



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UN/M** POSGRADO 

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y
DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

FACULTAD DE QUÍMICA

ASPECTOS ESTRUCTURALES,
MECANÍSTICOS Y FISOLÓGICOS DE LAS
BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS
DE *Pseudomonas aeruginosa* Y *Spinacia oleracea*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. Ángel Gabriel Díaz Sánchez

Tutora: Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares

MÉXICO, D. F.

AGOSTO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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, Universidad Nacional Autónoma de México.

El *Comité Tutoral* que asesoró y supervisó el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares, Facultad de Química, UNAM.

Dra. Adela Rodríguez Romero, Instituto de Química, UNAM.

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Facultad de Medicina, UNAM.

El *Comité Tutoral Ampliado* estuvo formado por:

Dr. Mario Galcagno Montans, Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Armando Gómez Puyou, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares, Facultad de Química, UNAM.

Dra. Adela Rodríguez Romero, Instituto de Química, UNAM.

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Facultad de Medicina, UNAM.

El *Jurado del Examen Doctoral* estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Armando Gómez Poyou

Secretario: Dra. Adela Rodríguez Romero

Vocal: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Vocal: Dr. Miguel Costas Basin

Vocal: Dr. Agustín López Munguía

Este trabajo contó con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-59654) y de la UNAM (PAPIIT-206505 e IN204708). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por el CONACYT.

Se reconoce y agradece el apoyo técnico del Biol. Carlos Mújica Jiménez de la Facultad de Química, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente le doy las gracias a Dios por todas las habilidades que me ha proporcionado y gracias a su misericordia hoy puedo terminar esta etapa de mi vida.

Manifiesto mi más sincero agradecimiento a la Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares por sus valiosas enseñanzas y guía durante la realización de este proyecto de doctorado. Por todo el tiempo que invirtió en formarme académicamente y por transmitirme su manera de hacer ciencia. También tengo que agradecer a su apreciable familia por la paciencia brindada para que se revisaran en numerosas ocasiones reportes, trabajos sometidos para publicación y preparación de trabajos para asistir a congresos, en horarios extraordinarios. Gracias también a todos los integrantes de mis comités tutorales y a mis compañeros del laboratorio y del conjunto E por sus valiosos comentarios.

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

A la Dra. Silvia Castillo Blum, del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Química de la UNAM, por permitirnos realizar experimento de cinética rápida en el equipo de flujo detenido.

Al Dr. Enrique Rudiño Piñera y a la Dra. Lilian González Segura por apoyarnos y colaborar con nosotros en la difracción de rayos X de los cristales y en la determinación de estructuras y al Dr. Alfredo Torres Larios por apoyarnos y colaborar con nosotros en la difracción de rayos X de cristales.

Al Dr. Leon Patricio Martínez y al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por sus valiosas contribuciones en la parte de la especificidad por el nucleótido

A la Dra. Adela Rodríguez Romero por permitirnos en numerosas ocasiones difractar nuestros cristales de proteínas en el Laboratorio Nacional de Cristalografía de Rayos X.

Además un especial agradecimiento a la Dra. Adela porque siempre presentó una gran disponibilidad de colaboración para la realización de este proyecto.

A la Dra. Lilian González Segura, por sus valiosos consejos, ayuda y guía académica, además de su valiosísima amistad y siempre incondicional apoyo.

A cada uno de mis amigos que aunque son pocos no menciono por que ustedes saben quien son.

A mi hijo Diego Isaac Díaz Franco y a mi esposa Dora Alicia Franco Flores, quienes siempre con una de sus sonrisas me invitaron a seguir caminando y a esforzarme en mi trabajo. Este proyecto de posgrado ha significado mucho sacrificio por parte de ellos y nunca tendré suficiente espacio para agradecerles todo.

