norin, A., El-Ahmad, M., Griffiths, W., and Jornvall, H. 2003. Distinct but parallel evolutionary patterns between alcohol and aldehyde dehydrogenases: addition of fish/human betaine aldehyde dehydrogenase

- divergence. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2009-2016.
- Holloway, B.W. 1955. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* **13**: 572-581.
- Hoshino, T., Sugisawa, T., and Fujiwara. 1991. Isolation and characterization of NAD(P)-dependent L-sorbose dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus* UV10. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 665-670.
- Hu, P., Jin, L., and Baillie, T.A. 1997. Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary N-acetylcysteine conjugates. *J Pharmacol Exp Ther* **281**: 611-617.
- Hunt, J.C. and Phibbs, P.V., Jr. 1983. Regulation of alternate peripheral pathways of glucose catabolism during aerobic and anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **154**: 793-802.
- Hunter, W.N. 1995. Rational drug design: a multidisciplinary approach. *Mol Med Today* **1**: 31, 34.
- Iglewski, B.H., Sadoff, J., Bjorn, M.J., and Maxwell, E.S. 1978. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 3211-3215.
- Incharoensakdi, A., Matsuda, N., Hibino, T., Meng, Y.L., Ishikawa, H., Hara, A., Funaguma, T., and Takabe, T. 2000. Overproduction of spinach betaine aldehyde dehydrogenase in *Escherichia coli*. Structural and functional properties of wild-type, mutants and *E. coli* enzymes. *Eur J Biochem* **267**: 7015-7023.
- Jakoby, W.J. 1963. Aldehyde dehydrogenases. Boyer, P. D. (ed.). *The Enzymes*, Academic Press, New York. **7**, 2nd ed: 203-221.
- Jin, L., Davis, M.R., Hu, P., and Baillie, T.A. 1994. Identification of novel glutathione conjugates of disulfiram and diethylthiocarbamate in rat bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Evidence for metabolic activation of disulfiram in vivo. *Chem Res Toxicol* **7**: 526-533.
- Johansson, B. 1989. Diethylthiocarbamic acid methyl ester: a suicide inhibitor of liver aldehyde dehydrogenases? *Pharmacol Toxicol* **64**: 471-474.

- Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jornvall, H., and Eklund, H. 1998. Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci* **7**: 2106-2117.
- Jones, R.N., Kirby, J.T., Beach, M.L., Biedenbach, D.J., and Pfaller, M.A. 2002. Geographic variations in activity of broad-spectrum beta-lactams against *Pseudomonas aeruginosa*: summary of the worldwide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* **43**: 239-243.
- Julián-Sánchez, A., Riveros-Rosas, H., Martínez-Castilla, L.P., Velasco-García, R., and Muñoz-Clares, R.A. 2007. Phylogenetic and structural relationships of the betaine aldehyde dehydrogenases. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*. (eds. Weiner, H., Maser, E., Lindahl, R., and Plapp, B.): 64-76. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana.
- Kast, R.E. and Belda-Iniesta, C. 2009. Suppressing glioblastoma stem cell function by aldehyde dehydrogenase inhibition with chloramphenicol or disulfiram as a new treatment adjunct: an hypothesis. *Curr Stem Cell Res Ther* **4**: 314-317.
- Kilbourn, J.P. 1978. Bacterial content and ionic composition of sputum in cystic fibrosis. *Lancet* **1**: 334.
- Kitson, T.M. 1977. The disulfiram--ethanol reaction: a review. *J Stud Alcohol* **38**: 96-113.
- Kitson, T.M. 1983. Mechanism of inactivation of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Biochem J* **213**: 551-554.
- Knight, P. and Offer, G. 1978. p-NN'-phenylenebismaleimide, a specific cross-linking agent for F-actin. *Biochem J* **175**: 1023-1032.
- Koppitz, M. and Eis, K. 2006. Automated medicinal chemistry. *Drug Discov Today* **11**: 561-568.
- Kortstee, G.J. 1970. The aerobic decomposition of choline by microorganisms. I. The ability of aerobic organisms, particularly coryneform bacteria, to utilize choline as the sole carbon and nitrogen source. *Arch Mikrobiol* **71**: 235-244.
- Kurys, G., Ambroziak, W., and Pietruszko, R. 1989. Human aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of a third isozyme with low K_M for gamma-

- aminobutyraldehyde. *J Biol Chem* **264**: 4715-4721.
- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M.W., Falkenberg, P., McDougall, J., and Strøm, A.R. 1991. DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 1049-1064.
- Lamark, T., Røkenes, T.P., McDougall, J., and Strøm, A.R. 1996. The complex bet promoters of *Escherichia coli*: regulation by oxygen (ArcA), choline (BetI), and osmotic stress. *J Bacteriol* **178**: 1655-1662.
- Lee, J.E., Singh, V., Evans, G.B., Tyler, P.C., Furneaux, R.H., Cornell, K.A., Riscoe, M.K., Schramm, V.L., and Howell, P.L. 2005. Structural rationale for the affinity of pico- and femtomolar transition state analogues of *Escherichia coli* 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase. *J Biol Chem* **280**: 18274-18282.
- Lessie, T.G. and Phibbs, P.V., Jr. 1984. Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annu Rev Microbiol* **38**: 359-388.
- Li, X.Z., Nikaido, H., and Poole, K. 1995. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1948-1953.
- Lindahl, R. and Hempel, J. 1991. Aldehyde dehydrogenases: what can be learned from a baker's dozen sequences? *Adv Exp Med Biol* **284**: 1-8.
- Lindahl, R. 1992. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**: 283-335.
- Lipsky, J.J., Shen, M.L., and Naylor, S. 2001a. *In vivo* inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Chem Biol Interact* **130-132**: 93-102.
- Lipsky, J.J., Shen, M.L., and Naylor, S. 2001b. Overview--in vitro inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites. *Chem Biol Interact* **130-132**: 81-91.
- Lisa, T.A., Garrido, M.N., and Domenech, C.E. 1983. Induction of acid phosphatase and cholinesterase activities in *Ps. aeruginosa* and their in-vitro control by choline, acetylcholine and betaine. *Mol Cell Biochem* **50**: 149-155.
- Liu, P.V. 1974. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* **130**

Suppl: S94-99.

- Liu, X., Zhang, Z.R., Fuller, M.D., Billingsley, J., McCarty, N.A., and Dawson, D.C. 2004. CFTR: a cysteine at position 338 in TM6 senses a positive electrostatic potential in the pore. *Biophys J* **87**: 3826-3841.
- Liu, Z.J., Sun, Y.J., Rose, J., Chung, Y.J., Hsiao, C.D., Chang, W.R., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J., and Wang, B.C. 1997. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nat Struct Biol* **4**: 317-326.
- Livingstone, J.R., Maruo, T., Yoshida, I., Tarui, Y., Hirooka, K., Yamamoto, Y., Tsutui, N., and Hirasawa, E. 2003. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*. *J Plant Res* **116**: 133-140.
- Lorentzen, E., Hensel, R., Knura, T., Ahmed, H., and Pohl, E. 2004. Structural Basis of allosteric regulation and substrate specificity of the non-phosphorylating glyceraldehyde 3-Phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*. *J Mol Biol* **341**: 815-828.
- Lu, Q. and Miller, C. 1995. Silver as a probe of pore-forming residues in a potassium channel. *Science* **268**: 304-307.
- Lucchesi, G.I., Pallotti, C., Lisa, A.T., and Domenech, C.E. 1998. Constitutive choline transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **162**: 123-126.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**: 194-222.
- Ma, J.F., Hager, P.W., Howell, M.L., Phibbs, P.V., and Hassett, D.J. 1998. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* zwf gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (paraquat). *J Bacteriol* **180**: 1741-1749.
- Madan, A. and Faiman, M.D. 1994a. Diethyldithiocarbamate methyl ester sulfoxide, an inhibitor of rat liver mitochondrial low K_M aldehyde dehydrogenase and putative metabolite of disulfiram. *Alcohol Clin Exp Res* **18**: 1013-1017.
- Madan, A. and Faiman, M.D. 1994b. NADPH-dependent, regioselective S-oxidation of a thionosulfur- and thioether-containing xenobiotic, diethyldithiocarbamate

- methyl ester by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **22**: 324-330.
- Madan, A., Parkinson, A., and Faiman, M.D. 1995. Identification of the human and rat P450 enzymes responsible for the sulfoxidation of S-methyl N,N-diethylthiocarbamate (DETC-ME). The terminal step in the bioactivation of disulfiram. *Drug Metab Dispos* **23**: 1153-1162.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. 1997. Brock Biology of Microorganisms, Eighth edition. Prentice Hall. New Jersey. pp.698-701.
- Manaster, Y., Shenkman, B., Rosenberg, N., and Savion, N. 2009. Allicin and disulfiram enhance platelet integrin α IIb β 3-fibrinogen binding. *Thromb Res* **124**: 477-482.
- Marquart, M.E., Caballero, A.R., Chomnawang, M., Thibodeaux, B.A., Twining, S.S., and O'Callaghan, R.J. 2005. Identification of a novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* that causes corneal erosions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**: 3761-3768.
- Marusic, E.T., White, A., and Aedo, A.R. 1973. Oxidative reactions in the formation of an aldehyde group in the biosynthesis of aldosterone. *Arch Biochem Biophys* **157**: 320-321.
- Mattick, J.S., Whitchurch, C.B., and Alm, R.A. 1996. The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*—a review. *Gene* **179**: 147-155.
- Mays, D.C., Nelson, A.N., Lam-Holt, J., Fauq, A.H., and Lipsky, J.J. 1996. S-methyl-N,N-diethylthiocarbamate sulfoxide and S-methyl-N,N-diethylthiocarbamate sulfone, two candidates for the active metabolite of disulfiram. *Alcohol Clin Exp Res* **20**: 595-600.
- Meskys, R., Harris, R.J., Casaite, V., Basran, J., and Scrutton, N.S. 2001. Organization of the genes involved in dimethylglycine and sarcosine degradation in *Arthrobacter spp.*: implications for glycine betaine catabolism. *Eur J Biochem* **268**: 3390-3398.
- Middlebrook, J.L. and Dorland, R.B. 1984. Bacterial toxins: cellular mechanisms of action. *Microbiol Rev* **48**: 199-221.
- Miller, H. and Claiborne, A. 1991. Peroxide modification of monoalkylated glutathione reductase. Stabilization of an active-site cysteine-sulfenic acid. *J*

- Biol Chem* **266**: 19342-19350.
- Miller, R.A. and Britigan, B.E. 1997. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* **10**: 1-18.
- Miskew, D.B., Lorenz, M.A., Pearson, R.L., and Pankovich, A.M. 1983. *Pseudomonas aeruginosa* bone and joint infection in drug abusers. *J Bone Joint Surg Am* **65**: 829-832.
- Mitsuya, S., Yokota, Y., Fujiwara, T., Mori, N., and Takabe, T. 2009. OsBADH1 is possibly involved in acetaldehyde oxidation in rice plant peroxisomes. *FEBS Lett* **583**: 3625-3629.
- Mizuno, T., Iwai, T., and Ito, T. 2004. Practical synthesis of S-alkyl thiocarbamate herbicides by carbonylation of amines with carbon monoxide and sulfur. *Tetrahedron* **60**: 2869-2873.
- Mohr, C.D., Rust, L., Albus, A.M., Iglewski, B.H., and Deretic, V. 1990. Expression patterns of genes encoding elastase and controlling mucoidy: co-ordinate regulation of two virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis. *Mol Microbiol* **4**: 2103-2110.
- Moon, K.H., Kim, B.J., and Song, B.J. 2005. Inhibition of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by nitric oxide-mediated S-nitrosylation. *FEBS Lett* **579**: 6115-6120.
- Moore, S.A., Baker, H.M., Blythe, T.J., Kitson, K.E., Kitson, T.M., and Baker, E.N. 1998. Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* **6**: 1541-1551.
- Mori, N., Kawakami, B., Hyakutome, K., Tani, Y., and Yamada, H. 1980. Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpon didymum* M-1. *Agric Biol Chem* **44**: 3015-3016.
- Mori, N., Yoshida, N., and Kitamoto, Y. 1992. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. *J Ferment Bioeng* **73**: 352-356.
- Mori, N., Fuchigami, S., and Kitamoto, Y. 2002. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase with high affinity for NADP⁺ from

- Arthrobacter globiformis*. *J Biosci Bioeng* **93**: 130-135.
- Morihara, K., Tsuzuki, H., Oka, T., Inoue, H., and Ebata, M. 1965. *Pseudomonas aeruginosa* Elastase. Isolation, crystallization, and preliminary characterization. *J Biol Chem* **240**: 3295-3304.
- Muntz, J.A. 1950. The inability of choline to transfer a methyl group directly to homocysteine for methionine formation. *J. Biol. Chem* **182**: 489-499.
- Muñoz-Clares, R.A. and Valenzuela-Soto, E.M. 2008. Betaine Aldehyde Dehydrogenases: Evolution, Physiological Functions, Mechanism, Kinetics, Regulation, Structure, and Stability. In *Advances in Protein Physical Chemistry*. (eds. García-Hernández, E. and Fernández-Velasco, A.), Transworld Research Network, Kerala, India. pp. 279–302.
- Muñoz-Clares, R.A., Díaz-Sánchez, A.G., González-Segura, L., and Montiel, C. 2010. Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: mechanistic and regulatory implications. *Arch Biochem Biophys* **493**: 71-81.
- Muñoz-Clares, R.A., González-Segura, L., and Díaz-Sánchez, A.G. 2011. Crystallographic evidence for active-site dynamics in the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. Implications for the deacylation step of the catalyzed reaction. *Chem Biol Interact* **191**: 137-146.
- Nagai, N., Murao, T., Okamoto, N., and Ito, Y. 2009. Disulfiram reduces elevated blood glucose levels in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, a model of type 2 diabetes. *J Oleo Sci* **58**: 485-490.
- Nagasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y., and Ogata, K. 1976. Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agr. Biol. Chem.* **40**: 1743-1749.
- Nagendra, S.N., Madan, A., and Faiman, M.D. 1994. S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate sulfone, an *in vitro* and *in vivo* inhibitor of rat liver mitochondrial low K_M aldehyde dehydrogenase. *Biochem Pharmacol* **47**: 1465-1467.
- Nakamura, T., Yokota, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K., and 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.
- Nakamura, T., Nomura, M., Mori, H., Jagendorf, A.T., Ueda, A., and Takabe, T. 2001. An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol* **42**: 1088-1092.
- Nivens, D.E., Ohman, D.E., Williams, J., and Franklin, M.J. 2001. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol* **183**: 1047-1057.
- O'Halloran, T.V., Frantz, B., Shin, M.K., Ralston, D.M., and Wright, J.G. 1989. The MerR heavy metal receptor mediates positive activation in a topologically novel transcription complex. *Cell* **56**: 119-129.
- Oishi, H. and Ebina, M. 2005. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *J Plant Physiol* **162**: 1077-1086.
- Ostroff, R.M. and Vasil, M.L. 1987. Identification of a new phospholipase C activity by analysis of an insertional mutation in the hemolytic phospholipase C structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **169**: 4597-4601.
- Ostroff, R.M., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. 1990. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **172**: 5915-5923.
- Pace, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**: 734-740.
- Pérez-Miller, S.J. and Hurley, T.D. 2003. Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **42**: 7100-7109.
- Pesin, S.R. and Candia, O.A. 1982. Acetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **22**: 651-659.
- Phillips, M., Malloy, G., Nedunchezian, D., Lukrec, A., and Howard, R.G. 1991. Disulfiram inhibits the in vitro growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 785-787.
- Pier, G.B. 1985. Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. *J Infect Dis* **151**: 575-580.

- Pietruszko, R. and Chern, M. 2001. Betaine aldehyde dehydrogenase from rat liver mitochondrial matrix. *Chem Biol Interact* **130-132**: 193-199.
- Puzova, H., Siegfried, L., Kmetova, M., Durovicova, J., and Kerestesova, A. 1994. Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from urinary tract infections. *Folia Microbiol (Praha)* **39**: 337-341.
- Racker, E. 1949. Aldehyde dehydrogenase, a diphosphopyridine nucleotide-linked enzyme. *J Biol Chem* **177**: 883-892.
- Rahme, L.G., Tan, M.W., Le, L., Wong, S.M., Tompkins, R.G., Calderwood, S.B., and Ausubel, F.M. 1997. Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13245-13250.
- Rathinasabapathi, B., McCue, K.F., Gage, D.A., and Hanson, A.D. 1994. Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta* **193**: 155-162.
- Rennick, B.R. 1981. Renal tubule transport of organic cations. *Am J Physiol* **240**: F83-89.
- Reszka, K.J., O'Malley, Y., McCormick, M.L., Denning, G.M., and Britigan, B.E. 2004. Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* **36**: 1448-1459.
- Reszka, K.J., Denning, G.M., and Britigan, B.E. 2006. Photosensitized oxidation and inactivation of pyocyanin, a virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Photochem Photobiol* **82**: 466-473.
- Rhee, S.G., Bae, Y.S., Lee, S.R., and Kwon, J. 2000. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* **2000**: pe1.
- Rhodes, D. and Hanson, A.D. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 357-384.
- Riddles, P.W., Blakeley, R.L., and Zerner, B. 1983. Reassessment of Ellman's

- reagent. *Methods Enzymol* **91**: 49-60.
- Røkenes, T.P., Lamark, T., and Strøm, A.R. 1996. DNA-binding properties of the BetI repressor protein of *Escherichia coli*: the inducer choline stimulates BetI-DNA complex formation. *J Bacteriol* **178**: 1663-1670.
- Rossmann, M.G., Moras, D., and Olsen, K.W. 1974. Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* **250**: 194-199.
- Rothschild, H.A. and Guzmán-Barrón, E.S. 1954. The oxidation of betaine aldehyde by betaine aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* **209**: 511-523.
- Rundlöf, T., Olsson, E., Wiernik, A., Back, S., Aune, M., Johansson, L., and Wahlberg, I. 2000. Potential nitrite scavengers as inhibitors of the formation of N-nitrosamines in solution and tobacco matrix systems. *J Agric Food Chem* **48**: 4381-4388.
- Sage, A.E., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. 1997. Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* **23**: 43-56.
- Sage, A.E. and Vasil, M.L. 1997. Osmoprotectant-dependent expression of plcH, encoding the hemolytic phospholipase C, is subject to novel catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **179**: 4874-4881.
- Saint-Martin, M. and Lasalle, G. 1950. *Pseudomonas aeruginosa* dermatitis successfully treated with streptomycin. *Can Med Assoc J* **62**: 498-499.
- Salvano, M.A., Lisa, T.A., and Domenech, C.E. 1989. Choline transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Cell Biochem* **85**: 81-89.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd edn.
- Sauna, Z.E., Shukla, S., and Ambudkar, S.V. 2005. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. *Mol Biosyst* **1**: 127-134.
- Scapin, G. 2006. Structural biology and drug discovery. *Curr Pharm Des* **12**: 2087-2097.
- Scheibel, L.W., Adler, A., and Trager, W. 1979. Tetraethylthiuram disulfide

- (Antabuse) inhibits the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 5303-5307.
- Schramm, V.L. 2005. Enzymatic transition states and transition state analogues. *Curr Opin Struct Biol* **15**: 604-613.
- Schumann, J., Angermuller, S., Bang, R., Lohoff, M., and Tiegs, G. 1998. Acute hepatotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in mice depends on T cells and TNF. *J Immunol* **161**: 5745-5754.
- Schwartz, S.D. and Schramm, V.L. 2009. Enzymatic transition states and dynamic motion in barrier crossing. *Nat Chem Biol* **5**: 551-558.
- Shen, M.L., Johnson, K.L., Mays, D.C., Lipsky, J.J., and Naylor, S. 2000a. Identification of the protein-drug adduct formed between aldehyde dehydrogenase and *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamoyl sulfoxide by on-line proteolytic digestion high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**: 918-923.
- Shen, M.L., Lipsky, J.J., and Naylor, S. 2000b. Role of disulfiram in the in vitro inhibition of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochem Pharmacol* **60**: 947-953.
- Shirasawa, K., Takabe, T., and Kishitani, S. 2006. Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress. *Ann Bot* **98**: 565-571.
- Smith, L.T., Pocard, J.A., Bernard, T., and Le Rudulier, D. 1988. Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **170**: 3142-3149.
- Smythe, C.V. 1936. The reactions of Iodoacetate and Iodoacetamide with various Sulfhydryl groups, with Urease, and with Yeast preparations. *J Biol Chem* **114**: 601-612.
- Sophos, N.A. and Vasiliou, V. 2003. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem Biol Interact* **143-144**: 5-22.
- Steinman, C.R. and Jakoby, W.B. 1967. Yeast aldehyde dehydrogenase. I. Purification and crystallization. *J Biol Chem* **242**: 5019-5023.
- Steinmetz, C.G., Xie, P., Weiner, H., and Hurley, T.D. 1997. Structure of

- mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* **5**: 701-711.
- Stover, C.K., Lory, S., and Olson, M.V. 1999. The *Pseudomonas aeruginosa* genome and functional genomic approaches to identifying new drug targets. Abstract S32. In *Abstract book of the symposium Pseudomonas '99: Biotechnology and Pathogenesis*. Maui, Hawaii. ASM Press, Washington D. C.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., *et al.* 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Tennent, J. and Mattick, J.S. 1994. Type-4 fimbriae. In *Fimbriae: Aspects of Adhesion, Genetics, Biogenesis and Vaccines*. (ed. P. Klemm), pp. 127-146. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Tomás, M., Doumith, M., Warner, M., Turton, J.F., Beceiro, A., Bou, G., Livermore, D.M., and Woodford, N. 2010. Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 2219-2224.
- Trossat, C., Rathinasabapathi, B., and Hanson, A.D. 1997. Transgenically Expressed Betaine Aldehyde Dehydrogenase Efficiently Catalyzes Oxidation of Dimethylsulfoniopropionaldehyde and ω -Aminoaldehydes. *Plant Physiol* **113**: 1457-1461.
- Tsybovsky, Y., Donato, H., Krupenko, N.I., Davies, C., and Krupenko, S.A. 2007. Crystal structures of the carboxyl terminal domain of rat 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase: implications for the catalytic mechanism of aldehyde dehydrogenases. *Biochemistry* **46**: 2917-2929.
- Tylichová, M., Briozzo, P., Kopečný, D., Ferrero, J., Moréra, S., Joly, N., Snégaroff, J., and Šebela, M. 2008. Purification, crystallization and preliminary crystallographic study of a recombinant plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **64**: 88-90.
- Tylichová, M., Kopečný, D., Moréra, S., Briozzo, P., Lenobel, R., Snégaroff, J., and

- Šebela, M. 2009. Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. *J Mol Biol* **396**: 870-882.
- Valenzuela-Soto, E.M. and Muñoz-Clares, R.A. 1994. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *J Plant Physiol* **143**: 145–152.
- Valenzuela-Soto, E.M., Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Gaviria-González, L.L., and Muñoz-Clares, R.A. 2003. Monovalent cations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidney and amaranth leaves. *Chem Biol Interact* **143-144**: 139-148.
- Vallari, R.C. and Pietruszko, R. 1982. Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition of disulfiram. *Science* **216**: 637-639.
- Vasiliou, V., Bairoch, A., Tipton, K.F., and Nebert, D.W. 1999. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* **9**: 421-434.
- Vasiliou, V. and Nebert, D.W. 2005. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics* **2**: 138-143.
- Vaz, F.M., Fouchier, S.W., Ofman, R., Sommer, M., and Wanders, R.J. 2000. Molecular and biochemical characterization of rat gamma-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *J Biol Chem* **275**: 7390-7394.
- Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G., and Muñoz-Clares, R.A. 1999. Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 1292-1300.
- Velasco-García, R., González-Segura, L., and Muñoz-Clares, R.A. 2000. Steady-state kinetic mechanism of the NADP⁻ and NAD⁺-dependent reactions catalysed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* **352**: 675-683.