Finalmente le agradezco a mi madre ÁGUEDA SÁNCHEZ CHÁVEZ y a mi padre JOSE ÁNGEL DÍAZ DEL RIO.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido

| | |
|--|-----------|
| RECONOCIMIENTOS | 2 |
| AGRADECIMIENTOS | 4 |
| TABLA DE CONTENIDO | 6 |
| RESUMEN | 8 |
| ABSTRACT | 13 |
| I. INTRODUCCIÓN | 18 |
| II. ANTECEDENTES | 19 |
| II.1. Generalidades de las ALDHs | 19 |
| <i>II.1.1. Reacción y sustratos</i> | 19 |
| II.1.2. Preferencia por la coenzima..... | 21 |
| II.1.3. Mecanismos cinético y químico de la reacción catalizada por las ALDHs | 23 |
| II.4. Dinámica conformacional del sitio activo de las ALDHs durante la reacción catalizada | 25 |
| II.1.4 Estructura tridimensional de las ALDHs..... | 27 |
| <i>II.1.4.2. El dominio de unión del nucleótido</i> | 29 |
| <i>II.1.4.3. El dominio catalítico</i> | 33 |
| II.2. Generalidades de la PaBADH y de la SoBADH)..... | 34 |
| <i>II.2.1 Propiedades cinéticas</i> | 34 |
| <i>II.2.2. Papel fisiológico</i> | 36 |
| III. HIPÓTESIS | 42 |
| IV. PROPÓSITO DEL ESTUDIO | 42 |
| V. OBJETIVO GENERAL | 43 |
| VI. OBJETIVOS PARTICULARES | 43 |
| VII. MATERIALES Y MÉTODOS | 44 |
| VII.1. Identificación de residuos críticos en la unión de los nucleótidos de la PaBADH y en la SoBADH..... | 44 |
| VII.2. Mutagénesis sitio-dirigida y sobreexpresión de las enzimas recombinantes en <i>E. coli</i> | 45 |
| VII.3. Ensayos enzimáticos y estudios cinéticos en estado estacionario..... | 45 |
| VII.4. Constantes de disociación del NAD(P) ⁺ | 46 |
| VII.5. Cinética rápida | 47 |

| | |
|--|------------|
| VII.6. Alineamiento de las secuencias de las ALDHs disponibles y análisis mediante redes bayesianas | 47 |
| VII.7. Simulaciones de dinámica molecular de la PaBADH | 48 |
| VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 48 |
| VIII.1. Dinámica conformacional del sitio activo de las ALDHs y del nucleótido durante la reacción catalizada | 48 |
| <i>VIII.1.1. Regiones del sitio activo relevantes para la dinámica conformacional</i> | 50 |
| <i>VIII.1.2. Papel de la dinámica del sitio activo durante el paso de desacilación</i> | 54 |
| <i>VIII.1.3. Molécula de agua hidrolítica en las ALDHs</i> | 55 |
| VIII.2. Participación del nucleótido en la reacción catalizada por las BADHs61 | |
| <i>VIII.2.1. Conformación del nucleótido durante la reacción de las ALDHs</i> | 61 |
| <i>VIII.2.3.2 Aducto covalente entre la cisteína catalítica de la PaBADH y el NADPH.</i> | 66 |
| VIII.3. Determinantes estructurales de la especificidad por la coenzima | 75 |
| <i>VIII.3.1. En la PaBADH</i> | 76 |
| <i>VIII.3.2. En la SoBADH</i> | 103 |
| <i>VIII.3.2.1 Unión de la región del mononucleótido de la adenina del NAD⁺</i> | 103 |
| VIII.4. determinantes estructurales de la especificidad por la betaína aldehído en las BADHs..... | 106 |
| <i>VIII.4.1 Identificación de los determinantes potencialmente involucrados en el reconocimiento de la BAL</i> | 106 |
| <i>VIII.4.1 Papel de los residuos que forman la caja de los aromáticos en el sitio activo de la SoBADH</i> | 110 |
| IX. CONCLUSIONES | 114 |
| <i>(1) Papel de los nucleótidos de piridina reducidos en el mecanismo de la reacción catalizada y en la regulación de la actividad enzimática de la PaBADH</i> | 114 |
| <i>(2) Características estructurales que determinan la especificidad dual de la enzima por el NAD⁺ y NADP⁺ de la PaBADH</i> | 116 |
| X. REFERENCIAS | 118 |

RESUMEN

Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) son enzimas ubicuas y muy antiguas que catalizan la oxidación irreversible de una gran variedad de aldehídos a sus correspondientes ácidos, usando como coenzima al NAD^+ o al NADP^+ . Tienen una gran relevancia fisiológica ya que transforman intermediarios aldehídos tóxicos, producidos en el metabolismo o exógenos, en ácidos inocuos, o bien forman compuestos de interés para la célula. Este es el caso de las betaína aldehído deshidrogenasas de la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) y de plantas, la de *Spinacea oleracea* (SoBADH). La PaBADH cataliza la conversión de betaína aldehído (BAL) a glicina betaína (GB) usando como coenzimas al NAD^+ y al NADP^+ con eficiencias catalíticas comparables. Esta reacción es el segundo paso de la ruta de degradación de colina que está presente en aquellas bacterias capaces de crecer en colina o sus precursores como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. Además, la actividad PaBADH ayuda a la bacteria a defenderse frente al estrés osmótico y oxidativo que encuentra en los tejidos que infecta, proporcionándole el osmoprotector GB y NADPH. Por tanto, es una enzima crítica para el crecimiento de este patógeno cuya inhibición lleva a la detención del crecimiento de la bacteria. Es además una enzima representativa de las ALDH9 bacterianas (que son enzimas que tienen actividad con aminoaldehídos), que en muchas bacterias están involucradas en la síntesis del osmoprotector GB. La reacción catalizada por la SoBADH produce GB que la planta usa para defenderse frente a un estrés osmótico causado por sequía, suelos hipersalinos o altas temperaturas. Es una enzima representativa de las ALDH10 de aquellas plantas que son capaces de sintetizar este osmoprotector, lo que las hace más resistentes a este tipo de estrés que las que no lo sintetizan. Para profundizar en el conocimiento del mecanismo catalítico, de las relaciones estructura-función y de la

relevancia fisiológica de la PaBADH y la SoBADH, así como entender las bases estructurales de las diferencias funcionales entre estas dos enzimas homólogas, en este trabajo se abordó mediante cristalografía de proteínas, mutagénesis sitio-dirigida y métodos de cinética enzimática: (1) el papel de los nucleótidos de piridina reducidos en el mecanismo de la reacción catalizada y en la regulación de la actividad enzimática de la PaBADH, (2) las propiedades estructurales que determinan la especificidad dual de la enzima por el NAD(H) y NADP(H) en la PaBADH, y (3) las propiedades estructurales que determinan la especificidad para betaína aldehído en la SoBADH.

Obtuvimos la estructura tridimensional de la PaBADH en complejo con NADPH a 2.3 Å de resolución, la cual mostró un aducto covalente entre el carbono 2 del anillo de la nicotinamida del NADPH y el azufre del grupo tiol de la cisteína catalítica, no observado anteriormente en ninguna enzima, ni entre un tiol de un compuesto de bajo peso molecular y el NADPH. El mecanismo químico de formación de este aducto consiste de una adición de Michael del azufre nucleofílico sobre el centro electrofílico del NADPH. Esta modificación covalente lleva a la inactivación reversible de la enzima en forma dependiente de la concentración del NAD(P)H cuando se incubaba con estos nucleótidos. Por esta razón y por su carácter reversible, proponemos que puede constituir un mecanismo novedoso de regulación de la actividad de la PaBADH, y probablemente de otras ALDHs, de gran importancia *in vivo*, ya que al inactivar a la enzima en forma transitoria, cuando los niveles de NADP(H) son altos, evitará un desbalance entre las concentraciones de nucleótidos oxidados y reducidos. La formación del aducto se da porque la coenzima reducida adopta en el sitio activo una conformación que no había sido antes observada en ninguna ALDH y que sugiere una participación activa del NAD(P)H en el paso de hidrólisis del intermediario tioéster de la reacción catalizada por estas