- Velasco-García, R., Chacón-Aguilar, V.M., Hervert-Hernández, D., and Muñoz-Clares, R.A. 2003. Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves by disulfiram. *Chem Biol Interact* **143-144**: 149-158.
- Velasco-García, R., Villalobos, M.A., Ramírez-Romero, M.A., Mújica-Jiménez, C., Iturriaga, G., and Muñoz-Clares, R.A. 2006a. Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt. *Arch Microbiol* **185**: 14-22.
- Velasco-García, R., Zaldívar-Machorro, V.J., Mújica-Jiménez, C., González-Segura, L., and Muñoz-Clares, R.A. 2006b. Disulfiram irreversibly aggregates betaine aldehyde dehydrogenase--a potential target for antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* **341**: 408-415.
- Vojtěchová, M., Hanson, A.D., and Muñoz-Clares, R.A. 1997. Betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD⁺-dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde to dimethylsulfoniopropionate. *Arch Biochem Biophys* **337**: 81-88.
- Wargo, M.J., Szwegold, B.S., and Hogan, D.A. 2008. Identification of two gene clusters and a transcriptional regulator required for *Pseudomonas aeruginosa* glycine betaine catabolism. *J Bacteriol* **190**: 2690-2699.
- Weigel, P., Weretilnyk, E.A., and Hanson, A.D. 1986. Betaine Aldehyde Oxidation by Spinach Chloroplasts. *Plant Physiol* **82**: 753-759.
- Weldhagen, G.F., Poirel, L., and Nordmann, P. 2003. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2385-2392.
- Weretilnyk, E.A. and 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.
- Westbrock-Wadman, S., Sherman, D.R., Hickey, M.J., Coulter, S.N., Zhu, Y.Q., Warrenner, P., Nguyen, L.Y., Shawar, R.M., Folger, K.R., and Stover, C.K. 1999. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob Agents Chemother*

- 43:** 2975-2983.
- Wickstrom, M., Danielsson, K., Rickardson, L., Gullbo, J., Nygren, P., Isaksson, A., Larsson, R., and Lovborg, H. 2007. Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochem Pharmacol* **73**: 25-33.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-271.
- Wood, S.R., Firoved, A.M., Ornatowski, W., Mai, T., Deretic, V., and Timmins, G.S. 2007. Nitrosative stress inhibits production of the virulence factor alginate in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Free Radic Res* **41**: 208-215.
- World Health Organization, Task Group on Environmental Health Criteria for Dithiocarbamate Pesticides, Ethylenethiourea, and Propylenethiourea. United Nations Environment Programme, International Labour Organisation, International Program on Chemical Safety. 1988. Dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea, and propylenethiourea: a general introduction. *Environmental health criteria. Geneva, Albany, New York. World Health Organization; WHO Publications Center USA.* **78**:140
- Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G.A., and Parsek, M.R. 2003. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7907-7912.
- Wright, J.R. and Clements, J.A. 1987. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* **136**: 426-444.
- Yoshida, A., Rzhetsky, A., Hsu, L.C., and Chang, C. 1998. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem* **251**: 549-557.
- Yoshimura, F. and Nikaido, H. 1982. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J Bacteriol* **152**: 636-642.
- Yourick, J.J. and Faiman, M.D. 1989. Comparative aspects of disulfiram and its metabolites in the disulfiram-ethanol reaction in the rat. *Biochem Pharmacol* **38**: 413-421.
- Zaldívar-Machorro, V.J., Demare, P., Ramírez, M.R., Regla, I., and Muñoz-Clares, R.A. 2007. Inhibitory effects of disulfiram and its metabolites on

- Pseudomonas aeruginosa* betaine aldehyde dehydrogenase and growth. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*. (eds. Weiner, H., Maser, E., Lindahl, R., and Plapp, B): 14-21.
- Zaldívar-Machorro, V.J., López-Ortíz, M., Demare, P., Regla, I., and Muñoz-Clares, R.A. 2011. The disulfiram metabolites *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamoyl sulfoxide and *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamoyl sulfone irreversibly inactivate betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, both *in vitro* and *in situ*, and arrest bacterial growth. *Biochimie* **93**: 286-295.
- Zhang, F.L., Niua, B., Wang, Y.C., Chen, F., Wanga, S.H., Xua, Y., Jiang, L.D., Gao, S., Wu, J., Tang, L., Jia, Y.J. 2009. A novel betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Jatropha curcas*, encoding an enzyme implicated in adaptation to environmental stress. *Plant Sci* **176**: 159.

XI. Anexos

Disulfiram irreversibly aggregates betaine aldehyde dehydrogenase—A potential target for antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*

Roberto Velasco-García^{a,1}, Víctor J. Zaldívar-Machorro^{b,1}, Carlos Mújica-Jiménez^b, Lilian González-Segura^{a,2}, Rosario A. Muñoz-Clares^{b,*}

^a Laboratorio de Osmorregulación, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios, Tlalnepantla, Estado de México, 54090 México, Mexico

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

Received 16 December 2005

Available online 11 January 2006

Abstract

In the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, betaine aldehyde dehydrogenase (PaBADH) may play the dual role of assimilating carbon and nitrogen from choline or choline precursors—abundant at infection sites—and producing glycine betaine, which protects the bacterium against the high-osmolality stress prevalent in the infected tissues. This tetrameric enzyme contains four cysteine residues per subunit and is a potential drug target. In our search for specific inhibitors, we mutated the catalytic Cys286 to alanine and chemically modified the recombinant wild-type and the four Cys → Ala single mutants with thiol reagents. The small methyl-methanethiosulfonate inactivated the enzymes without affecting their stability while the bulkier dithionitrobenzoic acid (DTNB) and bis[diethylthiocarbonyl] disulfide (disulfiram) induced enzyme dissociation—at 23 °C—and irreversible aggregation—at 37 °C. Of the four Cys → Ala mutants only C286A retained its tetrameric structure after DTNB or disulfiram treatments, suggesting that steric constraints arising upon the covalent attachment of a bulky group to C286 resulted in distortion of the backbone configuration in the active site region followed by a severe decrease in enzyme stability. Since neither NAD(P)H nor betaine aldehyde prevented disulfiram-induced PaBADH inactivation or aggregation, and reduced glutathione was unable to restore the activity of the modified enzyme, we propose that disulfiram could be a useful drug to combat infection by *P. aeruginosa*.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Betaine aldehyde dehydrogenase; *Pseudomonas aeruginosa*; Chemical modification; Enzyme inactivation; Enzyme dissociation; Enzyme aggregation; Disulfiram; Antimicrobial agent

The Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is an important pathogen of plants and animals. Given the high prevalence of antibiotic resistant strains of *P. aeruginosa*, it is desirable to design new chemotherapeutic agents against this opportunistic pathogen, which is a growing human health problem because of the susceptibil-

ity to infection in the increasingly immuno-depressed population.

Pseudomonas aeruginosa can grow in an extensive variety of compounds and habitats, seeming to be practically ubiquitous. Significantly, it can grow in choline, or choline precursors—abundant in infected tissues [1–3]—as its only carbon, nitrogen, and energy source [4]. An obligatory step in the catabolism of these compounds by *P. aeruginosa* is the irreversible, NAD(P)⁺-dependent oxidation of betaine aldehyde catalyzed by betaine aldehyde dehydrogenase (betaine aldehyde: NAD(P)⁺ oxidoreductase, EC 1.2.1.8; BADH) [4,5]. In *P. aeruginosa*, the gene encoding this

* Corresponding author. Fax: +52 55 56225329.

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

¹ These authors contributed equally.

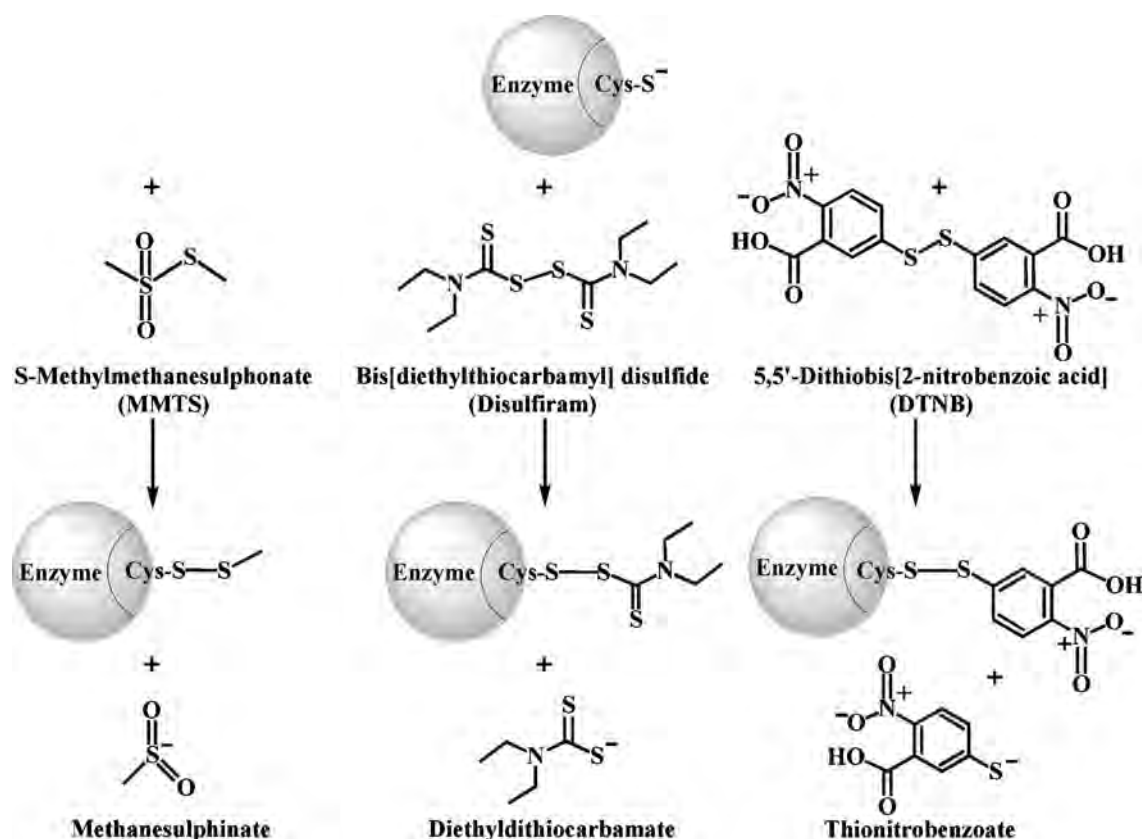
² Present address: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA.

enzyme is induced by choline, even in the presence of other carbon sources such as glucose [5], a finding which suggests that PaBADH activity is indeed present in bacteria infecting human tissues.

Glycine betaine—the acid product of the BADH catalyzed reaction—is an effective osmoprotectant [6], and most likely acts as such in bacterial cells growing in the hyperosmotic environment of infected tissues [7] for it has been found that *P. aeruginosa* is able to thrive under osmotic stress if glycine betaine or compounds that produce glycine betaine—choline or choline precursors—are present [8]. Indeed, the virulence of this bacterium has been correlated with its ability to adapt to osmotic stress and to express phospholipase C [9,10]—the first enzyme in the pathway from phosphatidylcholine to glycine betaine. BADH from *P. aeruginosa* (PaBADH) therefore might be a key enzyme in the establishment and growth of the pathogen and thus a potential target for chemotherapeutic agents. Validation of this enzyme as a suitable target for antimicrobial agents comes from the finding that bacteria with a disrupted *badh* gene cannot grow in glucose under osmotic stress conditions if choline is present in the growth medium [11]. The authors of this work suggested that growth inhibition is due to the accumulation of the BADH substrate, betaine aldehyde, which is highly toxic [12].

Every aldehyde dehydrogenase (ALDH) known to date has an essential cysteine residue that forms a covalent bond with the aldehyde substrate during catalysis. Alignment of

the PaBADH sequence with other ALDH sequences indicates that C286 is the strictly conserved cysteine residue and therefore the catalytic one. As at neutral pH thiols are the most reactive groups in proteins, and the catalytic cysteine residue of PaBADH is particularly highly reactive [13], specific thiol reagents aimed at its chemical modification could be effective inhibitors of this enzyme. We have previously shown that PaBADH is inactivated in a time- and dose-dependent fashion by thiol reagents [13,14], most likely as a consequence of the chemical modification of the catalytic cysteine. But each subunit of this tetrameric [15] enzyme contains three cysteine residues—C353, 377, and 439—in addition of the essential, catalytic C286. These three residues were individually mutated to alanine and found not to be essential for enzyme activity. C439, however, plays an important role in the maintenance of the native tetrameric structure [16]. In this work, with the aim of exploring (1) the feasibility of using the catalytic, or another cysteine, residue of PaBADH as a target for irreversible chemical modification, and (2) the potentiality of using thiol reagents to counteract infection by this pathogen, we examined the effects on the native enzyme structure of reagents that react rapidly and specifically with protein thiols introducing groups of differing size and charge into the protein—methyl methanethiosulfonate (MMTS), dithionitrobenzoic acid (DTNB), and bis[diethylthiocarbamyl] disulfide (disulfiram) (Scheme 1). We were particularly interested in investigating the effects of disulfiram—an



Scheme 1. Reactions of MMTS, disulfiram, and DTNB with a protein thiolate group.

approved drug that has been long used to treat alcoholism [17,18] and, more recently, has been suggested to be of potential use in both treating cocaine dependency [19,20] and in clinical oncology [21–25]. To be able to unequivocally ascribe the effects of disulfiram to the modification of one or several of the PaBADH cysteinyl residues, we constructed the C286A mutant and subjected the four Cys → Ala PaBADH mutants to chemical modification.

We report here that, by reacting with the thiolate group of C286, bulky thiol reagents destabilized the quaternary structure and promoted irreversible enzyme aggregation, not prevented by NADP(H) or betaine aldehyde. These results suggest that disulfiram could be a clinically useful drug to combat infection by *P. aeruginosa*.

Materials and methods

Materials. Betaine aldehyde chloride, dithiothreitol (DTT), reduced glutathione (GSH), 2-mercaptoethanol, EDTA, NADP⁺ (sodium salt), disulfiram, and 1-anilino-8-naphthalenesulfonic acid (ANS) were obtained from Sigma–Aldrich Química, S.A. de C.V. (Toluca, México). All other chemicals used in this study were of analytical grade.

Site-directed mutagenesis. To construct the PaBADH C286A mutant, FW (5' CTC CGG CCA GGT CGC GAC CAA CGG CACC 3') and RV (5' GGT GCC GTT GGT CGC GAC CTG GCC GGAG 3') oligonucleotides containing the desired mutation were used. Mutagenesis was performed with the Quikchange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), following the manufacturer's instructions and using the pCALbetB plasmid [5] as DNA template. The *Escherichia coli* strains XL1-blue and BL21(DE3) pLysS were transformed with the mutated plasmid [5]. The mutation was confirmed by sequencing the mutated gene in an automatic sequencer (ABI Prism 310 Molecular Analyzer, Applied Biosystems).

Expression and purification of recombinant wild-type and mutant PaBADHs. The wild-type and the four Cys → Ala mutant PaBADHs—C286A, C353A, C377A, and C439A—were expressed in *E. coli* cells as reported [5,16] and purified to homogeneity following the two-step procedure described [16]. The structural integrity of the C286A mutant was assessed by intrinsic tryptophan fluorescence and circular dichroism. Spectra were recorded as described [16]. The molar concentrations of wild-type and mutant PaBADHs were determined by the technique of Bradford [26], or spectrophotometrically, using a molar absorptivity at 280 nm of 52,060 M⁻¹ cm⁻¹, deduced from the amino acid sequence by the method of Gill and von Hippel [27].

Enzyme assay and chemical modification. PaBADH activity was assayed spectrophotometrically at 30 °C, by monitoring the increase in absorbance at 340 nm in a mixture (0.5 ml) consisting of 1.0 mM betaine aldehyde, 0.3 mM NADP⁺, and 1 mM EDTA in 100 mM potassium phosphate, pH 8.0 (standard assay).

Chemical modification of wild-type and mutant PaBADH samples was carried out at 23 or 37 °C with the following thiol reagents: 0.4 mM DTNB, 5 μM MMTS, and 50 μM disulfiram. Previous to chemical modification, the enzyme preparations (300 μg/ml, 5 μM as subunit) were freed of 2-mercaptoethanol—used during storage of the enzyme—by quick gel filtration in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0, containing 1 mM EDTA (buffer A), or in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.9, containing 1 mM EDTA, 25 mM KCl, and 10% (v:v) glycerol (buffer B). Each sample was subjected to three runs of gel filtration and then the chemical modification was carried out in the same buffer by adding the appropriate amounts of the thiol reagent tested. All solutions used were degassed and saturated with nitrogen just before use to prevent air oxidation of the PaBADH cysteine residues. The enzyme was completely stable at 0 °C for 72 h after removal of 2-mercaptoethanol under anaerobic conditions. The stock solutions of MMTS (50 μM), DTNB (100 mM), and disulfiram (5 mM) were prepared in absolute ethanol.

The kinetics of inactivation of PaBADH (300 μg/ml, 5 μM as subunit) by 50 μM DSF at 37 °C in the absence and presence of ligands were determined in buffer B. At specified times, samples were removed from incubations and the residual enzyme activity determined by the standard assay. Pseudo-first order analysis of the inactivation kinetics was performed by non-linear regression. Reactivation of the PaBADH enzymes, which were totally inactivated by DTNB- or DSF-treatments in buffer B for 12 h at 23 °C or 2 h at 37 °C, was performed with 2.5 mM DTT or 5 mM GSH. The recovery of enzyme activity was followed over time.

Size-exclusion chromatography. The association state of the chemically modified enzymes was estimated by size-exclusion chromatography (SEC) on a Superdex 200 HR 10/30 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden), connected to a high-pressure chromatography system (Waters, Milford, MA, USA). The column was equilibrated and eluted at room temperature with buffer A or B at a flow rate of 0.5 ml/min. Elution was monitored by following absorbance at 280 nm. Before chromatography all samples were filtered (membrane-pore diameter 0.22 μm) or centrifuged to eliminate large aggregates.