enzimas. En la estructura cristalográfica del complejo PaBADH-NADPH, el grupo carboxiamida de la nicotinamida del nucleótido forma un puente de hidrógeno con el agua hidrolítica, lo que debe ayudar a la disminución del pK_a del agua hidrolítica y así facilitar que pueda ceder un protón al glutámico catalítico y realizar el ataque nucleofílico que conducirá a la liberación del producto ácido de la reacción. Este importante papel, no conocido previamente, que proponemos juega el NAD(P)H en la reacción justifica y explica el mecanismo cinético conocido de las ALDHs, en el que el nucleótido reducido es el último producto que se libera a pesar de ser el primer producto que se forma. Cálculos teóricos del valor de pK_a del grupo carboxilo del Glu catalítico nos indicaron que éste está protonado a pH fisiológico, por lo que debe perder el protón antes de recibir el del agua catalítica. Proponemos que es el enlace peptídico al cual está unido por puente de hidrógeno el que recibe de forma transitoria el protón del Glu catalítico. En conjunto, nuestras observaciones explican por vez primera cómo puede llevarse a cabo la activación de la molécula de agua requerida en el paso de hidrólisis en las ALDHs, a pesar de lo difícil que es que un grupo carboxilo de $pK_a \sim 4.0$, el del glutámico catalítico, reciba un protón de una molécula de agua de $pK_a \sim 16.0$. La red de puentes de hidrógeno formada en el sitio activo, en la que interviene el nucleótido reducido, permite perturbar estos valores de pK_a de manera que la transferencia del protón pueda llevarse a cabo eficientemente. Por tanto, proponemos que el NAD(P)H juega un papel crítico, no conocido previamente, en la catálisis de las ALDHs.

Se obtuvieron mutantes de la PaBADH en las que la actividad $NADP^+$ -dependiente está muy disminuida, debido a que se obstaculizó la unión del grupo fosfato unido al hidroxilo 2' de la ribosa de la adenina del NADP, mientras que la actividad NAD^+ -dependiente no se afectó. Los cambios realizados en estas mutantes estuvieron dirigidos a: 1) impedir la

formación del puente iónico entre el grupo carboxilo de un residuo de glutámico (E179) y el grupo guanidinio de la R40, por mutación de este último residuo, lo cual libera al grupo carboxilo y le permite ejercer una repulsión electrostática sobre el grupo fosfato del NADP⁺; y 2) introducir un grupo voluminoso en lugar de la S208 de manera que se impida estéricamente la unión del grupo fosfato del NADP⁺. Las enzimas mutantes R40I, S208F y R40I/S208F tienen un cambio en la preferencia por el NAD⁺ sobre NADP⁺ de 20, 169, 64 y 141 veces, respectivamente que la enzima silvestre, sin que se afecte la constante de especificidad por el NAD⁺. Nuestros resultados explican la especificidad dual para el nucleótido de la PaBADH, que se basa en que el E179 puede adoptar dos conformaciones, una compatible con la unión del NADP⁺ y la otra con la del NAD⁺. La primera de ellas requiere tanto de la R40 como de un residuo pequeño en la posición 208.

El estrés osmótico causado por sequía, salinidad y bajas temperaturas es la mayor limitante en la producción agrícola. La síntesis del osmoprotector glicina betaína (GB) a partir de betaína aldehído (BA), catalizada por la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) perteneciente a la familia 10 de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs), permite a ciertas plantas ser más tolerantes al estrés osmótico. Todas las ALDHs 10 de plantas catalizan la oxidación de ω -aminoaldehídos y aldehídos con grupos amonio cuaternarios, sin embargo, sólo algunas de ellas son capaces de oxidar eficientemente a BA. En la estructura tridimensional de la enzima de espinaca (SpBADH) se observó que la Tyr160, Trp167, Trp285 y Trp456, se encuentran en un arreglo apropiado para realizar interacciones catión- π con el grupo trimetilamonio de la BA. Para confirmar su participación en el reconocimiento y unión de BA, cambiamos individualmente estos residuos por alanina. Las enzimas mutantes presentaron un aumento significativo en la K_m (BA) y una disminución en la V_{max}/K_m (BA), particularmente la mutante Tyr160Ala. La

Tyr160 y el Trp456, los cuales están estrictamente conservados en las ALDHs 10 de plantas, determinan la cavidad adecuada para la unión del grupo voluminoso, el trimetilamonio de la BA. Las estructuras tridimensionales de las ALDHs 10 de plantas indican que dicha cavidad se encuentra reducida en las ALDHs 10 que carecen de actividad BADH debido a que un residuo de isoleucina empuja al residuo Trp456 hacia la dirección de la Tyr160. En las ALDHs 10 que presentan actividad BADH, una alanina, Ala441 en la SpBADH, o una cisteína en la posición equivalente a la Ile permiten el espacio adecuado para la unión de la BA. Consistentemente con lo anterior, la mutación de A441I produjo una disminución de la $V_{\max}/K_m(\text{BA})$ de 200 veces mientras que la mutación A441C no presentó efectos. La actividad con otros aminoaldehídos no se vio afectada en las mutantes de la Ala, indicando que un residuo más grande en la segunda esfera de interacción del sustrato aldehído es responsable de la discriminación de la BA en las ALDH10 de plantas.

ABSTRACT

The aldehyde dehydrogenase (ALDHs) are ubiquitous and ancient enzymes catalyzing the irreversible reaction of a large variety of aldehydes to their corresponding acids, using as coenzyme NAD^+ or NADP^+ . They have an enormous physiologic significance as they catalyze the transformation of toxic aldehydes intermediates, produced in the metabolism or exogenous acquired, to innocuous acids, as well as to forming compounds of interest to the cell. This is the case of betaine aldehyde dehydrogenases of the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) and the plant *Spinacia oleracea* (SoBADH). PaBADH catalyzes the conversion of betaine aldehyde (BAL) to glycine betaine (GB) using as coenzymes NAD^+ and NADP^+ with comparable catalytic efficiencies. This reaction is the second step of the route of degradation of choline present in those bacteria capable of growing on this metabolite or on its precursors as the sole source of carbon, nitrogen and energy. The PaBADH activity also helps to protect these bacteria against oxidative and osmotic stress, commonly present in infected tissues, providing the osmoprotectant GB and NADPH. Therefore, it is an enzyme critical to the growth of this pathogen and inhibition of PaBADH leads to growth arrest of the bacterial growth. This is also a representative enzyme of bacterial ALDH9, which in many bacteria are involved in the synthesis of osmoprotectant GB. In plants the reaction catalyzed by the SoBADH produces GB, which in the plant is used to fight osmotic stress caused by drought, high temperatures or hypersaline soils. It is an ALDH10 enzyme representative of plants synthesizing this osmoprotectant, which makes them more resistant to such kind of stress, in comparison with plants unable of its production. To gain deeper understanding of the catalytic mechanism of structure-function relationships and the physiological relevance of SoBADH and PaBADH and to explore the structural basis of functional differences

between these two homologous enzymes we studied using protein crystallography, site-directed mutagenesis methods and enzyme kinetics: (1) the role of reduced pyridine nucleotide in the mechanism of the reaction catalyzed as well as in regulating the enzymatic activity of the PaBADH, (2) the structural properties that determine the NAD⁺ and NADP⁺ dual specificity observed in the PaBADH, and (3) the structural properties that determine the specificity for betaine aldehyde in the SoBADH.

We obtained the three-dimensional structure of the PaBADH in complex with NADPH at 2.3 Å resolution. A covalent adduct between the 2-carbon ring of NADPH nicotinamide and sulfur of the thiol group of the catalytic cysteine was found, this adduct was not previously observed in any known enzyme, or between a low molecular weight thiol and NADPH. The chemical mechanism for the formation of this adduct follows a Michael addition of sulfur nucleophile to the electrophilic center of NADPH. This covalent modification leads to the reversible inactivation of the enzyme in a NAD(P)H concentration dependent manner when incubated with any of these nucleotides. For this reason and their reversibility, we propose this as a novel mechanism for the regulation of PaBADH activity, probably extensive to other ALDHs. This mechanism may have great importance *in vivo*, and inactivate the enzyme transiently when levels NADP(H) are high, in order to seep the ratio of the concentrations of oxidized to reduced nucleotides. The adduct formation occurs because the reduced coenzyme at the active site adopts a conformation not previously observed in any ALDH, which suggests an active participation of NAD(P)H in the hydrolysis step of the thioester reaction intermediate formed during the reaction catalyzed by these enzymes. In the crystal structure of the PaBADH-NADPH complex, the nicotinamide carboxamide group of the nucleotide forms a hydrogen bond with the hydrolytic water, which may decrease the pK_a of the