Protein aggregation studies. To estimate the amount of aggregated protein formed, enzyme samples treated with the modifying reagent at 37 °C for 2 h were centrifuged for 15 min at 16,000 rpm in an Allegra 64 R (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) bench-top centrifuge at 4 °C. The soluble PaBADH protein remaining was measured by absorbance at 280 nm of the supernatant. Turbidimetry was used to obtain information on the kinetics of the aggregation of the disulfiram- and DTNB-treated enzymes. Measurements of absorbance as a function of time were performed in a DU 7000 spectrophotometer (Beckman, Fullerton, CA, USA) at 450 nm and 37 °C. The samples were rigorously mixed using a vortex for 30 s before each measurement. To determine the hydrophobic surface exposed by the enzyme during and after disulfiram modification, PaBADH samples were incubated in buffer B for 2 h at 37 °C with 50 μM disulfiram in the presence of a 20-fold excess of ANS. A RF 5000U spectrofluorimeter (Shimadzu, Kyoto, Japan) and a 1-cm quartz cuvette were used. The intensity for the ANS fluorescence emission was registered at 486.4 nm with excitation at 370 nm. The excitation and emission slits were set at 5 nm.

Results and discussion

Site-directed mutagenesis of C286

Alignment of the BADH sequences currently available in the data banks (not shown) indicated that C286 (*P. aeruginosa* numbering) is the only cysteine residue strictly conserved. This suggests that this residue is the active site nucleophile that attacks the aldehyde substrate during catalysis, forming the thiohemiacetal intermediate. To confirm this, and to explore the feasibility of using this thiol group as a target for specific chemical modification, we constructed the C286A mutant. This mutant PaBADH showed complete cross-reactivity with polyclonal antiserum raised against the wild-type enzyme [28] (results not shown). The mutant was expressed at a level comparable with that of the wild-type, as assessed by SDS-PAGE and immunoblot analysis of cell-free extracts (results not shown). It was successfully purified to homogeneity using the previously reported two-step procedure employed with the native BADH [16]; the yield was 23 mg of pure enzyme per liter of culture. The purified mutant C286A PaBADH was completely devoid of activity, thus confirming the essentiality of this residue. Tryptophan fluorescence emission spectra of the recombinant wild-type and the C286A

mutant (not shown) had an identical peak at 335 nm. Similarly, the CD spectra of both enzymes were super-imposable within experimental error (not shown). Both results indicate that the mutation has no major effects on secondary or tertiary structure.

Effect of thiol reagents on the association state of PaBADH

We have previously shown that thiol reagents inactivate PaBADH in a time- and dose-dependent fashion [13,14], most likely as a consequence of the chemical modification of the highly reactive thiol group of the catalytic cysteine residue, C286. To find out whether thiol modification has an additional effect on PaBADH stability, we examined the oligomeric structure of the wild-type enzyme by SEC after treatment with compounds that react rapidly and specifically with protein thiols but introduce groups of differing size and charge into the protein—MMTS, disulfiram, and DTNB (Scheme 1).

At pH 8.0 and 23 °C, the total inactivation of wild-type PaBADH (2 mg/ml) by chemical modification with the bulky thiol reagent DTNB for 2 h in buffer A caused an important proportion of the native tetramers to dissociate into monomers. Dimers were not observed (Fig. 1A). Given the high reactivity of the PaBADH catalytic thiol group, even at neutral pH [13], it is reasonable to expect that it is more susceptible to chemical modification than the other three cysteinyl residues. The homology model of PaBADH shows that C353 and C377 are located at the protein surface but their sulfur atoms are buried and therefore not accessible to the solvent [16]. C439 is at the subunit interface between the monomers forming a dimeric pair so its mutation results in destabilization of the quaternary structure [16]. The modification of C439 by DTNB could lead, therefore, to enzyme dissociation. To unequivocally establish which of the cysteinyl residues destabilizes the tetrameric native structure when chemically modified, we subjected the four Cys → Ala PaBADH mutants to chemical modification by DTNB under identical conditions—pH 8.0, 23 °C—to those used with the wild-type enzyme. Of the four mutants, only C286A maintained its tetrameric structure after this treatment (Fig. 1B), whereas C353A and C377A dissociated in a proportion similar to that of the wild-type (not shown) and C439A completely dissociated into monomers (Fig. 1C), consistent with its low stability [16]. These results indicate that active site rearrangements provoked by the DTNB-modification of C286—the catalytic cysteine—propagate to the interface between subunits resulting in overall tetramer instability. As the MMTS-inactivated wild-type enzyme conserved its tetrameric structure even 48 h after inactivation was complete (not shown), the DTNB-induced enzyme dissociation was not caused by chemical modification of the catalytic thiolate, but by steric constraints derived from the attachment of a bulky and/or charged S-R group to the essential thiolate.

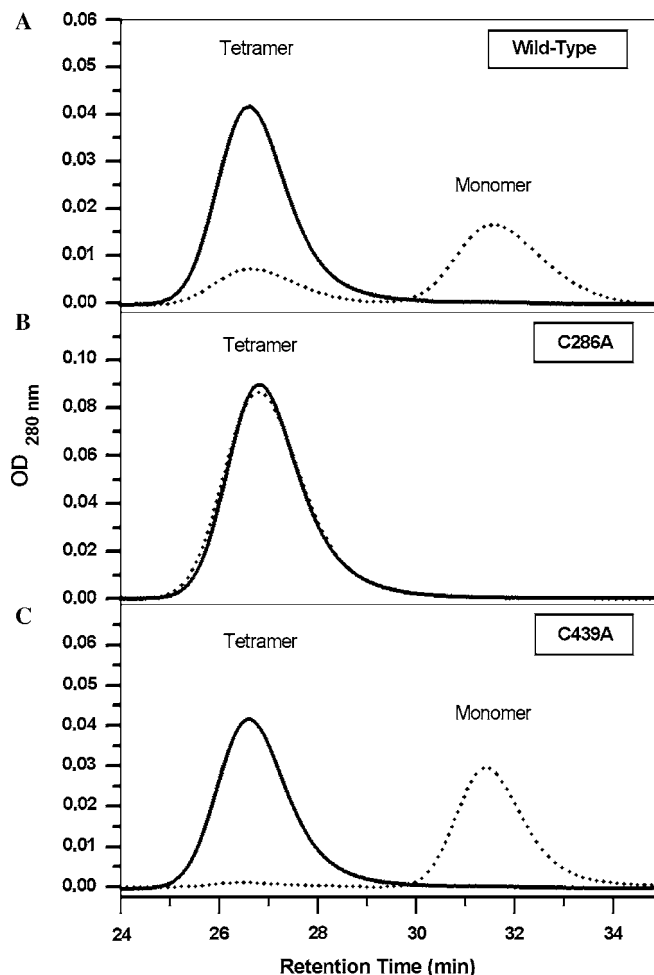


Fig. 1. Effect of DTNB treatment at 23 °C on the oligomeric state of wild-type and mutant PaBADHs. The enzymes (2 mg/ml) were incubated for 2 h without (solid lines) or with 0.4 mM DTNB (dotted lines) in buffer A. The SEC elution profiles of the wild-type (A), C286A (B), and C439A (C) mutants are shown.

The results with DTNB prompted us to investigate whether chemical modification by another bulky, hydrophobic, uncharged thiol reagent—the clinically used drug disulfiram, which is known to inactivate PaBADH [14]—would also affect the native tetrameric structure of the enzyme. Enzyme modification by disulfiram was carried out at both 23 and 37 °C in buffer B—at pH 6.9 which is near physiological. Similar to the previous results obtained with DTNB, the wild-type PaBADH inactivated by 2 h incubation at 23 °C with 50 μM disulfiram was a mixture of tetramers and monomers (Fig. 2A). To simulate conditions of infection, we next investigated the stability of the enzyme when modified at 37 °C under otherwise identical conditions to the ones at 23 °C. Visible aggregates of very high molecular weight formed, indicating that the chemically modified tetramers and/or monomers are very unstable. Only about 5% of the initial wild-type protein remained as tetramers, as indicated by the absorption at 280 nm of the centrifuged samples and by the reduction in the area under the SEC elution profile peaks (Fig. 2A).

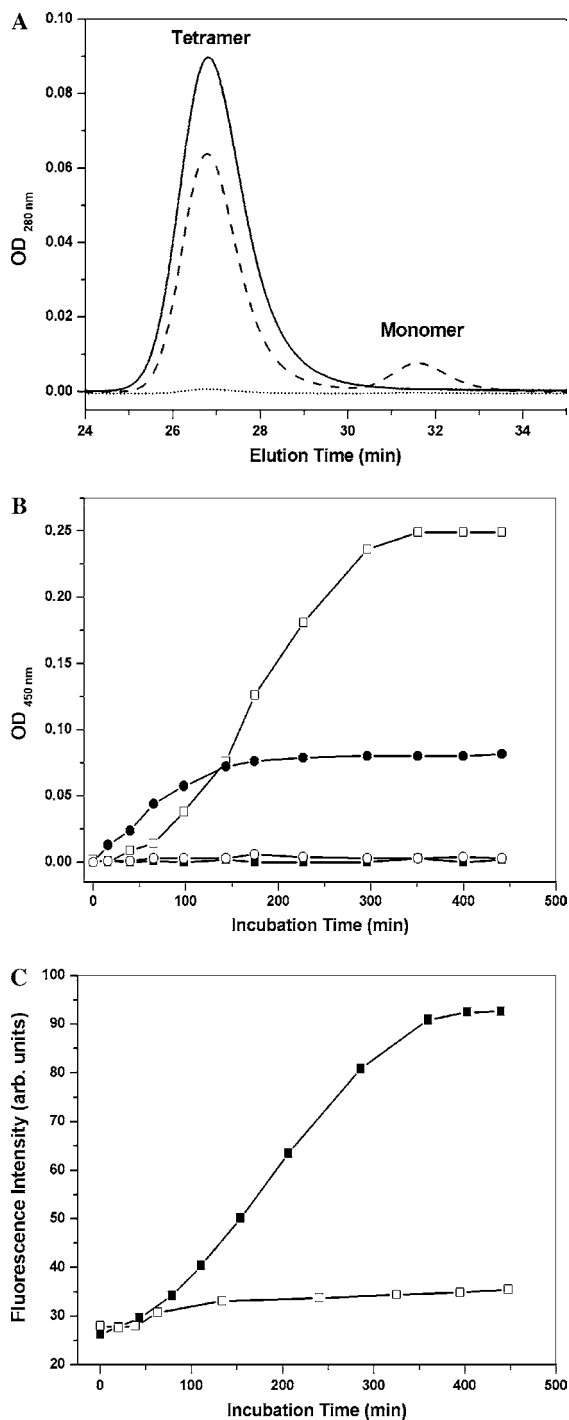


Fig. 2. (A) Effect of disulfiram treatment on the oligomeric state of wild-type PaBADH. SEC elution profiles of enzyme samples after 2 h incubation in buffer B without (solid lines) and with 50 μ M disulfiram at 23 (dashed lines) or 37 $^{\circ}$ C (dotted lines). Previous to SEC the enzyme aggregates formed at 37 $^{\circ}$ C were removed by centrifugation. (B) Turbidometry of enzyme samples measured by their absorbance at 450 nm during incubation at 37 $^{\circ}$ C in buffer B without (closed squares) or with 5 μ M MMTS (open circles), 2 mM DTNB (closed circles), or 50 μ M disulfiram (open squares). (C) Disulfiram-induced changes in ANS fluorescence of wild-type (closed squares) and C286A mutant (open squares) PaBADHs. Incubation conditions were as in (B) except that 100 μ M ANS was present throughout the incubation. Lines through the data points in (B,C) do not represent a curve fit but are presented to guide the eye. In all experiments, enzyme concentration was 0.3 mg/ml (5 μ M as subunit).

Monomers were not observed, most likely because they readily form the high-molecular weight aggregates. The control, non-treated PaBADH remained as tetramers after incubation at 37 $^{\circ}$ C in buffer B for the same amount of time (Fig. 2A).

The ability of the thiol reagents to induce PaBADH aggregation at 37 $^{\circ}$ C was assessed by measuring the turbidometry of treated protein samples. An increase in absorbance at 450 nm was observed in the wild-type PaBADH sample treated with DTNB, and an even greater increase in that treated with disulfiram. Neither the MMTS-treated nor the untreated enzymes showed any increase in absorbance when incubated under the same conditions and for the same period of time (Fig. 2B).

Disulfiram-induced aggregation of PaBADH at 37 $^{\circ}$ C was studied also by monitoring changes in the emission of the fluorescent probe ANS during the time-course of modification. ANS is virtually non-fluorescent in a polar solvent and exhibits a significant increase in quantum yield when binding to hydrophobic regions on proteins [29]. Differences in ANS fluorescence intensities can therefore be correlated with changes in the enzyme quaternary structure. The emission profile of the disulfiram-treated wild-type PaBADH in the presence of ANS (Fig. 2C) is similar to the absorbance profile obtained in the turbidometry experiments in the absence of the fluorophore. Both profiles are characterized by features that are typically assigned to a nucleation-dependent aggregation mechanism, including a lag phase that is followed by a sigmoidal-like increase to a fluorescence plateau. Given the hydrophobic nature of the dye, the more favorable interaction of ANS with the disulfiram-induced PaBADH aggregates indicates an increased overall surface hydrophobicity. The almost constant fluorescence observed with the C286A mutant (Fig. 2C) again indicates that disulfiram did not cause any structural alteration in the enzyme if the catalytic thiolate is not modified.

SDS (4% w/v) completely dissolved the enzyme aggregates formed by treatment with disulfiram, as assessed by the re-appearance of the soluble protein—determined by measuring the absorbance at 280 nm of the supernatants of centrifuged samples—after 12 h of the addition of the detergent (not shown). Since DTT was not present, this result indicates that aggregation is not due to formation of disulfide bridges between the disulfiram-treated PaBADH molecules but rather to non-covalent—most likely hydrophobic—interactions.

Comparison of the kinetics of the disulfiram-induced PaBADH inactivation and aggregation at 37 $^{\circ}$ C. Effect of ligands on these kinetics

In order to obtain information on the kinetics of the disulfiram-induced aggregation of PaBADH at 37 $^{\circ}$ C, and to investigate whether they correlate with the kinetics of inactivation, we measured the activity and turbidometry of treated protein samples as a function of time. As

previously found in experiments carried out at 23 °C [14], disulfiram caused a total loss of enzyme activity in a first order process. The observed pseudo-first order rate constant of $0.281 \pm 0.038 \text{ min}^{-1}$ is 14 times higher than that observed at 23 °C, and its value was not significantly changed by the presence of NADP^+ ($0.247 \pm 0.028 \text{ min}^{-1}$) or betaine aldehyde ($0.291 \pm 0.031 \text{ min}^{-1}$) in the inactivation medium (Fig. 3A). Inactivation was complete after ≈ 45 min of incubation—a time at which aggregation has not yet taken place to any significant extent (Fig. 3B). Thus, enzyme aggregation is a much slower process than enzyme inactivation and follows the chemical modification

of the enzyme. As in inactivation, neither the rate nor the extent of aggregation was affected by the presence of the PaBADH substrates. The lack of protection by both substrate and NADP^+ is of particular interest, as PaBADH follows a random kinetic mechanism [30] and it is most likely that a significant fraction of PaBADH molecules in vivo—if not all—has the nucleotide or the aldehyde bound.

Mechanism of the irreversible inactivation of PaBADH by disulfiram

The mechanism of enzyme inhibition by disulfiram involves the formation of a thiocarbamate–thiol derivative with a cysteine residue [31], as shown in Scheme 1. The lack of changes in the quaternary structure of the C286A mutant treated with bulky thiol reagents, together with the dissociation observed in the other treated Cys mutants, indicated that the observed structural changes are due to the chemical modification of the catalytic cysteine. The homology model of PaBADH [16] shows that there is no other cysteine residue close enough to the catalytic one to form an intra-molecular disulfide bridge via a disulfide-interchange reaction, concluding that only the mixed disulfide is formed. On the contrary, inactivation of liver mitochondrial ALDH2 by disulfiram—which causes accumulation of acetaldehyde and results in the effects called the “disulfiram-ethanol reaction”—involves formation of an intra-subunit disulfide bridge between the catalytic and a vicinal cysteine residue [32,33]. Formation of an intra-molecular disulfide has also been reported to occur after DSF treatment of the ALDH1 enzyme [34]. The different modification elicited by disulfiram in these enzymes may be the reason why ALDH2 does not lose its tetrameric structure when modified by disulfiram [35,36] while PaBADH does.

The mixed disulfide may be reversed by a disulfide exchange reaction with physiological or non-physiological thiols, but this depends on chemical and steric factors such as: (i) the stability of the mixed disulfide bond, i.e., its susceptibility to cleavage by free thiols; (ii) the acidity of the protein thiol group involved in the mixed disulfide, which is essential for making it a good leaving group in thiol-disulfide exchange reactions with free thiols [37]; and (iii) the accessibility of the mixed disulfide to thiols in the solvent.

When the inactivation was performed at 37 °C, after the very high molecular weight aggregates had formed, both 5 mM GSH or 2.5 mM DTT was unable to restore the activity of the disulfiram-treated enzyme to any extent (not shown). But even at 23 °C, when enzyme aggregates did not form, 5 mM GSH—a physiological concentration in *P. aeruginosa* cells [38]—cannot restore the activity of the disulfiram-inactivated PaBADH to any extent, under conditions in which 2.5 mM DTT does (not shown). This result confirms previous findings obtained with ALDH1 [34] and BADHs [14]. The reactivation with DTT together with the ability of GSH to fully restore the activity of the

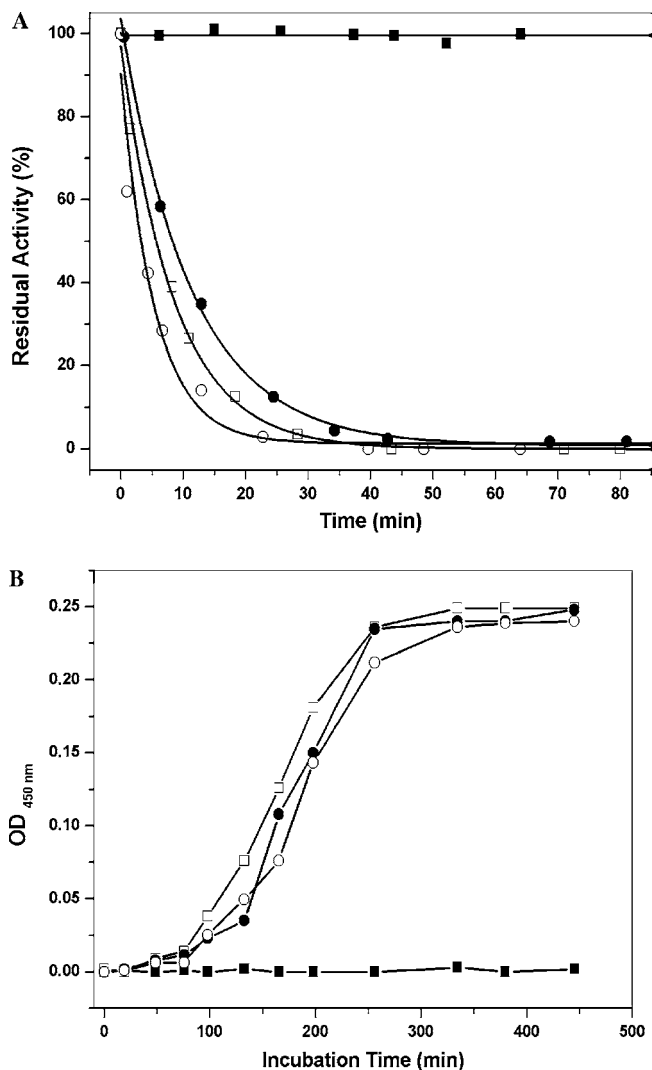


Fig. 3. Kinetics of inactivation (A) and aggregation (B) of PaBADH by disulfiram at 37 °C in the absence and presence of ligands. (A) The wild-type enzyme was incubated in buffer B without (closed squares) and with 50 μM disulfiram in the absence (open squares) or presence of 300 μM NADP^+ (closed circles) or 2 mM betaine aldehyde (open circles). The remaining enzyme activity was measured at the indicated times. The points are the experimental data while the lines are theoretical, based on the best fit of the data to a single exponential decay equation. (B) Absorbance at 450 nm of the same samples as in (A). Lines through the data points do not represent a curve fit but are presented to guide the eye. Enzyme concentration was 0.3 mg/ml (5 μM as subunit).

MMTS-inactivated PaBADH (not shown) indicates that the mixed disulfide bond formed upon disulfiram modification of the enzyme is fully accessible to the solvent. It is also possible that the pK_a of the thiol group of C286 is higher than that of the leaving thiol group of disulfiram, so that GSH displaces the latter and forms a C286-GSH mixed disulfide, which results in an equally inactive enzyme. This is highly improbable, however, as the thiol group of C286 has a pK_a of only 4 [13], much lower than that of GSH, which is 9.0 [39]. The most likely explanation for the failure of GSH to revert the disulfiram modification of PaBADH and other ALDHs is that the reduction potential of GSH is not low enough to act as an electron donor and reduce the mixed disulfide formed. This is consistent with the high nucleophilicity of the active site cysteine, which might stabilize the disulfide bond and protect it from the nucleophilic attack of GSH. Although the reactivation by GSH of the MMTS-inactivated enzyme argues against this possibility, it cannot be ruled out as the reduction potential of a mixed disulfide is also influenced by non-covalent interactions between the molecules forming the disulfide [37].