molecule y thus facilitating the transfer of a proton to the catalytic glutamic and thus favoring the nucleophilic attack leading to the release of the acid product of the reaction. This important NAD(P)H is role, leads previously unknown, is consistent with the known kinetic mechanism of the ALDHs, in which the reduced nucleotide product is the last to be released in spite of being the first product formed. Theoretical calculations of the pK_a of the carboxyl group of catalytic Glu suggested that it is protonated at physiological pH, so it must lose a proton before receiving one from the catalytic water. A network of polar interactions between the reduced nucleotide carboxiamide, the putative water molecule and the catalytic Glu together with the interactions formed between the protonated catalytic Glu and the oxygen atom of the peptide bond formed between the Val453 and Gly454 residues are proposed to play a role in the activation of the water molecule. This involves the participation of the mentioned peptide bond as a transient acceptor of the Glu proton. Overall, our observations explain how the activation of the hydrolytic water molecule can occur, despite the difficulty of a carboxyl group $\sim pK_a$ 4.0, of the catalytic glutamic to receive a proton from a water molecule $\sim pK_a$ 16.0. The network of hydrogen bonds formed in the active site, within the nucleotide, enables to perturbation of these pK_a values, so that the transfer of the proton can take place efficiently. We therefore propose that NAD(P)H plays a critical role, previously unknown in the catalysis of ALDHs. We obtained mutants of PaBADH in which the $NADP^+$ -dependent activity is markedly reduced, because in these mutant enzymes the binding of phosphate group of the adenine ribose of $NADP^+$ is blocked, while the NAD^+ -dependent activity was not affected. Changes in these mutants were designed to: 1) prevent the formation of ion bridge between the carboxyl group of a glutamic acid residue (Glu179) and the guanidinium group of Arg40, by mutation of the latter residue, which released the group carboxyl and

allows to exert an electrostatic repulsion of the phosphate group of NADP⁺ and 2) introducing a bulky group in place of the Ser208 so as to avoid sterically the attachment of the phosphate group of NADP⁺. Mutant enzymes R40I, S208F y R40I/S208F have a shift in the preference for the NAD⁺ to NADP⁺ of about 20, 169, 64 y 141 times, respectively, in comparison to the wild enzyme, without significant affecting the specificity constant of NAD⁺. Our results explain the dual specificity for PaBADH nucleotide, based on two Glu179 conformations, one compatible with NADP⁺ y the other with NAD⁺ binding. The first requires both R40 and a relative small residue at position 208.

Plant Aldehyde Dehydrogenase 10 (ALDH10) enzymes catalyze the oxidation of ω -primary or ω -quaternary aminoaldehydes, but, intriguingly, only some of them, such as the spinach (*Spinacia oleracea*) betaine aldehyde dehydrogenase (SoBADH), efficiently oxidize betaine aldehyde (BAL) forming the osmoprotectant glycine betaine (GB), which confers tolerance to osmotic stress. The crystal structure of SoBADH reported here at 2.3 Å resolution shows tyrosine (Tyr)-160, tryptophan (Trp)-167, Trp-285, y Trp-456 in an arrangement suitable for cation- π interactions with the trimethylammonium group of BAL. Mutation of these residues to alanine (Ala) resulted in significant K_m (BAL) increases and V_{max}/K_m (BAL) decreases, particularly in the Y160A mutant. Tyr160 and Trp456, strictly conserved in plant ALDH10s, form a pocket where the bulky trimethylammonium group binds. This space is reduced in ALDH10s with low BADH activity, because an isoleucine (Ile) pushes the Trp against the Tyr. Those with high BADH activity instead have Ala (Ala-441 in SoBADH) or cysteine, which allow enough room for the binding of BAL. Accordingly, the mutation A441I decreased the V_{max}/K_m (BAL) of SoBADH approximately 200 times, while the mutation A441C had no

effect. The kinetics with other ω -aminoaldehydes were not affected in the A441I or A441C mutant, demonstrating that the existence of an Ile in the second sphere of interaction of the aldehyde is critical to the discrimination against BAL, in some plant ALDH10s. A survey of the known sequences revealed two ALDH10 plant isoenzymes: those known to be GB accumulators have a high-BAL-affinity isoenzyme with Ala or cysteine at this critical position is found, while non GB accumulator plants have a low-BAL-affinity isoenzymes containing Ile. Therefore, BADH activity would not support GB synthesis in non-GB-accumulator plants.

I. INTRODUCCIÓN

El entendimiento de las bases moleculares de la catálisis enzimática es un problema central de la bioquímica. Se presume que la función de una proteína se puede predecir a partir de su secuencia de aminoácidos usando la información disponible de la función de proteínas homólogas (Glasner et al., 2006). Sin embargo, pequeñas diferencias en la secuencia y por consiguiente en la estructura tridimensional pueden producir grandes diferencias en la función de enzimas relacionadas filogenética o estructuralmente (Soskine y Tawfik, 2010). Sumado al problema anterior, el frecuente fracaso en la predicción de las bases estructurales de la acción enzimática, por citar un ejemplo, la participación de residuos en la unión de sustratos, y por consiguiente el escaso éxito en la predicción de los efectos de mutaciones, requiere que se genere un conocimiento más profundo sobre cómo funcionan las enzimas que poseen estructuras, uso de sustratos y mecanismos químicos similares. La determinación de estructuras tridimensionales usando técnicas de difracción de rayos X, combinada con estudios cinéticos y de mutagénesis sitio-dirigida, ha demostrado ser una herramienta muy poderosa para dilucidar los mecanismos y las bases estructurales de las reacciones catalizadas por enzimas. En el caso de las deshidrogenasas dependientes de nucleótidos de piridina, que comparten un dominio de unión al nucleótido con un plegamiento Rossmann, se conoce con gran detalle muchos aspectos de la acción enzimática de muchos de los miembros de esta amplia y ubicua clase de enzimas (revisado por Phillips, 2009), pero aún quedan por resolver muchos detalles de la acción enzimática en términos estructurales y mecanísticos. Un claro ejemplo de lo anterior es el caso de la superfamilia de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs), en el que las generalizaciones realizadas en cuanto a su especificidad y su mecanismo de catálisis en muchas ocasiones no son del todo consistentes con los resultados experimentales

obtenidos con diferentes miembros de esta superfamilia. Para profundizar en el conocimiento del mecanismo de reacción, de las relaciones estructura-función y de la relevancia fisiológica de las betaína aldehído deshidrogenasas de *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) y de *Spinacia oleracea* (SoBADH), en este trabajo abordamos mediante estudios de cristalografía de proteínas, mutagénesis sitio-dirigida y cinética enzimática: (1) el papel de los nucleótidos de piridina reducidos en el mecanismo de la reacción catalizada y en la regulación de la actividad enzimática de la PaBADH; (2) las características estructurales que determinan la especificidad dual de la enzima por el NAD^+ y NADP^+ de la PaBADH; (3) los determinantes estructurales de la especificidad por la betaína aldehído (BAL) en la SoBADH. El estudio de estas dos enzimas, la PaBADH y la SoBADH, pertenecientes a distintas familias de las ALDHs, pero que catalizan la oxidación del mismo sustrato aldehído, nos ofreció una excelente oportunidad de ampliar el conocimiento de la acción enzimática de las ALDHs y de entender cómo pequeñas diferencias estructurales entre dos proteínas homólogas las lleva a desempeñar diferentes funciones fisiológicas.