The irreversible structural changes also took place in the DSF-inactivated PaBADH when the modification was carried out at 23 °C, although at a much slower rate than at 37 °C. This is indicated by the finding that the degree of maximum reactivation by DTT decreased as the time elapsed between inactivation and treatment with the reductant increases (Fig. 4). As found in the experiments at 37 °C, $NADP^+$ did not prevent the irreversible structural

changes but slowed down the rate at which they took place (Fig. 4). The estimated half-times, $t_{1/2}$, for these changes were 24.2 ± 1.6 and 45.7 ± 1.9 h in the absence and presence of the dinucleotide, respectively.

Concluding remarks

Assuming that PaBADH could be a suitable target for killing or attenuating the growth of *P. aeruginosa* in a medium in which both high-salt concentrations and choline or choline precursors are present, our results suggest that chemically modifying the essential cysteinyl residue with disulfiram might be an effective strategy against this bacterium. The use of thiol reagents as drugs can, however, lead to severe adverse consequences by irreversibly modifying dozens of thiol proteins in the host, and therefore it is necessary to achieve a very high level of specificity for the desired target protein. Disulfiram appears to have the desired specificity as it has been widely used for years in the aversion treatment of alcoholism without severe effects, other than those called “the disulfiram-ethanol reaction”—headache, flushing, dizziness, vomiting, blurred vision, and hypotension [18]—which can be prevented by avoiding ingestion of ethanol. That PaBADH could be effectively and irreversibly inactivated in vivo by disulfiram is supported by its high in vitro sensitivity to this drug, the irreversibility of the disulfiram-induced PaBADH structural changes at physiological temperature, and the inability of $NAD(P)^+$ to prevent, or even decrease, the chemical modification and the accompanying structural changes.

In addition, our results—showing the potential impact of targeting the active site of PaBADH with bulky thiol reagents—pave the way for future development of other compounds that may be clinically useful in combating the bacterium.

Acknowledgments

This work was supported by grants to RAM-C from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 37820-N) and UNAM (PAPIIT IN 206505). L.G.S. and V.Z.C. received scholarships from CONACYT and Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), UNAM.

References

- [1] 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.
- [2] J.R. Wright, J.A. Clements, Metabolism and turnover of lung surfactant, *Am. Rev. Respir. Dis.* 136 (1987) 426–444.
- [3] 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.
- [4] T. Nagasawa, Y. Kawabata, Y. Tani, K. Ogata, Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16, *Agric. Biol. Chem.* 40 (1976) 1743–1749.

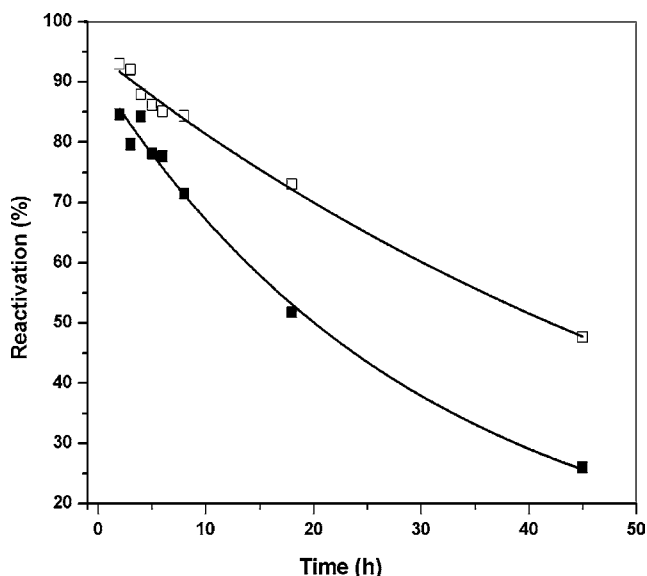


Fig. 4. Ability of DTT to reactivate the disulfiram-treated enzymes in the absence (closed squares) or presence of 300 μM $NADP^+$ (open squares) at progressively longer periods of times after inactivation with 50 μM disulfiram was completed. At the indicated time periods after inactivation, the enzymes were treated with 10 mM DTT for 90 min and their recovery of activity was measured. The lines represent the best fit of the data to the equation for single exponential decay obtained by non-linear regression. Enzyme concentration was 0.3 mg/ml (5 μM as subunit).

- [5] R. Velasco-García, M.A. Villalobos, M.A. Ramírez-Romero, C. Mújica-Jiménez, G. Iturriaga, R.A. Muñoz-Clares, Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt, Arch. Microbiol. (2005), in press, doi:10.1007/s00203-005-0054-8.
- [6] L.N. Csonka, A.D. Hanson, Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology, Annu. Rev. Microbiol. 45 (1991) 569–606.
- [7] J.P. Kilbourn, Bacterial content and ionic composition of sputum in cystic fibrosis, Lancet 311 (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] V.D. Shortridge, A. Lazdunski, M.L. Vasil, Osmoprotectants and phosphate regulate expression of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*, Mol. Microbiol. 6 (1992) 863–871.
- [10] R.M. Ostroff, B. Wretling, M.L. Vasil, Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*, J. Bacteriol. 172 (1990) 5915–5923.
- [11] A.E. Sage, A.I. Vasil, M.L. Vasil, Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*, Mol. Microbiol. 23 (1997) 43–56.
- [12] B. Rathinasabapathi, K.F. McCue, D.A. Gage, A.D. Hanson, Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance, Planta 193 (1996) 155–162.
- [13] 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.
- [14] R. Velasco-García, V.M. Chacón-Aguilar, D. Hervert-Hernández, R.A. Muñoz-Clares, Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* leaves by disulfiram, Chem.-Biol. Interact. 143–144 (2003) 149–158.
- [15] E.M. Valenzuela-Soto, R. Velasco-García, C. Mújica-Jiménez, L. Gaviria-González, R.A. Muñoz-Clares, Monovalent cations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidney and amaranth leaves, Chem.-Biol. Interact. 143–144 (2003) 139–148.
- [16] L. González-Segura, R. Velasco-García, E. Rudiño-Piñera, C. Mújica-Jiménez, R.A. Muñoz-Clares, Site-directed mutagenesis and homology modeling indicate an important role of cysteine 439 in the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, Biochimie 87 (2005) 1056–1064.
- [17] J. Hald, E. Jacobsen, A drug sensitizing the organism to the ethyl alcohol, Lancet 2 (1948) 1001–1004.
- [18] T. Kitson, The disulfiram-ethanol reaction. A review, J. Stud. Alcohol 202 (1977) 96–113.
- [19] K.M. Carroll, L.R. Fenton, S.A. Ball, C. Nich, T.L. Frankforter, J. Shi, B.J. Rounsaville, Efficacy of disulfiram and cognitive behavior therapy in cocaine-dependent outpatients: a randomized placebo-controlled trial, Arch. Gen. Psychiatry 61 (2004) 264–272.
- [20] M. Sofuoglu, T.R. Kosten, Novel approaches to the treatment of cocaine addiction, CNS Drugs 19 (2005) 13–25.
- [21] T.W. Loo, D.M. Clarke, Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism, J. Natl. Cancer Inst. 92 (2000) 898–902.
- [22] S.G. Shiah, Y.R. Kao, F.Y.H. Wu, C.W. Wu, Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram, Mol. Pharmacol. 64 (2003) 1076–1084.
- [23] W. Wang, H.L. McLeod, J. Cassidy, Disulfiram-mediated inhibition of NF- κ B activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines, Int. J. Cancer 104 (2003) 504–511.
- [24] S.S. Brar, C. Grigg, K.S. Wilson, W.D. Holder Jr., D. Dreau, C. Austin, M. Foster, A.J. Ghio, A.R. Whorton, G.W. Stowell, L.B. Whittall, R.R. Whittle, D.P. White, T.P. Kennedy, Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease, Mol. Cancer Ther. 3 (2004) 1049–1060.
- [25] D. Cen, D. Brayton, B. Shahandeh, F.L. Meyskens Jr., P.J. Farmer, Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells, J. Med. Chem. 47 (2004) 6914–6920.
- [26] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–256.
- [27] S.C. Gill, P.H. von Hippel, Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, Anal. Biochem. 182 (1989) 319–326.
- [28] R. Velasco-García, C. Mújica-Jiménez, G. Mendoza-Hernández, R.A. Muñoz-Clares, Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, J. Bacteriol. 181 (1999) 1292–1300.
- [29] W.O. McClure, G.M. Edelman, Fluorescent probes for conformational states of proteins. I. Mechanism of fluorescence of 2-*p*-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate, a hydrophobic probe, Biochemistry 5 (1966) 1908–1919.
- [30] R. Velasco-García, L. González-Segura, R.A. Muñoz-Clares, Steady-state kinetic mechanism of NADP⁺- and NAD⁺-dependent reactions catalyzed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, Biochem. J. 352 (2000) 675–683.
- [31] A.H. Neims, D.S. Coffey, J. Hellerman, A sensitive radioassay for sulfhydryl groups with tetraethylthiuram disulfide, J. Biol. Chem. 241 (1966) 3036–3040.
- [32] T.M. Kitson, Mechanism of inactivation of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by disulfiram, Biochem. J. 213 (1983) 551.R–554.R.
- [33] M.L. Shen, J.J. Lipsky, S. Naylor, Role of disulfiram in the in vitro inhibition of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase, Biochem. Pharmacol. 60 (2000) 947–953.
- [34] Vallari, R. Pietruszko, Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition by disulfiram, Science 216 (1982) 637–639.
- [35] J.J. Lipsky, M.L. Shen, S. Naylor, Overview—in vitro inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites, Chem.-Biol. Interact. 130–132 (2001) 81–91.
- [36] M.L. Shen, L.M. Benson, K.L. Johnson, J.J. Lipsky, S. Naylor, Effect of enzyme inhibitors on protein quaternary structure determined by on-line size exclusion chromatography–microelectrospray ionization mass spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 12 (2001) 97–104.
- [37] H.F. Gilbert, Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 63 (1990) 69–172.
- [38] G.L. Newton, K. Arnold, M.S. Price, C. Sherrill, S.B. Delcayre, Y. Aharonowitz, G. Cohen, J. Davies, R.C. Fahey, C. Davies, Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes, J. Bacteriol. 178 (1996) 1990–1995.
- [39] J.U. Flanagan, W. King, M.W. Parker, P.G. Board, G. Chelvanayagam, Ab initio calculations on hidden modulators of theta class glutathione transferase activity, Proteins 39 (2000) 235–243.

Inhibitory Effects of Disulfiram and Its Metabolites on *Pseudomonas aeruginosa* Betaine Aldehyde Dehydrogenase and Growth

Víctor J. Zaldívar-Machorro¹, Patricia Demare², María R. Ramírez², Ignacio Regla², and Rosario A. Muñoz-Clares^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México

²Departamento de Química Orgánica, FES Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México

Abstract

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, EC 1.2.1.8) catalyses the NAD(P)⁺-dependent oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine, an efficient osmoprotectant. In the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* this reaction likely participates in the catabolism of choline or choline precursors, which are abundant in the infected tissues, and in the defense against osmotic and oxidative stresses, which are present in these tissues. PaBADH expression is induced by choline even when bacteria are grown in the presence of other carbon and nitrogen sources, suggesting an important role for this enzymatic activity during infection. Thus, PaBADH appears to be a potential drug target, which is much needed given the high prevalence of antibiotic resistant *P. aeruginosa* strains. In addition to affect the physiological processes in which PaBADH is involved, inhibition of this enzyme would lead to the build-up of the toxic betaine aldehyde. We have previously shown that disulfiram (DSF)—a drug used for years in treatment of alcoholism—inactivated this enzyme in a time- and dose-dependent manner. Since DSF is

readily metabolized *in vivo* to *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamate sulfoxide (MeDDTC-SO) and sulfone (MeDDTC-SO₂), and to *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamate sulfoxide (MeDTC-SO) and sulfone (MeDTC-SO₂), we synthesized the latter three compounds and tested them *in vitro* as inhibitors of PaBADH and of bacterial growth. At 37 °C and pH 7.0, their order of potency as PaBADH inhibitors was: MeDDTC-SO₂>DSF>MeDTC-SO₂>MeDTC-SO, but as *P. aeruginosa* growth inhibitors was: MeDTC-SO₂>MeDDTC-SO₂>MeDTC-SO. Bacterial growth was not affected by DSF and PaBADH inactivation by any of the DSF metabolites was not prevented by NADP⁺. Dithiothreitol was unable to restore the activity of the modified enzyme. Although more studies are needed, the results obtained so far suggest that DSF metabolites might efficiently inhibit PaBADH *in vivo* and that the old drug DSF might have a new therapeutic use.

Keywords: bacterial growth; betaine aldehyde dehydrogenase; chemical modification; disulfiram metabolites; enzyme dissociation and aggregation; enzyme inactivation; *Pseudomonas aeruginosa*

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is one of the most important opportunistic bacterial pathogens in plants, animals, and humans. This gram-negative bacterium has an outstanding ability to grow in an extensive variety of organic compounds and habitats, seeming to be practically ubiquitous (Hardalo and Edberg 1997). It is highly resistant to most antibiotics (Hancock 1998) and thus it is a growing health problem given the increasing immuno-depressed population highly susceptible to infection. These bacteria infect cystic-fibrosis patients, severe burns

victims, chemotherapy patients (Schimpff et al. 1973), and also produce severe corneal and urinary tract infections (Bodey et al. 1983; Govan and Deretic 1996). They can grow in choline as their only carbon and nitrogen source (Nagasawa et al. 1976), which is most significant because the tissues infected—lungs, epithelial cells, cornea, urinary mucosae—are rich in choline or choline precursors, such as phosphatidyl choline, which makes up 70% of the lung surfactant (Wright and Clements 1987), phosphorylcholine or acetylcholine (Pesin and Candia 1982). Choline precursors are converted to cho-

*Corresponding Author. Tel.: +52-55-56225276; fax: +52-55-56225329; email: clares@servidor.unam.mx

line by secreted enzymes: phospholipase C, acid phosphatase, and acetylcholinesterase. The ability of the bacteria to produce one of these enzymes, phospholipase C, correlates with their virulence (Ostroff et al. 1990), suggesting that choline precursors are used and metabolized during infection. This is also supported by the recent finding that the expression of the enzyme involved in the second step of choline metabolism—betaine aldehyde dehydrogenase (betaine aldehyde: NAD(P)⁺ oxidoreductase, EC 1.2.1.8, BADH)—is induced by choline even when bacteria are grown in the presence of other carbon and nitrogen sources (Velasco-García et al. 2006a).

The NAD(P)⁺-dependent betaine aldehyde dehydrogenase from *P. aeruginosa* (PaBADH) might be a suitable target for antimicrobial agents. In addition to participate in the catabolism of choline, this enzyme might be crucial in the mechanisms of defense against osmotic and oxidative stress, conditions both that are present in infected tissues (Kilbourn 1978; Day et al. 2004; Reszka et al. 2006). The product of the reaction, glycine betaine, is a very efficient osmoprotectant, and most likely acts as such in bacterial cells growing in the hyperosmotic environment of infected tissues for it has been found that *P. aeruginosa* is able to thrive under osmotic stress if glycine betaine or compounds that produce glycine betaine—choline or choline precursors—are present (D'Souza-Ault et al. 1993). PaBADH inhibition would prevent or diminish the obtaining of carbon, nitrogen and energy from choline or choline precursors, the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine, and the production of the NADPH needed for the bacterial response to the oxidative stress caused by host defenses. Additionally, the inhibition of BADH has the great advantage that, even if not complete, would give rise to increased levels of betaine aldehyde, a highly toxic compound (Boch et al. 1996; Rathinasa-bapathi et al. 1996). In fact, it has been found that a *P. aeruginosa* strain defective in BADH cannot grow in choline, even if glycine betaine is added to the growth medium, due to the toxicity of betaine aldehyde (Sage et al. 1997).

A good strategy to irreversibly inhibit this enzyme could be the chemical modification of any of its four cysteinyl residues. Particularly C286, the highly reactive catalytic cysteine, or C439, which is located in the interface between monomers in a dimeric unit (González-Segura et al. 2005). For this reason, we have been testing disulfiram (DSF) to

explore its potentiality as a drug to combat *P. aeruginosa* infections. DSF is a thiol reagent which is an approved drug that has been long used to combat alcoholism (Hald and Jacobsen 1948; Kitson 1977) and, more recently, has been suggested to be of potential use in both treating cocaine dependency (Carroll et al. 2004; Sofuoglu and Kosten 2005) and in clinical oncology (Loo and Clarke 2000; Shian et al. 2003; Wang et al. 2003; Brar et al. 2004; Cen et al. 2004). We have previously shown that DSF inactivated PaBADH in a time- and dose-dependent manner (Velasco-García et al. 2003) and that the DSF modification of C286, but not of any of the other PaBADH cysteine residues, lead to dissociation into monomers when the chemical modification was carried out at 23 °C, or to the irreversible formation of aggregates of very high molecular weight when modification was performed at 37 °C (Velasco-García et al. 2006b).

In vivo DSF is readily converted to *N,N*-diethyldithiocarbamate (DDC), which is then methylated to diethyldithiocarbamate methyl ester, also known as *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamate (MeDDTC). The latter compound can be converted either to *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamate sulfoxide (MeDDTC-SO) or to *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamate sulfoxide (MeDTC-SO), which then produce *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamate sulfone (MeDDTC-SO₂) or *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamate sulfone (MeDTC-SO₂), respectively (Fig. 1) (Hu et al. 1997). The DSF-metabolites, rather than DSF itself, are thought to be responsible for the *in vivo* inhibition of mitochondrial liver ALDH2 that leads to the “ethanol-disulfiram reaction” (Hart et al. 1990; Hu et al. 1990; Madam and Faiman 1994; Mays et al. 1996; Mays et al. 1998; Lam et al. 1997; Veverka et al. 1997; Lipsky et al. 2001a; 2001b). In this work we synthesized MeDTC-SO, MeDTC-SO₂, and MeDDTC-SO₂ and tested them *in vitro* as inhibitors of PaBADH and of *P. aeruginosa* growth.

Material and Methods

Materials

Disulfiram, betaine aldehyde chloride, NADP⁺ (sodium salt), dithiothreitol (DTT), 2-mercaptoethanol, EDTA, and dimethylsulfoxide (DMSO) were obtained from Sigma–Aldrich Química, S.A. de C.V. (Toluca, México). MeDTC-SO was prepared by oxidation of *S*-methyl-*N,N*-diethylthiolcarbamate (MeDTC) with sodium metaperiodate, following the method described by Hart and Faiman

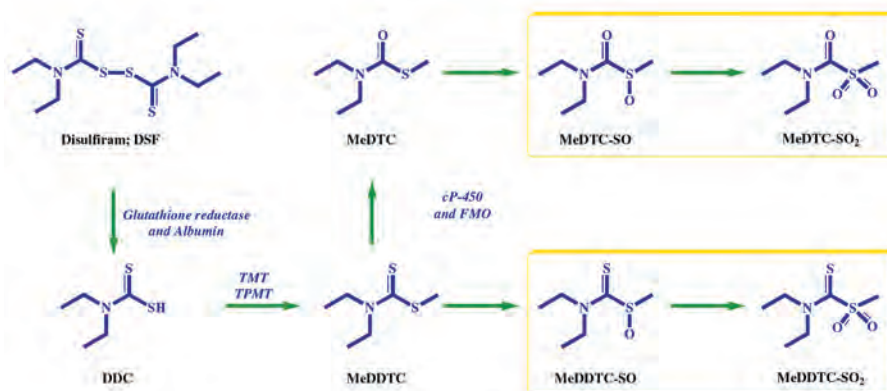


Figure 1. Proposed metabolic pathway for the biotransformation of DSF. The following abbreviations were used: DSF, bis[diethylthiocarbamyl] disulfide; DDC, *N,N*-diethyldithiocarbamic acid; MeDDTC, *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamate; MeDTC, *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamate; MeDDTC-SO, *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamate sulfoxide; MeDDTC-SO₂, *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamate sulfone; MeDTC-SO, *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamate sulfoxide; MeDTC-SO₂, *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamate sulfone; TMT, thiol methyltransferase; TPMT, thiopurine methyltransferase; cP-450, cytochrome P-450 complex; FMO, flavin-containing monooxygenases. In the boxes the DSF metabolites more reactive towards sulphhydryls are shown. Adapted from Hu et al. (1997).

(1992). MeDTC was prepared from *N,N*-diethylthiocarbamoyl chloride and sodium thiomethoxide by a modification—stirring at room temperature in methyl *tert*-butyl ether for 20 h—of the method reported by Gray and Joo (1986); MeDTC-SO₂ was prepared by oxidation of MeDTC with peracetic acid; and MeDDTC-SO₂ was prepared according to the method described by Hu et al. (1997). The purity of the synthesized compounds was confirmed by ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectroscopies. All chemicals used in this study were of analytical grade or the best grade available.

Expression and purification

Recombinant PaBADH was expressed in *Escherichia coli* cells as reported (Velasco-García et al. 2006a), and purified to homogeneity following the two-step procedure previously described (González-Segura et al. 2005). The molar concentration of PaBADH was determined using the method of Bradford (1976), or spectrophotometrically using a molar absorptivity at 280 nm of 52,060 M⁻¹ cm⁻¹, deduced from the amino acid sequence by the method of Gill and von Hippel (1989).

Enzyme assay and chemical modification

PaBADH activity was assayed spectrophotometrically at 30 °C by monitoring the increase in absorbance at 340 nm in a mixture (0.5 mL) consisting of 1.0 mM betaine aldehyde, 0.3 mM NADP⁺, and 1 mM EDTA in 100 mM potassium phosphate,

pH 8.0 (standard assay). Chemical-modification of PaBADH (5 μM as monomers) with DSF and its metabolites (all at 50 μM) was carried out at 37 °C under anaerobic conditions in 50 mM potassium phosphate nitrogen-saturated buffer, pH 6.9, containing 1 mM EDTA, 25 mM KCl, and 10% (v:v) glycerol (modification buffer). Before chemical modification, 2-mercaptoethanol was removed from the enzyme stock solution by extensive dialysis in the modification buffer. Pseudo-first order rate constants were determined by fitting the residual activities at various time periods to a single exponential decay equation. Stock solutions of DSF and DSF metabolites (5 mM each) were prepared in absolute ethanol or DMSO. Enzyme ligands were dissolved in nitrogen-saturated water. Attempts to reactivate the totally inactivated PaBADH were performed by incubation at 37 °C for 24 h with 5 mM DTT.

Size-exclusion chromatography

The oligomeric state of the chemically modified enzyme samples was estimated by size-exclusion chromatography (SEC) on a Superdex 200 HR 10/30 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) connected to a high-pressure chromatography system (Waters, Milford, MA, USA). The column was equilibrated and eluted with modification buffer at room temperature at a flow rate of 0.5 mL/min. Elution was monitored by following absorbance at 280 nm. Before chromatography all samples were fil-

tered (membrane-pore diameter 0.22 μm) or centrifuged to eliminate large aggregates.

Effects of DSF and its metabolites on bacterial growth

The effect of DSF, MeDDTC-SO₂, MeDTC-SO, and MeDTC-SO₂ on the growth of *P. aeruginosa* PAO1 strain cells was tested at 37 °C in agar plates in which filter-paper discs containing 5 μmoles of the inhibitors dissolved in DMSO were placed. The plates contained M63 minimal medium (Miller 1977) supplemented with 20 mM choline, and were inoculated with 100 μL of a bacterial suspension of 2×10^8 CFU/mL (0.5 OD₆₀₀). After an incubation at 37 °C for 18 h, the diameter of the inhibition halo was measured.

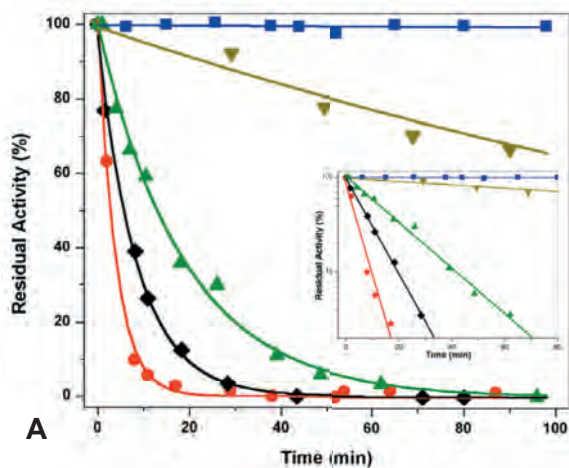
Results and Discussion

Inactivation of PaBADH by MeDDTC-SO₂, MeDTC-SO, and MeDTC-SO₂ at 37 °C, and effect of NADP⁺ on this inactivation

Enzyme inactivation by DSF metabolites (all at 50 μM) under pseudo-first order conditions occurred in a time-dependent manner (Fig. 2A). The resulting semi-log plots of the percent of remaining enzyme activity versus time were linear (inset Fig. 2A), consistent with the kinetics the inactivation being first-order. For comparative purposes DSF-mediated enzyme inactivation was also measured. In the absence of the reagents but in the presence of 1% (v/v) absolute ethanol, used as the reagents vehicle, no changes in enzymatic activity was observed. As previously found in experiments carried out with DSF (Velasco-García et al. 2003), the DSF metabolites caused a total loss of enzyme activity. But different from DSF, which causes PaBADH aggregation (Velasco-García et al. 2006b), none of the DSF metabolites produced changes in the quaternary structure of the enzyme.

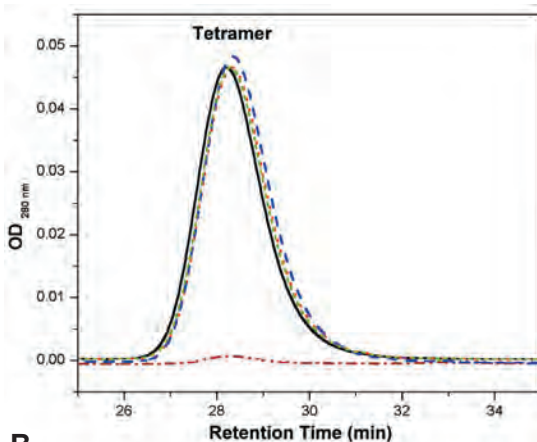
The susceptibility of PaBADH to chemical modification by these compounds was not significantly changed by the presence in the inactivation medium of 300 μM NADP⁺—a concentration that is about 6 times the K_d for this nucleotide (Table 1). The pseudo-first order rate constants given in Table 1 indicate that the order of potency of these compounds as PaBADH inhibitors was: MeDDTC-SO₂>DSF>MeDTC-SO₂>MeDTC-SO.

Enzyme inactivation could not be reverted by addition of 5 mM DTT to the enzyme fully inactivated by any of the DSF metabolites (results not



A

Figure 2. Effects of MeDDTC-SO₂, MeDTC-SO, and MeDTC-SO₂ on PaBADH activity and oligomeric state. (A) Time courses of enzyme inactivation by incubation at pH 6.9 and 37 °C without (squares) or with 50 μM of each of the following compounds: MeDDTC-SO₂ (circles), MeDTC-SO (down triangles), MeDTC-SO₂ (up triangles), and DSF (rhombuses). The remaining enzyme activity was measured at the indicated times. The points are the experimental data while the lines are theoretical, based on the best fit of the data to a single exponential decay equation. Inset: Semi-log plot of the data in the main panel. (B) SEC elution profiles of enzyme samples after 2 h incubation at pH 6.9 and 37 °C with 50 μM of each of the following compounds: MeDDTC-SO₂ (dashed line), MeDTC-SO (short-dashed line), MeDTC-SO₂ (dotted line), and DSF (dashed-and-dotted line). In the case of the DSF-inactivated enzyme, the high molecular weight aggregates formed were removed by centrifugation previous to SEC. Enzyme concentration was 0.3 mg/mL (5 μM as subunit).



B

Table 1. Kinetics of inactivation of PaBADH by DSF metabolites at pH 6.9 and 37 °C in the absence and presence of NADP⁺.

| Compound | k_{obs} (min ⁻¹) | |
|------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| | - NADP ⁺ | + NADP ⁺ |
| DSF | 0.120 ± 0.004 | 0.083 ± 0.002 |
| MeDDTC-SO ₂ | 0.256 ± 0.010 | 0.136 ± 0.013 |
| MeDTC-SO ₂ | 0.053 ± 0.003 | 0.047 ± 0.006 |
| MeDTC-SO | 0.004 ± 0.001 | 0.004 ± 0.000 |

Pseudofirst-order rate constants for inactivation ± S.E. were estimated by fitting the inactivation data to a single exponential decay equation using nonlinear regression. Enzyme concentration was 0.3 mg/mL (5 μM as subunit); DSF and DSF metabolites were 50 μM, and NADP⁺ 300 μM.

shown). The failure of DTT to reactivate PaBADH is consistent with stable carbamoyl-cysteine or thiocarbamoyl-cysteine adducts being formed as a result of the nucleophilic attack of the PaBADH catalytic thiolate on the carbonyl or thiocarbonyl group of the DSF metabolites, respectively, as shown in Fig. 3. Preliminary mass spectrometry analysis indicated that these adducts are indeed formed (results not shown). These adducts were also detected after treatment of ALDH with DSF metabolites (Hu et al. 1997; Veverka et al. 1997; Shen et al. 2000). This lack of reversibility was an important finding that encouraged our further stud-

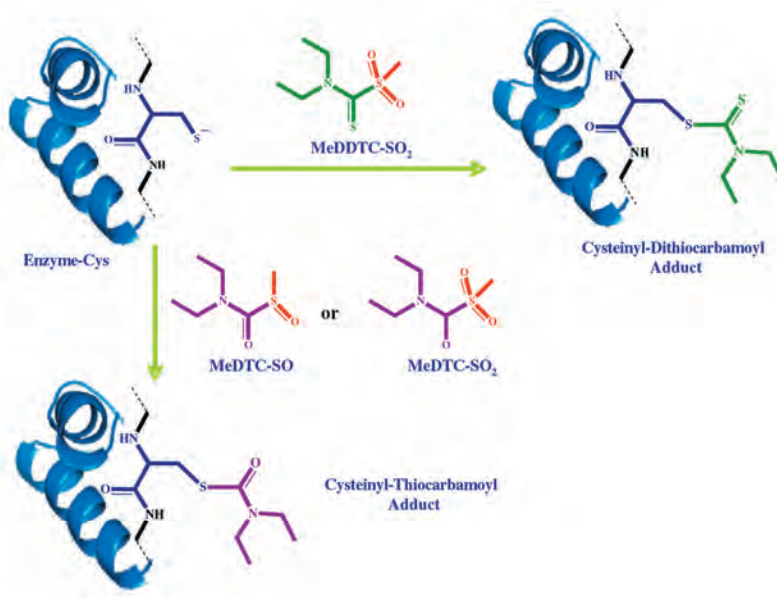
ies with DSF metabolites as potential antimicrobial agents.

Inhibition of *P. aeruginosa* growth by MeDDTC-SO₂, MeDTC-SO, and MeDTC-SO₂

The ability of DSF and its three metabolites to inhibit bacterial growth was investigated using the disk diffusion test at 37 °C. Unsurprisingly bacterial growth was not affected by DSF because it is easily converted by reduction of its disulfide into *N,N*-diethyldithiocarbamate (DDC) (Fig. 1)—a compound that is a poor reagent towards thiol groups. It appears that *P. aeruginosa* lacks the ability to further metabolize DDC, as bacterial growth was affected by any of the DSF metabolites tested (Fig. 4). Their order of effectiveness was: MeDTC-SO₂>MeDDTC-SO₂>MeDTC-SO. The observed differences in their order of potency as inhibitors of PaBADH or of bacterial growth may be due to differences in their effective intracellular concentration, related either to their amount of transport into the bacterial cells or to their reactivity towards physiological reductants, such as reduced glutathione or thiorredoxins.

So far our results do not indicate which is (are) the intracellular target(s) of the DSF metabolites, for they could be modifying other enzyme(s) or protein(s) different or in addition to PaBADH. Further studies are required to clarify this point. Whatever the target, it will be important to determine the minimal inhibitory concentration (MIC)

Figure 3. Possible reactions of MeDDTC-SO₂, MeDTC-SO, and MeDTC-SO₂ with a protein thiolate group. Protein thiolates can attack either the thiocarbonyl carbon or the carbonyl carbon of the DSF metabolites forming cysteinyl-dithiocarbamoyl or cysteinyl-thiocarbamoyl adducts, respectively.



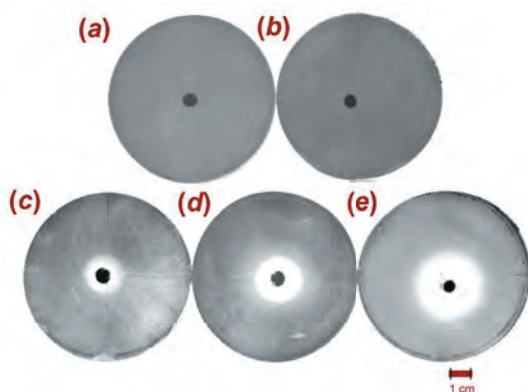


Figure 4. Inhibition of *P. aeruginosa* cells growth by DSF and its metabolites. Filter-paper disc containing DMSO (a), or 5 μ moles of each of the following: DSF (b), MeDDTC-SO₂ (c), MeDTC-SO (d), or MeDTC-SO₂ (e), each dissolved in DMSO, were placed on agar plates containing M63 minimal medium supplemented with 20 mM choline, and inoculated with 100 μ L of a bacterial suspension of 2×10^8 CFU/mL (0.5 OD₆₀₀). The plates were incubated at 37 °C for 18 h after which the diameter of the inhibition halo was measured. No inhibition was observed in (a) and (b). The order of growth inhibition by disulfiram metabolites was: MeDTC-SO₂ > MeDTC-SO > MeDDTC-SO₂.

of the DSF metabolites on *P. aeruginosa* growth to evaluate whether DSF—which once administered will produce any of the DSF metabolites tested in this study—is clinically useful in combating this important pathogen. To make this evaluation it is necessary to know the concentrations of DSF metabolites in human plasma after the administration of therapeutic dosage of DSF. As yet we have a limited knowledge of these concentrations not only in humans (Johansson 1988) but also in rats (Hart et al. 1990).

Acknowledgments

This work was supported by a grant to RAMC from Dirección General de Apoyo al Personal Académico, UNAM (PAPIIT IN206505).

References

- Boch, J., Kempf, B., Schmid, R., and Bremer, E. 1996. Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the gbsAB genes. *J Bacteriol* **178**: 5121-5129.
- Bodey, G.P., Bolivar, R., Fainstein, V., and Jadeja, L. 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* **5**: 279-313.
- 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.
- Brar, S.S., Grigg, C., Wilson, K.S., Holder, W.D., Jr., Dreau, D., Austin, C., Foster, M., Ghio, A.J., Whorton, A.R., Stowell, G.W., et al. 2004. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Mol Cancer Ther* **3**: 1049-1060.
- Carroll, K.M., Fenton, L.R., Ball, S.A., Nich, C., Frankforter, T.L., Shi, J., and Rounsaville, B.J. 2004. Efficacy of disulfiram and cognitive behavior therapy in cocaine-dependent outpatients: a randomized placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry* **61**: 264-272.
- Cen, D., Brayton, D., Shahandeh, B., Meyskens, F.L., Jr., and Farmer, P.J. 2004. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J Med Chem* **47**: 6914-6920.
- D'Souza-Ault, M.R., Smith, L.T., and Smith, G.M. 1993. Roles of N-acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl Environ Microbiol* **59**: 473-478.
- Day, B.J., van Heeckeren, A.M., Min, E., and Velsor, L.W. 2004. Role for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein in a glutathione response to bronchopulmonary *Pseudomonas* infection. *Infect Immun* **72**: 2045-2051.
- Gill, S.C., and von Hippel, P.H. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**: 319-326.
- González-Segura, L., Velasco-García, R., Rudiño-Piñera, E., Mújica-Jiménez, C., and Muñoz-Clares, R.A. 2005. Site-directed mutagenesis and homology modeling indicate an important role of cysteine 439 in the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* **87**: 1056-1064.
- Govan, J.R., and Deretic, V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**: 539-574.
- Hald, J., and Jacobsen, E. 1948. A drug sensitizing the organism to the ethyl alcohol. *Lancet* **2**: 1001-1004.

- Hancock, R.E. 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* **27** Suppl 1: S93-99.
- Hardalo, C., and Edberg, S.C. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol* **23**: 47-75.
- Hart, B.W., Yourick, J.J., and Faiman, M.D. 1990. S-methyl-N,N-diethylthiolcarbamate: a disulfiram metabolite and potent rat liver mitochondrial low Km aldehyde dehydrogenase inhibitor. *Alcohol* **7**: 165-169.
- Hu, P., Jin, L., and Baillie, T.A. 1997. Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary N-acetylcysteine conjugates. *J Pharmacol Exp Ther* **281**: 611-617.
- Johansson, B. 1988. Stabilization and quantitative determination of disulfiram in human plasma samples. *Clin Chim Acta* **177**: 55-63.
- Kilbourn, J.P. 1978. Bacterial content and ionic composition of sputum in cystic fibrosis. *Lancet* **1**: 334.
- Kitson, T.M. 1977. The disulfiram—ethanol reaction: a review. *J Stud Alcohol* **38**: 96-113.
- Lam, J. P., D. C. Mays, and J. J. Lipsky. 1997. Inhibition of recombinant human mitochondrial and cytosolic aldehyde dehydrogenases by two candidates for the active metabolites of disulfiram. *Biochemistry* **36**:13748-13754.
- Lipsky, J.J., Shen, M.L., and Naylor, S. 2001a. In vivo inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Chem Biol Interact* **130-132**: 93-102.
- Lipsky, J.J., Shen, M.L., and Naylor, S. 2001b. Overview—in vitro inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites. *Chem Biol Interact* **130-132**: 81-91.
- Loo, T.W., and Clarke, D.M. 2000. Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. *J Natl Cancer Inst* **92**: 898-902.
- Madan, A., and M. D. Faiman. 1994. Diethyldithiocarbamate methyl ester sulfoxide, an inhibitor of rat liver mitochondrial low Km aldehyde dehydrogenase and putative metabolite of disulfiram. *Alcohol Clin Exp Res* **18**:1013-1017.
- Mays, D. C., A. N. Nelson, J. Lam-Holt, A. H. Fauq, and J. J. Lipsky. 1996. S-methyl-N,N-diethylthiocarbamate sulfoxide and S-methyl-N,N-diethylthiocarbamate sulfone, two candidates for the active metabolite of disulfiram. *Alcohol Clin Exp Res* **20**:595-600.
- Mays, D. C., P. Ortiz-Bermudez, J. P. Lam, I. H. Tong, A. H. Fauq, and J. J. Lipsky. 1998. Inhibition of recombinant human mitochondrial aldehyde dehydrogenase by two intermediate metabolites of disulfiram. *Biochem Pharmacol* **55**:1099-1103.
- Miller, J.H. 1977. Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor* 3rd edn.: pp 431-435.
- Nagasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y., and Ogata, K. 1976. Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Agr. Biol. Chem.* **40**: 1743-1749.
- Ostroff, R.M., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. 1990. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **172**: 5915-5923.
- Pesin, S.R., and Candia, O.A. 1982. Acetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **22**: 651-659.
- Rathinasabapathi, B., McCue, K.F., Gage, D.A., and Hanson, A.D. 1996. Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta* **193**: 155-162.
- Reszka, K.J., Denning, G.M., and Britigan, B.E. 2006. Photosensitized oxidation and inactivation of pyocyanin, a virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Photochem Photobiol.* **82**: 466-473.
- Sage, A.E., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. 1997. Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* **23**: 43-56.
- Schimpff, S.C., Greene, W.H., Young, V.M., and Wiernik, P.H. 1973. *Pseudomonas* septicemia: incidence, epidemiology, prevention and therapy in patients with advanced cancer. *Eur J Cancer* **9**: 449-455.
- Shen, M. L., K. L. Johnson, D. C. Mays, J. J. Lipsky, and S. Naylor. 2000. Identification of the protein-drug adduct formed between aldehyde dehydrogenase and S-methyl-N,N-diethylthiocarbamoyl sulfoxide by on-line proteolytic digestion

- high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**:918-923.
- Shian, S.G., Kao, Y.R., Wu, F.Y., and Wu, C.W. 2003. Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram. *Mol Pharmacol* **64**: 1076-1084.
- Sofuoglu, M., and Kosten, T.R. 2005. Novel approaches to the treatment of cocaine addiction. *CNS Drugs* **19**: 13-25.
- Velasco-García, R., Chacón-Aguilar, V.M., Hervet-Hernández, D., and Muñoz-Clares, R.A. 2003. Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves by disulfiram. *Chem Biol Interact* **143-144**: 149-158.
- Velasco-García, R., Villalobos, M.A., Ramírez-Romero, M.A., Mújica-Jiménez, C., Iturriaga, G., Muñoz-Clares, R.A. 2006a. Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt. *Arch. Microbiol.* **185**: 14-22.
- Velasco-García, R., Zaldívar-Machorro, V.J., Mújica-Jiménez, C., González-Segura, L., and Muñoz-Clares, R.A. 2006b. Disulfiram irreversibly aggregates betaine aldehyde dehydrogenase—a potential target for antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* **341**: 408-415.
- Veverka, K.A., Johnson, K.L., Mays, D.C., Lipsky, J.J., and Naylor, S. 1997. Inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and its metabolite methyl diethylthiocarbamoyl-sulfoxide. *Biochem Pharmacol* **53**: 511-518.
- Wang, W., McLeod, H.L., and Cassidy, J. 2003. Disulfiram-mediated inhibition of NF-kappaB activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer* **104**: 504-511.
- Wright, J.R., and Clements, J.A. 1987. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* **136**: 426-444.



Research paper

The disulfiram metabolites *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamoyl sulfoxide and *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamoyl sulfone irreversibly inactivate betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, both *in vitro* and *in situ*, and arrest bacterial growth

Víctor J. Zaldívar-Machorro^a, Manuel López-Ortiz^b, Patricia Demare^b, Ignacio Regla^b, Rosario A. Muñoz-Clares^{a,*}

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

^bFacultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 09230, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2010

Accepted 29 September 2010

Available online 7 October 2010

Keywords:

Irreversible enzyme modification
Inactivation kinetics
Choline catabolism
Aldehyde toxicity
Chemotherapy

ABSTRACT

Betaine aldehyde dehydrogenase from the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) catalyzes the irreversible, NAD(P)⁺-dependent oxidation of betaine aldehyde, producing glycine betaine, an osmoprotectant. PaBADH participates in the catabolism of choline and likely in the defense against the osmotic and oxidative stresses to which the bacterium is exposed when infecting human tissues. Given that choline or choline precursors are abundant in infected tissues, PaBADH is a potential drug target because its inhibition will lead to the build up of the toxic betaine aldehyde inside bacterial cells. We tested the thiol reagents, disulfiram (DSF) and five DSF metabolites—diethyldithiocarbamic acid (DDC), *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamoyl sulfoxide (MeDDTC-SO) and sulfone (MeDDTC-SO₂), and *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamoyl sulfoxide (MeDTC-SO) and sulfone (MeDTC-SO₂)—as inhibitors of PaBADH and *P. aeruginosa* growth. As *in vitro* PaBADH inhibitors, their order of potency was: MeDDTC-SO₂ > DSF > MeDTC-SO₂ > MeDDTC-SO > MeDTC-SO. DDC did not inactivate the enzyme. PaBADH inactivation by DSF metabolites (i) was not affected by NAD(P)⁺, (ii) could not be reverted by dithiothreitol, and (iii) did not affect the quaternary structure of the enzyme. Of the DSF metabolites tested, MeDTC-SO₂ and MeDDTC-SO produced significant *in situ* PaBADH inactivation and arrest of *P. aeruginosa* growth in choline containing media, in which the expression of PaBADH is induced. They had no effect in media lacking choline, indicating that PaBADH is their main intracellular target, and that arrest of growth is due to accumulation of betaine aldehyde. The *in vitro* and *in situ* kinetics of enzyme inactivation by these two compounds were very similar, indicating no restriction on their uptake by the cells. MeDDTC-SO₂ and DSF have no inhibitory effects *in situ*, probably because their high reactivity towards intracellular nonessential thiols causes their depletion. Our results support that PaBADH is a promising target to treat *P. aeruginosa* infections, and that some DSF metabolites might be of help in this aim.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Abbreviations: ALDH2, aldehyde dehydrogenase mitochondrial; DTT, dithiothreitol; DDC, diethyldithiocarbamic acid; DMSO, dimethyl sulfoxide; DSF, disulfiram; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EI-MS, electron impact mass spectrometry; IR, infrared; MeDDTC, *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamoyl sulfide; MeDDTC-SO, *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamoyl sulfoxide; MeDDTC-SO₂, *S*-methyl-*N,N*-diethyldithiocarbamoyl sulfone; MeDTC, *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamate; MeDTC-SO, *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamoyl sulfoxide; MeDTC-SO₂, *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamoyl sulfone; MeSO, methyl sulfoxide; MeSO₂, methyl sulfone; NMR, nuclear magnetic resonance; PaBADH, betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*.

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

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

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is one of the most important bacterial pathogens in plants, animals, and humans. This gram-negative bacterium has an outstanding ability to grow in an extensive variety of organic compounds and habitats, seeming to be practically ubiquitous [1]. In humans, it infects cystic-fibrosis patients [2], severe burns victims [3], chemotherapy [4] and AIDS patients [5], and also produce severe corneal [6] and urinary tract infections [7]. It is a growing health problem given the increasing immunodepressed population highly susceptible to infection. The high

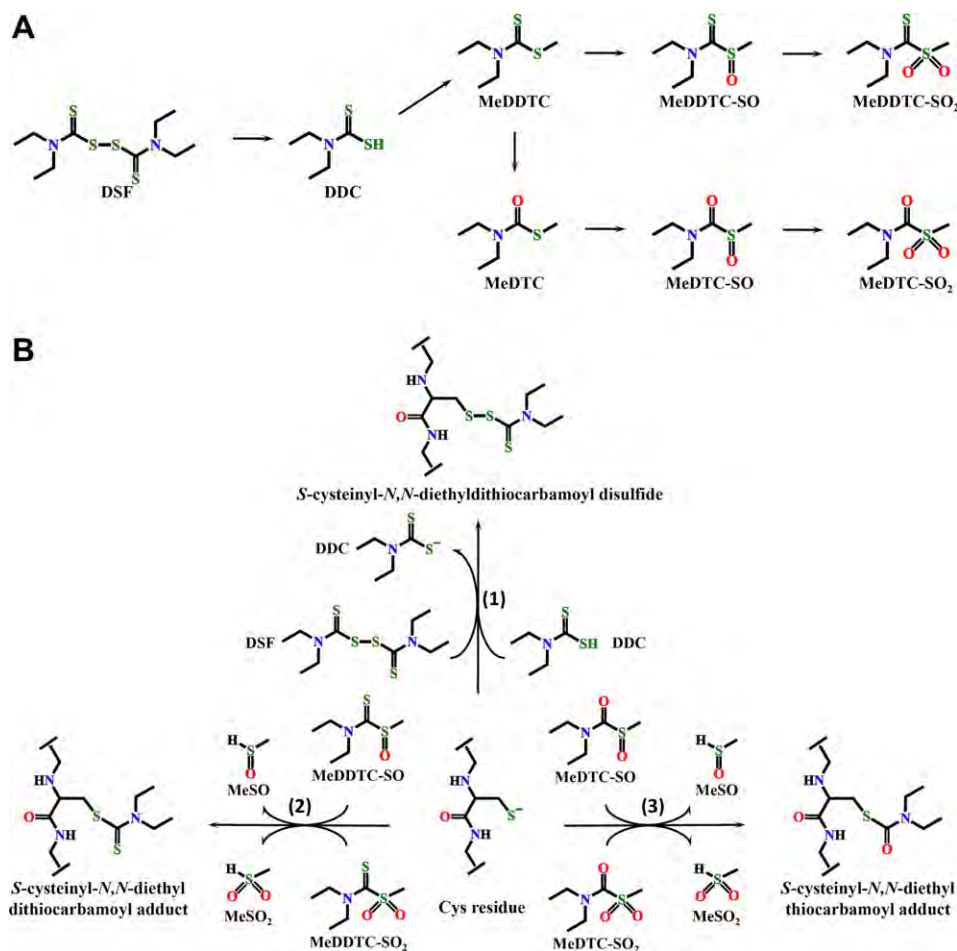
prevalence of *P. aeruginosa* strains resistant to antibiotics [8] stressed the need for new antimicrobial agents.

P. aeruginosa can grow in choline as their only carbon and nitrogen source [9]. This is most significant because the tissues infected—lungs, epithelial cells, cornea, urinary mucosa—are rich in choline or choline precursors such as phosphatidylcholine—which makes up 70% of the lung surfactant [10]—, phosphorylcholine or acetylcholine [11]. These compounds are converted to choline by enzymes secreted by the bacterium to its surrounding medium: phospholipase C, acid phosphatase, and acetylcholinesterase, respectively. The ability of the bacterium to produce one of these enzymes, phospholipase C, correlates with its virulence when infecting the lungs of the patients with cystic fibrosis [12], suggesting that choline precursors are used and metabolized during infection. This is also supported by the finding that the expression of the enzyme involved in the second step of choline metabolism—betaine aldehyde dehydrogenase (betaine aldehyde: NAD(P)⁺ oxidoreductase, EC 1.2.1.8, BADH)—is induced by choline even when *P. aeruginosa* cells are grown in the presence of other carbon and nitrogen sources such as glucose and ammonium [13].

BADH from *P. aeruginosa* (PaBADH) appears to be a suitable target for antimicrobial agents. In addition to participate in the catabolism of choline, this enzyme might be crucial in the mechanisms of defense against osmotic and oxidative stress, conditions both that are present in infected tissues [14]. The acid product of

the PaBADH reaction, glycine betaine, is a very efficient osmoprotectant and most likely acts as such in *P. aeruginosa* cells growing in the hyperosmotic environment of infected tissues [15]. In addition, PaBADH is one of the few aldehyde dehydrogenases that can use NADP⁺ with similar efficiency to NAD⁺ [16], a property that can be used by the bacteria to produce the NADPH needed to combat the oxidative stress imposed by the host defenses [17]. PaBADH inhibition will, therefore, prevent or diminish the obtaining of carbon, nitrogen and energy from choline or choline precursors, as well as impair the bacterial response to osmotic and oxidative stresses. Most importantly, the inhibition of PaBADH has the great advantage that, even if not complete, will give rise to increased intracellular levels of betaine aldehyde, a highly toxic compound [18]. In fact, a *P. aeruginosa* strain defective in BADH cannot grow in choline, even if glucose is also present in the growth medium, due to the toxicity of betaine aldehyde [19]. The finding that PaBADH is expressed in the presence of other carbon compounds such as glucose—provided that choline is also present in the bacterial growth medium [13]—supports the feasibility of using its inhibition as a mean to combat the pathogen.

To irreversibly inhibit this enzyme a good strategy could be the chemical modification of its highly reactive catalytic cysteine, Cys286. With this aim, we have been testing disulfiram (DSF), a thiol reagent that is an approved drug long and widely used to combat alcoholism by inhibiting an aldehyde dehydrogenase,



Scheme 1. (A) Proposed pathway for the biotransformation of DSF (adapted from [23]). (B) Proposed reactions of DSF and DSF metabolites with a protein thiolate group (adapted from [28–30]). (1) As result of the nucleophilic attack of the protein thiolate on the disulfide bond of DSF, or on the thiol group of DDC, a mixed disulfide is formed. DDC is released in the reaction with DSF. (2) When the thiolate nucleophilic attack is on the thiocarbonyl group (C=S) of MeDDTC-SO or MeDDTC-SO₂ a *S*-cisteinyl-*N,N*-diethyl-dithiocarbamoyl adduct is produced. (3) The nucleophilic attack on the carbonyl group (C=O) of MeDTC-SO or MeDTC-SO₂ forms a *S*-cisteinyl-*N,N*-diethyl-thiocarbamoyl adduct. MeSO or MeSO₂ are released in reactions (2) or (3).

ALDH2 [20]. We have previously found that, *in vitro*, DSF forms a mixed disulfide with the catalytic cysteine of PaBADH, leading to enzyme inactivation [21] and to the irreversible formation of protein aggregates of very high molecular weight [22]. It thus appears that DSF might be a potential drug to combat *P. aeruginosa* infections. *In vivo*, DSF is readily metabolized following the route depicted in Scheme 1A [23]. First, DSF is reduced to DDC by glutathione reductase [24]. DDC is then methylated to MeDDTC [25], which can be converted either to MeDDTC-SO [26] or MeDTC-SO [27]. The sulfoxides are then oxidized to the respective sulfones: MeDDTC-SO₂ or MeDTC-SO₂ [28]. The sulfoxides and sulfones form Cys-*N,N*-diethyl(di)thiocarbamoyl adducts with the catalytic cysteine of some aldehyde dehydrogenases (ALDHs) (Scheme 1B) [28–30]. In fact, these DSF-metabolites, rather than DSF itself, are thought to be responsible for the *in vivo* inhibition of mitochondrial liver ALDH2 that causes the “ethanol-disulfiram reaction” [29,31,32]. This led us to test these compounds as *in vitro* and *in situ* inhibitors of PaBADH, as well as inhibitors of the *in vitro* growth of *P. aeruginosa* cells. The results reported here show that PaBADH is inactivated *in vitro* and *in situ* by two of the DSF metabolites, which also arrest bacterial growth, suggesting both that this enzyme is a promising target to treat *P. aeruginosa* infections, and that these compounds might be of use as antimicrobial agents, or as lead compounds to develop more specific or potent inhibitors.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strain and culture

The *P. aeruginosa* strain tested was the wild-type reference strain PAO1. The bacterium was grown aerobically at 37 °C in Luria-Bertani medium containing 20 mM choline, and stored in 50% (v/v) sterile glycerol at –80 °C until used. To test the effect of DSF and DSF metabolites, *P. aeruginosa* cells were grown at 37 °C and pH 7.2, in: minimal medium containing 16 mM glucose and 15 mM NH₄Cl as carbon and nitrogen sources (M9) [33]; M9 medium plus 20 mM choline (M9 + C); or in a modified M9 medium in which glucose and NH₄Cl were substituted by 20 mM choline as the only carbon and nitrogen source (M9C). Bacterial growth was followed by optical density at 600 nm.

2.2. Reagents

Disulfiram, DDC sodium salt, diethylthiocarbamoyl chloride, sodium thiomethoxide, sodium metaperiodate, betaine aldehyde chloride inner salt, NADP⁺ sodium salt, DTT, 2-mercaptoethanol, EDTA, and DMSO were obtained from Sigma–Aldrich (Toluca, México). MeDTC, MeDTC-SO, MeDTC-SO₂, MeDDTC-SO were synthesized as described below. All other chemicals used in this study were of analytical grade or of the best grade available.

2.3. Chemical syntheses

The purity of the synthesized compounds was confirmed by ¹H and ¹³C NMR, and by IR and EI-MS spectroscopies. NMR spectra were acquired in a JEOL Eclipse instrument at 300 MHz, using tetramethylsilane as internal standard and CDCl₃ as solvent. IR spectra were obtained in a Perkin Elmer 203-B spectrometer in the 4000–400 cm^{–1} spectral region. EI-MS was run on a HP 5989-A mass spectrometer.

MeDTC was synthesized by two methods. The first, from *N,N*-diethylthiocarbamoyl chloride and sodium thiomethoxide by a modification of the method reported [34], which consisted in stirring the reaction mixture at room temperature in methyl *tert*-butyl ether for 20 h. The second, following a modification of the

method described by Mizuno et al. [35], which briefly consisted in a multi-component reaction of CO, sulfur and diethylamine carried out at 25 °C and 413.7 kPa, and then alkylation of the product with dimethyl sulfate at 15 °C during addition and a further incubation at 25 °C for 16 h. In both cases, a colorless liquid with an 83% yield was obtained. IR_{film} (neat): 2975.6, 2932.7, 1649.8, 1458.8, 1407, 1307.8, 1250.6, 1117.5, 861.1 cm^{–1}; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.17 [t, *J* = 7 Hz, 6H], 2.32 [s, 3H], 3.39 [c, *J* = 6.93 Hz, 4H]; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 12.7, 13.3, 41.9, 167.5.

MeDTC-SO was prepared by oxidation of MeDTC with sodium metaperiodate, following the method in the literature [36]. An orange liquid with 73% yield was obtained. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-a), 1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H-a'), 2.77 (s, 3H, H-c), 3.47 (dc, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-b), 3.58 (dd, *J* = 3.6 Hz, 2H, H-b'); ¹³C MNR (75 MHz, CDCl₃, TMS): δ 12.54 (CH₃, C-a), 14.52 (CH₃, C-a'), 37.38 (S-CH₃), 41.08 (CH₂, C-b), 42.89 (CH₂, C-b'), 167.95 (C=O); MS (*m/z*, %): 44(82) [⁺CO₂], 47 (3) [⁺SCH₃], 64 (11) [⁺OSCH₃], 72 (96) [(CH₂)₂N⁺], 100(100) [(CH₂)₂NCO⁺], 116(1) [(CH₂)₂NCO₂⁺].

MeDTC-SO₂ was prepared by oxidation of MeDTC following the published method [32] with a modification consisting in the incubation of MeDTC with an excess of peracetic acid in acetonitrile for 4 h at 25 °C. A colorless oil with 77% yield was obtained. IR_{film} (neat): 2980.1, 2938.3, 1648.9, 1460.4, 1428.4, 1301.4, 1262.8, 1151.6, 1115.9 cm^{–1}; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.22 [t, *J*₁ = 7.2 Hz], 1.30 [t, *J*₂ = 7 Hz, 3H], 3.13 [s, 3H], 3.42 [c, *J* = 7.1 Hz, 2H], 3.75 [c, *J* = 7, 3H]; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 12.1, 13.7, 39.5, 41.4, 42.6, 160.6.

MeDDTC-SO was prepared following the method described [31] but with a greater purity due to a modification of the method. Briefly, 1.32 mL of a solution of 30% hydrogen peroxide was added to 2 g DDC sodium salt in water at 0 °C with stirring for two min. After that, 100 mL of methanol was added to the mixture, followed by 1.6 g of methyl iodide with continuous stirring for 12 h at 4 °C. Then, methanol was evaporated at 25 °C in a rotary evaporator. The organic residue was extracted three times with 30 ml of methylene chloride, dried, and the product purified by silica gel column chromatography eluted with 85:15 hexane:acetone. Yellow crystals, melting point of 50–52 °C, with a 36% yield were obtained. IR_{film} (neat): 3423.6, 2972.2, 1672.2, 1505.6, 1463.9, 1427.9, 1353.7, 1276.2, 1081.5 cm^{–1}; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.33 [t, *J* = 7.2 Hz, 3H], 1.36 [t, *J* = 7 Hz, 3H], 2.83 [s, 3H], 3.82–4.13 [m, 4H]; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 10.8, 14.3, 42.4, 44.9, 50.3, 201.0.

MeDDTC-SO₂ was prepared according to the method described [23] obtaining a pale yellow liquid in a 77% yield. IR_{film} (neat): 2978.1, 2935.9, 2877.2, 1670.0, 1504.1, 1430.7, 1301.6, 1131.4; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.30 [t, *J* = 7 Hz, 3H], 1.37 [t, *J* = 7 Hz, 3H], 3.46 [s, 3H], 3.87 [c, *J* = 7 Hz, 2H], 4.08 [c, *J* = 7 Hz, 2H]; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 10.1, 13.4, 43.5, 47.9, 49.7, 188.1.

2.4. PaBADH expression, purification, and standard activity assay

Recombinant PaBADH was expressed in *Escherichia coli* cells as reported [13], and purified to homogeneity following the two-step procedure previously described [37]. PaBADH activity was assayed spectrophotometrically by monitoring the formation of NADPH at 340 nm, as described [38]. Protein was determined using the colorimetric method described by Bradford [39].

2.5. *In vitro* inactivation of PaBADH

PaBADH (5 μM, as active sites) was incubated with DSF or its metabolites (50 μM each, dissolved in 5 μL of absolute ethanol) at 37 °C under anaerobic conditions in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.9, containing 1 mM EDTA, 50 mM KCl, and 10% (v:v) glycerol (inactivation buffer) in the absence or presence of 600 μM NADP⁺. As a control, absolute ethanol (5 μL) was used in place of

inhibitor. Stock solutions of DSF or DSF metabolites (5 mM each) were prepared in absolute ethanol; enzyme ligands were dissolved in N₂-saturated water. Before chemical modification, 2-mercaptoethanol was removed from the enzyme stock solution by rapid gel filtration in Sephadex G-25 (GE Healthcare) micro-columns, previously equilibrated with inactivation buffer devoid of O₂ and saturated with N₂. To prevent air oxidation of the PaBADH cysteine residues, all solutions used were degassed and saturated with N₂ just before use. Enzyme activity was determined by the standard assay at 30 °C. Second-order rate constants of inactivation were calculated from the pseudofirst-order rate constants that were estimated by fitting the initial velocity data to a single exponential decay equation using non-linear regression. Attempts to reactivate the totally inactivated PaBADH were performed by incubation at 37 °C for 24 h with 5 mM DTT.

2.6. *In situ* inactivation of PaBADH

DSF or DSF metabolites, at 50 μM final concentration in DMSO, were added to the culture medium when the optical density at 600 nm was 0.1. Cells were harvested after the indicated times of incubation and washed four times with saline solution (0.9% NaCl) by centrifugation at 18 300 × g for 3 min to remove the reagent in excess. Then, the cells were placed in the appropriate volume of 50 mM potassium phosphate buffer pH 6.9 (containing 1 mM EDTA, 10% (v:v) glycerol, and, when indicated, 20 mM 2-mercaptoethanol) and disintegrated by sonic oscillation in a Sonics Vibra-Cells disruptor. The slurry was centrifuged at 24 200 × g for 15 min. All operations were carried out at 4 °C. The PaBADH activity of the supernatant (cell-free extract) was determined by the standard assay [38] and the PaBADH protein content of these extracts was determined by Western blot, as described [13].

2.7. Inhibition of bacterial growth in agar and liquid media

The antimicrobial activity of DSF, DDC, MeDDTC-SO, MeDDTC-SO₂, MeDTC-SO, and MeDTC-SO₂ was assayed by determining their effects on the growth of *P. aeruginosa* PAO1 strain at 37 °C, by either the disc diffusion method in agar Petri dishes containing M9C medium, or in liquid media (M9, M9 + C, or M9C). In the first case, filter-paper disks containing 5 μmoles of the inhibitors dissolved in DMSO were placed in the plates, which had been massively inoculated with *P. aeruginosa* PAO1 strain. After 18 h at 37 °C, the diameter of the inhibition halo was measured. In liquid media, DSF or any of its metabolites were added at 50 μM final concentration in DMSO.

2.8. Model building

The structures of the *S*-cisteinyl-*N,N*-diethyl-dithiocarbamoyl and *S*-cisteinyl-*N,N*-diethyl-thiocarbamoyl adducts as well as that of the mixed *S*-cisteinyl-*N,N*-diethyl-dithiocarbamoyl disulfide were modeled into the active site of the PaBADH using as template the crystal coordinates of this enzyme in complex with NADP⁺ (PDB accession code 2WME) and the building mode of PyMOL [40]. Energy minimizations were performed using the SwissPdb Viewer module for GROMOS 96 force field potential [41]. The convergence criterion was a value of 0.05 kJ/mol for the averaged derivative.

3. Results and discussion

3.1. *In vitro* PaBADH inactivation by DSF and its metabolites

All DSF metabolites—with the exception of DDC, which results from reduction of the disulfide in DSF—caused a total loss of PaBADH activity following pseudo-first order kinetics (Fig. 1A), as

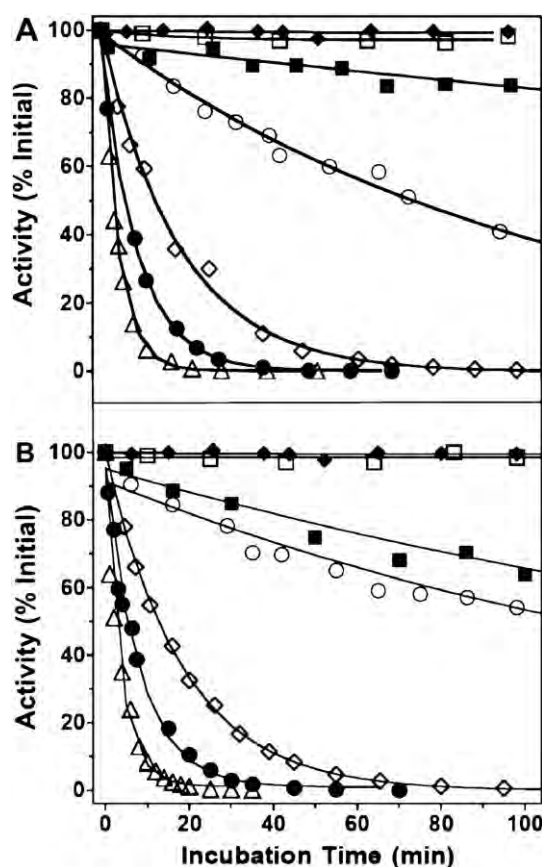


Fig. 1. *In vitro* inactivation of PaBADH by DSF and DSF metabolites. (A) Time-courses of enzyme (5 μM as active sites) inactivation by incubation at pH 6.9 and 37 °C in the inactivation buffer in the absence (closed rhombuses) or presence of 50 μM of each of the following compounds: DSF (closed circles), DDC (open squares), MeDDTC-SO (open circles), MeDDTC-SO₂ (open up triangles), MeDTC-SO (closed squares), and MeDTC-SO₂ (open rhombuses). (B) Same as in A, but the incubation was carried out in the presence of 600 μM NADP⁺. The points are the average of the experimental data (obtained in triplicate independent experiments) while the lines are theoretical based on the best fit of the data to a single exponential decay equation.

previously found for DSF itself [21]. No changes in activity were observed in an enzyme incubated only with 1% (v/v) absolute ethanol, which is the reagents vehicle. Although PaBADH has four cysteinyl residues per subunit [13], the thiol group of three of them are buried [42] and only Cys286, which is the catalytic cysteine, is susceptible to modification by specific thiol reagents, as proved by site directed mutagenesis of the non-essential cysteine residues [22]. Enzyme inactivation is, therefore, the consequence of the modification of the catalytic cysteine. Second order rate constants (Table 1) indicate that the order of potency as PaBADH inhibitors was: MeDDTC-SO₂ > DSF > MeDTC-SO₂ > MeDDTC-SO > MeDTC-SO. The observed *in vitro* relative reactivity of these compounds towards the catalytic cysteine is in total agreement with their respective electrophilicity, which is dictated by their chemical structures. Energy-minimized models of the diethyl-(di)thiocarbamoyl adducts into the PaBADH active site, indicated that there is enough room for the residue attached to the Cys286 sulfur after its modification by the sulfoxides or the sulfones, so that these modifications should not have destabilizing effects on the enzyme. As an example, the modeled *S*-cisteinyl-*N,N*-diethyl-thiocarbamoyl adduct that results from modification with either MeDTC-SO or MeDTC-SO₂ is shown in Fig. 2A. But the mixed disulfide formed after modification by DSF, which introduces an additional sulfur atom (see Scheme 1B), can sterically clash with the side-chain of

Table 1
Kinetics of inactivation^a of PaBADH by DSF and DSF metabolites.

| Compound | k ($M^{-1}s^{-1}$) ^b | |
|------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| | –NADP ⁺ | +0.6 mM NADP ⁺ |
| DSF | 38.7 ± 1.4 | 40.1 ± 2.0 |
| MeDDTC-SO | 2.9 ± 0.2 | 2.5 ± 0.2 |
| MeDDTC-SO ₂ | 81.4 ± 1.3 | 86.1 ± 5.4 |
| MeDTC-SO | 0.5 ± 0.0 | 1.3 ± 0.1 |
| MeDTC-SO ₂ | 18.0 ± 0.7 | 18.3 ± 0.2 |

^a Inactivation experiments were performed at pH 6.9 and 37 °C. Other experimental details are given in the **Material and methods** section.

^b Second-order rate constant values ± S.E. were calculated from pseudofirst-order rate constants estimated by fitting the inactivation data to a single exponential decay equation by nonlinear regression.

Trp161, which, if displaced to avoid this clash, would push Asn465, a residue that belongs to a loop located at the interface between monomers (Fig. 2B). The modification by DSF can in this way destabilize the quaternary structure of the enzyme. In agreement with the models, PaBADH remains in its tetrameric native state after complete inactivation by any of the (di)thiosulfoxides or (di)thiosulfones (results not shown), in contrast to the DSF-modified enzyme that dissociates into monomers at 23 °C or irreversibly aggregates at 37 °C [22].

Given that the nucleotide is the first to bind to the active site in the ordered kinetic mechanism of PaBADH, and that the dissociation constant of the enzyme–nucleotide complexes are below the intracellular concentrations of the nucleotides [16], it is likely that a high proportion of the enzyme has the nucleotide bound *in vivo*. Because of this, we tested the susceptibility of PaBADH to inactivation by the DSF metabolites in the presence of NADP⁺ in the inactivation medium at a concentration about 10-times the K_d for this nucleotide [16]. The rate of inactivation was not significantly changed by the nucleotide (Fig. 1B and Table 1).

PaBADH that has been inactivated by any of the DSF metabolites could not be reactivated by an excess of DTT, again in contrast with the DSF-modified enzyme whose disulfide bond is readily broken by this reducing agent [21]. The lack of effect of DTT on the chemically modified enzyme is consistent with the proposed formation of the stable diethyl-(di)thiocarbamoyl adducts [28–30].

3.2. *In situ* PaBADH inactivation by DSF and its metabolites

The irreversibility of the PaBADH modification by DSF metabolites, together with the absence of protection by the oxidized

nucleotide against these modifications, were important findings that encouraged us to study the effects of these reagents in *P. aeruginosa* cells, with the aim of further exploring the potential use of these reagents as antimicrobial agents. We, therefore, investigated the ability of DSF and its metabolites to inactivate PaBADH under intracellular conditions in *P. aeruginosa* cells grown in liquid culture, as described in the Materials and methods section. In these experiments the different growth media contained 20 mM choline, because this compound is required for the expression of BADH protein in prokaryotic cells [13,43]. In the minimal medium M9C, DSF metabolites—with the exception of DDC, MeDDTC-SO₂, and of DSF itself—were able to decrease PaBADH activity, although to different extent (Fig. 3A). The enzyme activity could not be recovered by addition of 20 mM β-mercaptoethanol to the cell-free extracts (results not shown). None of these metabolites affected the cells content of PaBADH protein, as indicated by Western blot analysis (Fig. 3A). The kinetics of the *in situ* inactivation of PaBADH by the two DSF metabolites that produced the greatest inhibition—MeDDTC-SO and MeDTC-SO₂—were pseudofirst order (Fig. 3B) with rate constants of 0.020 (±0.002) min^{−1}, for MeDTC-SO₂, and 0.009 (±0.001) min^{−1}, for MeDDTC-SO, corresponding to inactivation half-times of 0.6 and 1.3 h, respectively. Remarkably, the pseudofirst-order rate constants of enzyme inactivation by these DSF metabolites determined *in situ* were similar to those determined *in vitro* at the same concentration of the reagents: 0.053 (±0.003) min^{−1} for MeDTC-SO₂ and 0.009 (±0.001) min^{−1} for MeDDTC-SO. This finding indicates that there is no restriction on the uptake of these compounds by the bacterial cells.

3.3. Effects of DSF and its metabolites on the growth of *P. aeruginosa* cultured cells

The antimicrobial activity of DSF and its metabolites was first assayed using the disk diffusion test, by determining their effects on the growth of *P. aeruginosa* at 37 °C in agar Petri dishes containing M9C medium, as described in Materials and methods. No inhibition was observed in disks containing DMSO or DSF, but bacterial growth was affected by the DSF metabolites, being MeDTC-SO₂ and MeDDTC-SO the most potent inhibitors (Fig. 4), in agreement with the *in situ* PaBADH inhibition experiments. In M9C liquid media—under the same experimental conditions in which the *in situ* inactivation of PaBADH was observed, see above—only MeDTC-SO₂ and MeDDTC-SO arrested *P. aeruginosa* growth; DSF and the other DSF metabolites had no significant effect (Fig. 5A).

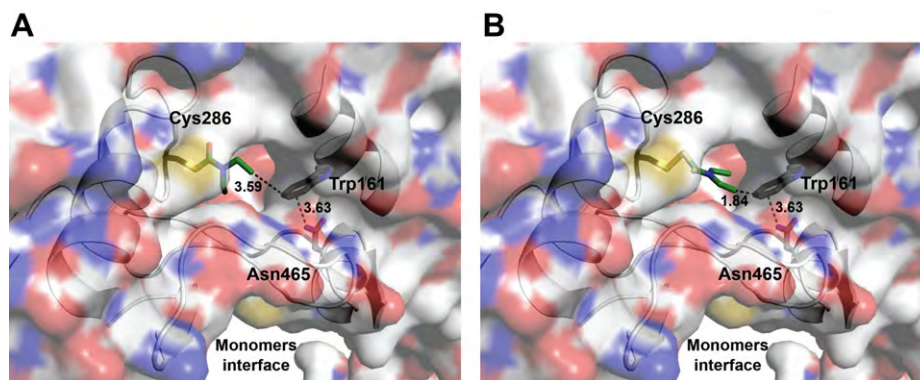


Fig. 2. Energy-minimized models of the *S*-cisteinyl-*N,N*-diethyl-thiocarbamoyl (A) and the mixed *S*-cisteinyl-*N,N*-diethylthiocarbamoyl disulfide (B) adducts in the PaBADH active site. The protein surface, showing the underneath elements of secondary structure, of subunit A of the tetramer is colored by atoms (carbon white; nitrogen blue, sulfur yellow and oxygen red). Side-chain atoms of relevant residues are shown as sticks and color coded as above, but PaBADH carbon atoms are black and adduct carbon atoms are green. Distances in angstroms and depicted as dashed black lines. The figure was generated using PyMOL [40] (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

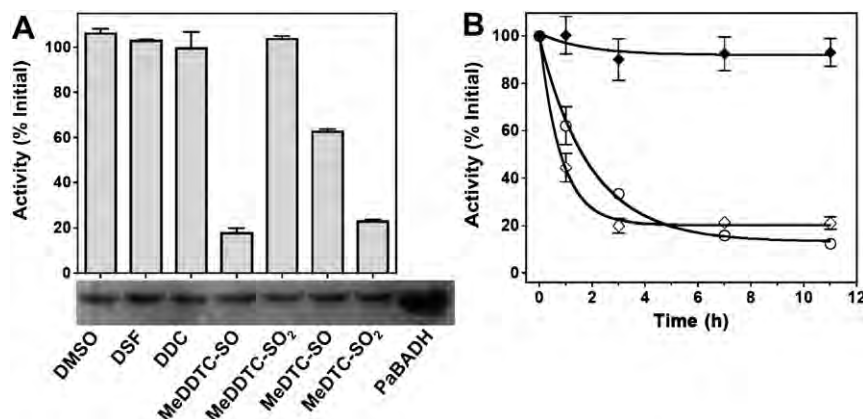


Fig. 3. *In situ* inactivation of PaBADH by DSF and DSF metabolites. (A) 50 μ M of the reagents were added to a suspension of *P. aeruginosa* cells (at 0.6 OD₆₀₀) grown in M9C medium at 37 °C. After 7 h of incubation, the cells were harvested, washed to remove the inhibitor, and disrupted. PaBADH activity was measured in the cell-free extracts and expressed as percentage of the activity measured in control cells (589 mU/mg protein) to which DMSO was added instead of reagent. Also shown is the PaBADH protein content of these cell-free extracts estimated by immunoblotting. The same amount of soluble protein (40 μ g) was loaded into all lanes, except into the lane labeled PaBADH that corresponds to purified enzyme (2.5 μ g). The load charge was confirmed by densitometry of a SDS-gel run on parallel to the one transferred to the immunoblot membrane and stained with Coomassie Blue. (B) Time courses of the *in situ* inhibition of PaBADH by incubation of cells, grown in M9C medium at 37 °C, with 50 μ M MeDTC-SO₂ (open rhombuses) or 50 μ M MeDDTC-SO (open circles). No significant changes in enzyme activity were observed in control cells (closed rhombuses), to which DMSO was added. Data shown are the mean \pm S.D. (depicted as bars) of three independent experiments.

There are differences between the results of the *in vitro* and *in situ* PaBADH inhibition and between those of the inhibition of bacterial growth in agar plates and in liquid media. One of these differences is the lack of effect of DDC on the enzyme activity, both *in vitro* and *in situ*, and in the bacterial growth in liquid media, whereas this compound inhibited cells growth in agar plates. The inhibitory effect of DDC in the latter case may be due to the very high concentration of this reagent used in the agar plate experiment, which presumably leads to a very high intracellular concentration. At this high concentration, DDC may be an inhibitor of PaBADH and/or may be converted into some of the more reactive DSF metabolites by the bacterial cells. An inspection of the PaBADH genome showed that it contains the gene for a thiopurine methyltransferase, the enzyme involved in the conversion of DDC into

MeDDTC (see Scheme 1A), and several genes codifying for flavin containing monooxygenases, which are the enzymes responsible for further oxidation of MeDDTC into the sulfoxides and sulfones [23]. Another difference was the effectivity of DSF as an *in vitro* inhibitor of purified PaBADH whereas it was unable to modify the intracellular enzyme or to arrest bacterial growth. Because of its ability to chelate metals and to modify proteins thiols, DSF has been suggested to be of potential use in clinical oncology [44–46], in treating cocaine dependency [47], type 2 diabetes [48], and thrombosis [49], as well as an antifungal [50], and antimalarial [51] agent. It has also been tested as an antibacterial compound [52] but found not to be effective in arresting the growth of *P. aeruginosa* cells, a finding now confirmed by us. The lack of effect of DSF on the bacterial cells might be due to its rapid depletion either by being

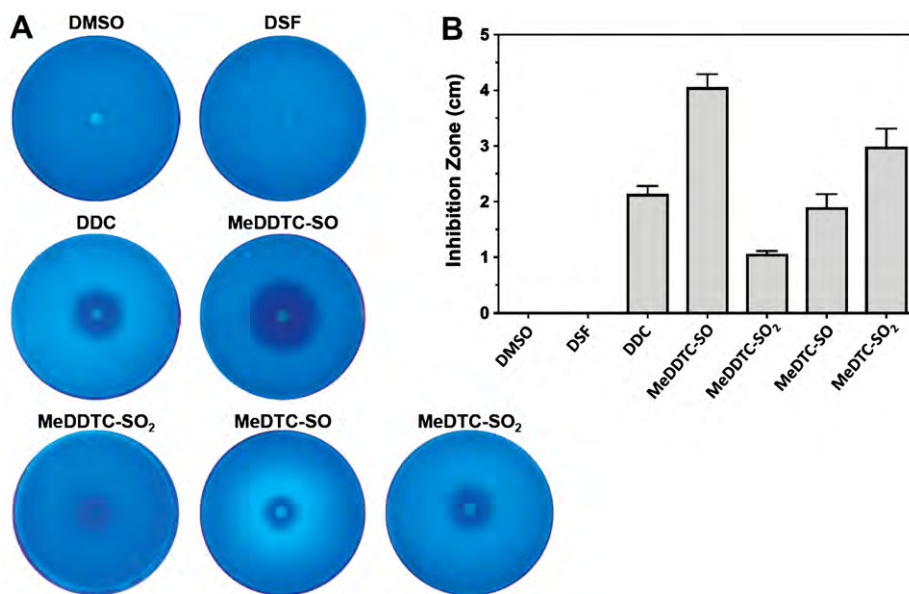


Fig. 4. Inhibition of growth of *P. aeruginosa* cells by DSF and DSF metabolites in agar M9C medium. (A) Filter-paper discs containing DMSO or 5 μ moles (dissolved in DMSO) of the reagents were placed on M9C agar plates previously inoculated with 100 μ L of a bacterial suspension at an OD₆₀₀ of 0.1. The result of a representative experiment is shown. (B) Diameter of the inhibition zone after 18 h incubation of the plates at 37 °C. Data are the mean \pm SD. (depicted as bars) of three independent experiments.

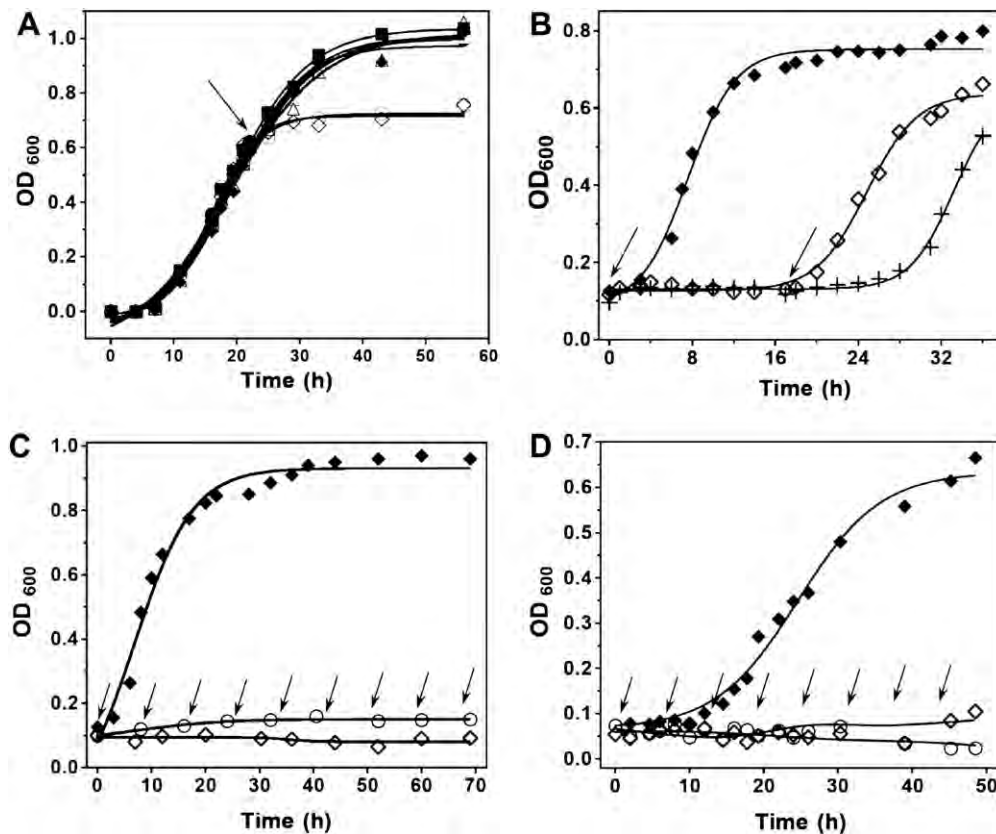


Fig. 5. Effects of MeDDTC-SO and MeDTC-SO₂ on *P. aeruginosa* growth in liquid M9C medium. (A) A single dose of 50 μ M DSF (closed circles) or DDC (open squares), MeDDTC-SO (open circles), MeDDTC-SO₂ (open up triangles), MeDTC-SO (closed squares), and MeDTC-SO₂ (open rhombuses) was added when the cells reached an OD₆₀₀ of 0.6. (B and C) Cells were grown in LB medium and then transferred to M9C medium. A single dose of 50 μ M MeDTC-SO₂ (open rhombuses) was added to the culture medium at 0.1 OD₆₀₀. In (B) a second dose was added after 18 h (crosses). In (C) repeated doses of 50 μ M MeDTC-SO₂ (open rhombuses) or MeDDTC-SO (open circles) were added every 8 h. (D) Cells were grown in M9 medium and then transferred to M9C medium. Repeated doses of 50 μ M MeDTC-SO₂ (open rhombuses) or MeDDTC-SO (open circles) were added to the culture medium each 8 h, as in (C). DMSO was added to control cells (closed rhombuses) at the same times than the reagents to treated cells. The arrows indicate the time of the additions.

converted to DDC by reduction of its disulfide group by physiological small thiols such as reduced glutathione, or by forming mixed disulfides with reactive intracellular protein thiols that are nonessential for bacterial growth. The poorly reactive thiol reagent DDC is formed in these reactions, accounting for the lack of intracellular effects of DSF in liquid media. In agar plates, a high concentration of DSF solubilized in DMSO was applied to the paper disks, but as DSF diffuses into the agar aqueous environment its concentration would be greatly decreased by precipitation, given its low solubility in water ($\sim 150 \mu\text{M}$ is the highest concentration at which it remains soluble). A concentration of DDC high enough to produce growth inhibition would, therefore, not be produced from DSF in these experiments. Different from DSF, the DSF metabolites are soluble in water even at the high concentrations used in the agar plates experiments.

There were also important differences in the potency of MeDDTC-SO₂ as an *in vitro* inhibitor of PaBADH and as *in situ* inhibitor of the enzyme and of bacterial growth. MeDDTC-SO₂ is the most potent *in vitro* inhibitor of PaBADH but does not inhibit the enzyme inside *P. aeruginosa* cells, neither it affects the bacterial growth. As in the case of DSF, these differences may be due to a very low effective intracellular concentration, because its high reactivity towards intracellular thiols—such as the physiological reductant glutathione—rather than to its inability to enter the bacterial cells. As mentioned above, the similarity of the *in vitro* and *in situ* kinetics of PaBADH inactivation by MeDDTC-SO and MeDTC-SO₂ provides indirect evidence of unrestricted uptake of these compounds into

bacterial cells. It could be assumed that this applies to the chemically analogous MeDDTC-SO₂. Its high reactivity probably results in a fast elimination by intracellular reducing agents or non-essential thiol groups. On the contrary, MeDTC-SO—the least reactive of all DSF metabolites towards PaBADH—exhibited an inhibitory effect, although small, on both the intracellular enzyme activity and bacterial growth. Most likely the low reactivity of MeDTC-SO results in a greater half-life inside the cells than that of the more reactive reagents. A similar explanation was given by Mays et al. [53] to their finding that MeDTC-SO was a 10-times more potent inhibitor of ALDH2 than MeDTC-SO₂ in intact mitochondria, even though the latter is more reactive *in vitro* than the former. The most effective *in vivo* inhibitors will not be, therefore, the most reactive compounds, because these will be easily eliminated by the protective low-molecular weight thiols of the cells. Those compounds with a reactivity low enough to escape depletion by the cell defenses but high enough to modify very reactive thiols inside the active site of certain enzymes, such as the catalytic cysteine of ALDHs, will be the most effective inhibitors. Our results indicate that two of the DSF metabolites, MeDTC-SO₂ and MeDDTC-SO, belong to this kind of compounds.

Given these results, we concentrate on evaluating the effects of MeDTC-SO₂ and MeDDTC-SO on *P. aeruginosa* growth in different liquid media. In cells that were previously grown in a rich medium (Luria-Bertani) and then transferred to M9C medium, the growth was completely arrested when 50 μ M MeDTC-SO₂ was added at an OD₆₀₀ value of 0.1. The growth resumed, however, after 20 h of

incubation. An additional dose of 50 μ M MeDTC-SO₂ at 18 h of incubation retarded the initiation of growth a further 12 h (Fig. 5B). When the doses of 50 μ M MeDTC-SO₂ or MeDDTC-SO were repeated every 8 h, bacterial growth was prevented up to 70 h of incubation (Fig. 5C). Similar results were obtained using cells previously grown in M9 medium and then transferred to M9C (Fig. 5D), although the lag phase of growth of control cells was significantly larger than in those cells transferred from the rich medium.

If the inhibition of *P. aeruginosa* growth by MeDTC-SO₂ or MeDDTC-SO were caused by inhibition of PaBADH, these compounds will not have any effect on cells grown in M9 medium—which only contains glucose as carbon source—since PaBADH synthesis is induced by choline [13,43]. This was in fact observed (Fig. 6A), in good agreement with the very low levels of PaBADH activity found in these cells (around 14 mU/mg protein) compared with the activity levels

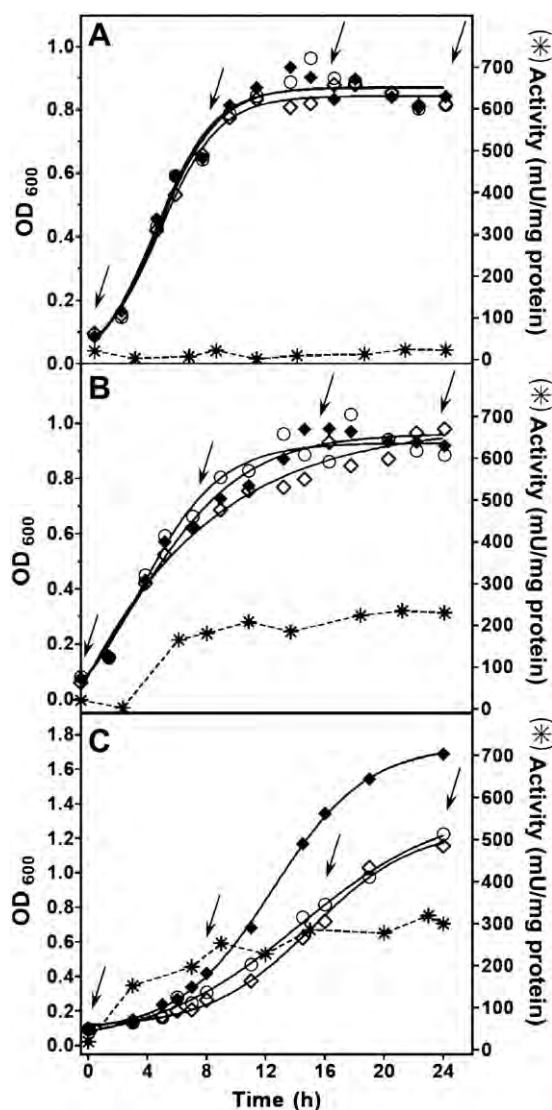


Fig. 6. Effects of MeDDTC-SO₂ or MeDTC-SO₂ on *P. aeruginosa* growth in liquid M9 and M9 + C media. *P. aeruginosa* PAO1 strain cells were grown in M9 liquid medium and then transferred to M9 (A), M9 + C (B), or M9 + C plus 700 mM NaCl (C) media. Repeated doses of 50 μ M MeDTC-SO₂ (open rhombuses) or MeDDTC-SO (open circles) were added to the culture medium every 8 h. DMSO was added to control cells (closed rhombuses) at the same times than the reagents to treated cells. Bacterial growth is indicated by OD₆₀₀. Also shown in panels A, B and C are the changes in PaBADH activity (dashed lines, asterisks) during incubation in the three media in the absence of the reagent.

found in cells grown in M9C medium (around 660 mU/mg protein). But, contrary to our expectation, MeDTC-SO₂ or MeDDTC-SO did not inhibit the growth of bacterial cells in the M9 + C medium—which in addition to glucose contains choline—even though the cells exhibited a significant PaBADH activity, but lower than that observed in cells grown in the M9C medium (Fig. 6B). The observed differences between the two media in the extent of growth inhibition by these reagents may be due to the lower degree of induction of the *betB* operon—which include choline dehydrogenase, the betaine aldehyde forming enzyme—in the M9+C than in the M9C medium [13]. Growth inhibition by MeDTC-SO₂ or MeDDTC-SO was observed in M9 + C medium plus 700 mM NaCl (Fig. 6C) and the kinetics of PaBADH inactivation in cells grown in this medium were similar to those in M9C medium (data not shown). Even though PaBADH activities were similar in cells grown in M9 + C or M9 + C plus salt media (Figs. 6B and C) in the M9 + C medium cellular division of *P. aeruginosa* is very fast—faster than enzyme inactivation—, thus resulting in dilution of the toxic betaine aldehyde formed by PaBADH inhibition. In the M9 + C plus salt medium the slower cellular division allows the accumulation of the aldehyde inside the bacterial cells, thus resulting in growth inhibition. Therefore, the ability of MeDTC-SO₂ and MeDDTC-SO to arrest *P. aeruginosa* growth not only depends on the presence of choline in the culture medium—necessary to induce the expression of the PaBADH protein—but also on the growth rate of the bacterial cells.

MeDTC-SO₂ and MeDDTC-SO were, therefore, able to inactivate the intracellular PaBADH and to arrest *P. aeruginosa* growth when the bacterium is growing in choline-containing media, where the bacterial cells exhibited a significant activity of PaBADH, but not in a medium that lacks choline, where the PaBADH activity of the cells is very low, neither when the rate of growth is faster than enzyme inactivation. These findings are consistent with: (i) PaBADH being the more important intracellular target of MeDTC-SO₂ and MeDDTC-SO, and (ii) the accumulation of the toxic betaine aldehyde being the mechanism by which inhibition of growth is achieved. It is possible that MeDTC-SO₂ and MeDDTC-SO—as well as the other DSF metabolites—can modify other protein thiols or intracellular reductants. If they do so, it appears that these modifications do not have important consequences for bacterial growth.

Interestingly, the composition of the M9 + C plus salt medium—glucose, choline, and high osmolarity—is similar to the conditions that exists in the sites infected by *P. aeruginosa* in humans [14], suggesting that the *in vivo* inhibition of PaBADH by MeDTC-SO₂ and/or MeDDTC-SO—either by their formation after DSF administration or by direct administration if they prove not to be toxic at the concentrations needed to produce a significant effect—may be of help in combating infections by this important pathogen. They may also be used as lead compounds to develop more potent and/or selective inhibitors. Clearly, a further evaluation of these compounds on animal models and in clinical trials is needed. Finally, this work is one of the few known examples in which killing an organism by inhibition of an enzyme is not achieved by decreasing the flux through an essential pathway but by increasing a metabolite concentration to toxic levels, the latter being a strategy much more effective than the former [54].

Acknowledgments

This work was supported by grants to R.A.M.-C. from Dirección General de Apoyo al Personal Académico, UNAM (PAPIIT IN206505) and from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 59654). V.J.Z.-M was a recipient of a CONACYT scholarship. We are grateful to C. Mújica-Jiménez, Facultad de Química, UNAM, for skilful technical assistance, to A. G. Díaz-Sánchez for help in the

building of the structural models, and to M.A. Peña and E. Huerta, Instituto de Química, UNAM, for NMR recording.

Author contributions: V.J.Z.-M. performed the experiments and helped with data analysis and general discussion; M.L.-P., P.D. and I.R. synthesized the DSF metabolites; R.A.M.-C. designed the study, analyzed data, provided guidance, and wrote the paper.

References

- [1] C. Hardalo, S.C. Edberg, *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water, *Crit. Rev. Microbiol.* 23 (1997) 47–75.
- [2] A.R. Massengale, F.J. Quinn, A. Williams, S. Gallagher, S.C. Aronoff, The effect of alginate on the invasion of cystic fibrosis respiratory epithelial cells by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Exp. Lung Res.* 26 (2000) 163–178.
- [3] J. Kohanteb, M. Dayaghi, M. Motazedian, M.A. Ghayumi, Comparison of biotyping and antibiotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with burn wound infection and nosocomial pneumonia in Shiraz, Iran, *Pak. J. Biol. Sci.* 10 (2007) 1817–1822.
- [4] G.A. Bergen, J.H. Shelhamer, Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem, *Infect. Dis. Clin. North Am.* 10 (1996) 297–325.
- [5] D.S. Rodriguez, A.G. Rizo, S.P. Monroy, T. Reyes, Antimicrobial susceptibility and serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from HIV/AIDS patients, *Rev. Cubana Med. Trop.* 54 (2002) 142–146.
- [6] M.E. Marquart, A.R. Caballero, M. Chomnawang, B.A. Thibodeaux, S.S. Twining, R.J. O'Callaghan, Identification of a novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* that causes corneal erosions, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46 (2005) 3761–3768.
- [7] R. Mittal, S. Aggarwal, S. Sharma, S. Chhibber, K. Harjai, Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview, *J. Infect. Public Health* 2 (2009) 101–111.
- [8] R.E. Hancock, Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria, *Clin. Infect. Dis.* 27 (Suppl. 1) (1998) S93–S99.
- [9] G.J. Kortstee, The aerobic decomposition of choline by microorganisms. I. The ability of aerobic organisms, particularly coryneform bacteria, to utilize choline as the sole carbon and nitrogen source, *Arch. Mikrobiol.* 71 (1970) 235–244.
- [10] J.R. Wright, J.A. Clements, Metabolism and turnover of lung surfactant, *Am. Rev. Respir. Dis.* 136 (1987) 426–444.
- [11] 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.
- [12] R.M. Ostroff, A.I. Vasil, M.L. Vasil, Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 5915–5923.
- [13] R. Velasco-García, M.A. Villalobos, M.A. Ramirez-Romero, C. Mújica-Jiménez, G. Iturriga, R.A. Muñoz-Clares, Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt, *Arch. Microbiol.* 185 (2006) 14–22.
- [14] J.P. Kilbourn, Bacterial content and ionic composition of sputum in cystic fibrosis, *Lancet* 1 (1978) 334.
- [15] M.R. D'Souza-Ault, L.T. Smith, G.M. Smith, Roles of *N*-acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 473–478.
- [16] R. Velasco-García, L. González-Segura, R.A. Muñoz-Clares, Steady-state kinetic mechanism of the NADP⁺- and NAD⁺-dependent reactions catalysed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochem. J.* 352 (2000) 675–683.
- [17] A. Oliver, R. Canton, P. Campo, F. Baquero, J. Blazquez, High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection, *Science* 288 (2000) 1251–1254.
- [18] B. Rathinasabapathi, K.F. McCue, D.A. Gage, A.D. Hanson, Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance, *Planta* 193 (1994) 155–162.
- [19] A.E. Sage, A.I. Vasil, M.L. Vasil, Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Mol. Microbiol.* 23 (1997) 43–56.
- [20] T.M. Kitson, The disulfiram-ethanol reaction: a review, *J. Stud. Alcohol* 38 (1977) 96–113.
- [21] R. Velasco-García, V.M. Chacón-Aguilar, D. Hervert-Hernández, R.A. Muñoz-Clares, Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves by disulfiram, *Chem. Biol. Interact.* 143–144 (2003) 149–158.
- [22] R. Velasco-García, V.J. Zaldivar-Machorro, C. Mújica-Jiménez, L. González-Segura, R.A. Muñoz-Clares, Disulfiram irreversibly aggregates betaine aldehyde dehydrogenase—a potential target for antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341 (2006) 408–415.
- [23] P. Hu, L. Jin, T.A. Baillie, Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic *S*-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary *N*-acetylcysteine conjugates, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281 (1997) 611–617.
- [24] J. Cobby, M. Mayersohn, S. Selliah, The rapid reduction of disulfiram in blood and plasma, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 202 (1977) 724–731.
- [25] J. Cobby, M. Mayersohn, S. Selliah, Methyl diethylthiocarbamate, a metabolite of disulfiram in man, *Life Sci.* 21 (1977) 937–942.
- [26] A. Madan, M.D. Faiman, NADPH-dependent, regioselective *S*-oxidation of a thionosulfur- and thioether-containing xenobiotic, diethylthiocarbamate methyl ester by rat liver microsomes, *Drug Metab. Dispos.* 22 (1994) 324–330.
- [27] A. Madan, A. Parkinson, M.D. Faiman, Identification of the human and rat P450 enzymes responsible for the sulfoxidation of *S*-methyl *N*, *N*-diethylthiolcarbamate (DETC-ME). The terminal step in the bioactivation of disulfiram, *Drug Metab. Dispos.* 23 (1995) 1153–1162.
- [28] L. Jin, M.R. Davis, P. Hu, T.A. Baillie, Identification of novel glutathione conjugates of disulfiram and diethylthiocarbamate in rat bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Evidence for metabolic activation of disulfiram *in vivo*, *Chem. Res. Toxicol.* 7 (1994) 526–533.
- [29] J.J. Lipsky, M.L. Shen, S. Naylor, *In vivo* inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram, *Chem. Biol. Interact.* 130–132 (2001) 93–102.
- [30] M.L. Shen, K.L. Johnson, D.C. Mays, J.J. Lipsky, S. Naylor, Identification of the protein-drug adduct formed between aldehyde dehydrogenase and *S*-methyl-*N*, *N*-diethylthiocarbamoyl sulfoxide by on-line proteolytic digestion high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 918–923.
- [31] A. Madan, M.D. Faiman, Diethylthiocarbamate methyl ester sulfoxide, an inhibitor of rat liver mitochondrial low *K_m* aldehyde dehydrogenase and putative metabolite of disulfiram, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18 (1994) 1013–1017.
- [32] S.N. Nagendra, A. Madan, M.D. Faiman, *S*-methyl *N*, *N*-diethylthiolcarbamate sulfone, an *in vitro* and *in vivo* inhibitor of rat liver mitochondrial low *K_m* aldehyde dehydrogenase, *Biochem. Pharmacol.* 47 (1994) 1465–1467.
- [33] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- [34] R.A. Gray, G.K. Joo, *S*-Methyl-*N*, *N*-diethylthiocarbamate as a selective herbicide in rice, U.S. Patent 4,582,528 (1986).
- [35] T. Mizuno, T. Iwai, T. Ito, Practical synthesis of *S*-alkyl thiocarbamate herbicides by carbonylation of amines with carbon monoxide and sulfur, *Tetrahedron* 60 (2004) 2869–2873.
- [36] B.W. Hart, M.D. Faiman, *In vitro* and *in vivo* inhibition of rat liver aldehyde dehydrogenase by *S*-methyl *N*, *N*-diethylthiolcarbamate sulfoxide, a new metabolite of disulfiram, *Biochem. Pharmacol.* 43 (1992) 403–406.
- [37] L. González-Segura, R. Velasco-García, E. Rudiño-Piñera, C. Mújica-Jiménez, R.A. Muñoz-Clares, Site-directed mutagenesis and homology modeling indicate an important role of cysteine 439 in the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochimie* 87 (2005) 1056–1064.
- [38] R. Velasco-García, C. Mújica-Jiménez, G. Mendoza-Hernández, R.A. Muñoz-Clares, Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 1292–1300.
- [39] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [40] W.L. DeLano, The PyMOL molecular graphics system on world wide web, <http://www.pymol.org/> (2002).
- [41] N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18 (1997) 2714–2723.
- [42] L. González-Segura, E. Rudiño-Piñera, R.A. Muñoz-Clares, E. Horjales, The crystal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* provides new insight into the reaction mechanism and shows a novel binding mode of the 2'-phosphate of NADP⁺ and a novel cation binding site, *J. Mol. Biol.* 385 (2009) 542–557.
- [43] T. Nagasawa, Y. Kawabata, Y. Tani, K. Ogata, Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16, *Agr. Biol. Chem.* 40 (1976) 1743–1749.
- [44] D. Cen, D. Brayton, B. Shahandeh, F.L. Meyskens Jr., P.J. Farmer, Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 6914–6920.
- [45] R.E. Kast, C. Belda-Iniesta, Suppressing glioblastoma stem cell function by aldehyde dehydrogenase inhibition with chloramphenicol or disulfiram as a new treatment adjunct: an hypothesis, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 4 (2009) 314–317.
- [46] M. Wickstrom, K. Danielsson, L. Rickardson, J. Gullbo, P. Nygren, A. Isaksson, R. Larsson, H. Lovborg, Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients, *Biochem. Pharmacol.* 73 (2007) 25–33.
- [47] M. Gaval-Cruz, D. Weinschenker, Mechanisms of disulfiram-induced cocaine abstinence: antabuse and cocaine relapse, *Mol. Interv.* 9 (2009) 175–187.
- [48] N. Nagai, T. Murao, N. Okamoto, Y. Ito, Disulfiram reduces elevated blood glucose levels in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, a model of type 2 diabetes, *J. Oleo Sci.* 58 (2009) 485–490.
- [49] Y. Manaster, B. Shenkman, N. Rosenberg, N. Savion, Allicin and disulfiram enhance platelet integrin α IIb β 3-fibrinogen binding, *Thromb. Res.* 124 (2009) 477–482.
- [50] Z.E. Sauna, S. Shukla, S.V. Ambudkar, Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections, *Mol. Biosyst.* 1 (2005) 127–134.

- [51] L.W. Scheibel, A. Adler, W. Trager, Tetraethylthiuram disulfide (Antabuse) inhibits the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76 (1979) 5303–5307.
- [52] M. Phillips, G. Malloy, D. Nedunchezian, A. Lukrec, R.G. Howard, Disulfiram inhibits the *in vitro* growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Antimicrob. Agents Chemother. 35 (1991) 785–787.
- [53] D.C. Mays, A.N. Nelson, J. Lam-Holt, A.H. Fauq, J.J. Lipsky, *S*-methyl- *N*, *N*-diethylthiocarbamate sulfoxide and *S*-methyl- *N*, *N*-diethylthiocarbamate sulfone, two candidates for the active metabolite of disulfiram, Alcohol. Clin. Exp. Res. 20 (1996) 595–600.
- [54] A. Cornish-Bowden, M.L. Cardenas, Metabolic analysis in drug design, C.R. Biol. 326 (2003) 509–515.