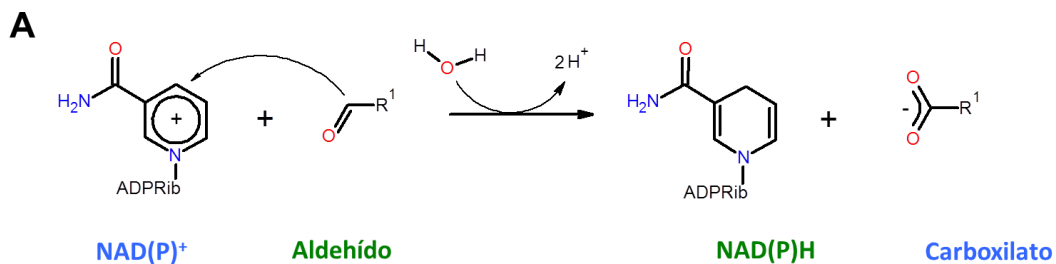
II. ANTECEDENTES

II.1. Generalidades de las ALDHs

II.1.1. Reacción y sustratos

La superfamilia de las ALDHs comprende un grupo diverso de enzimas ubicuas y muy antiguas agrupadas en diversas familias (Julián-Sánchez, et al., 2006). Éstas catalizan la oxidación de una gran variedad de aldehídos a sus correspondientes ácidos, usando como coenzima al NAD^+ o al NADP^+ (Figura 1). Los diferentes miembros de cada familia usan como sustrato a aldehídos similares, aunque su agrupación se ha hecho en base a sus

relaciones filogenéticas. Al respecto es importante mencionar que hay miembros de distintas familias que catalizan las mismas reacciones. Para nombrar una ALDH, en este trabajo se está empleando una clasificación filogenética exhaustiva de las ALDHs actualmente disponibles en las bases de datos (Muñoz-Clares, R.A., comunicación personal) para referirnos a una enzima escribimos primero la primer letra del genero, seguida de la primer letra de la especie del organismo, el nombre ALDH seguido del número a la familia a la cual pertenece una enzima especifica, o bien si se trata de una enzima ampliamente estudiada se usa la abreviatura propuesta en la literatura.



ADPRib Ribosil adenosina(2'-P) difosfato
 R1 una gran variedad de substituyentes

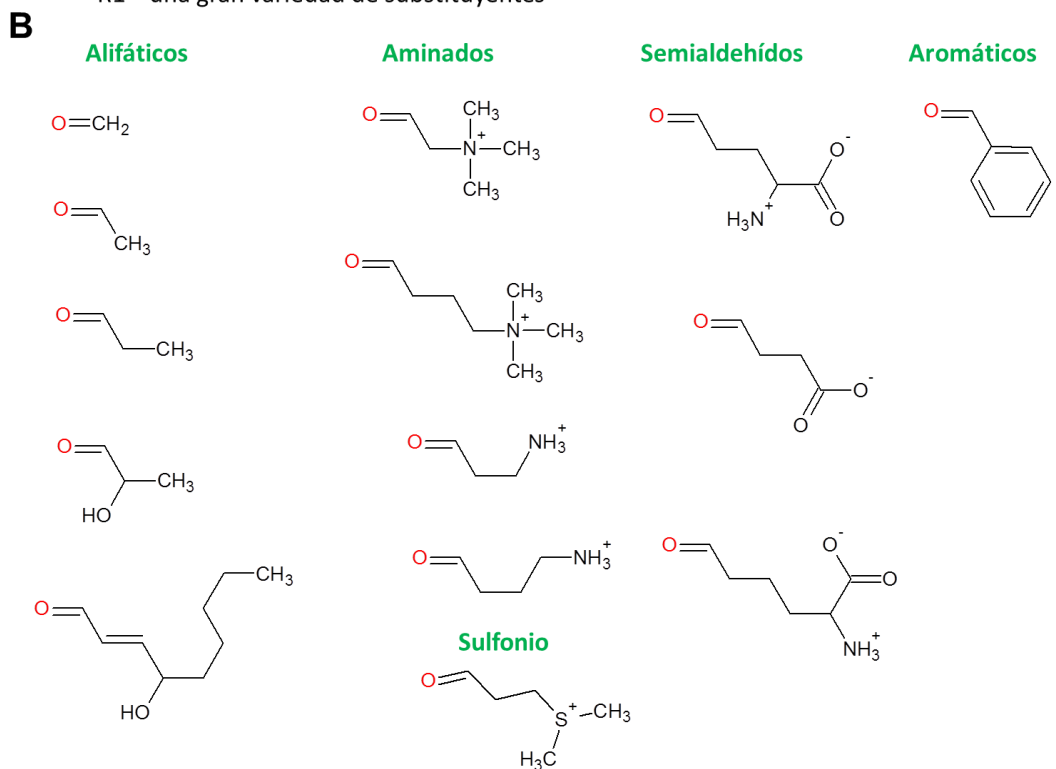


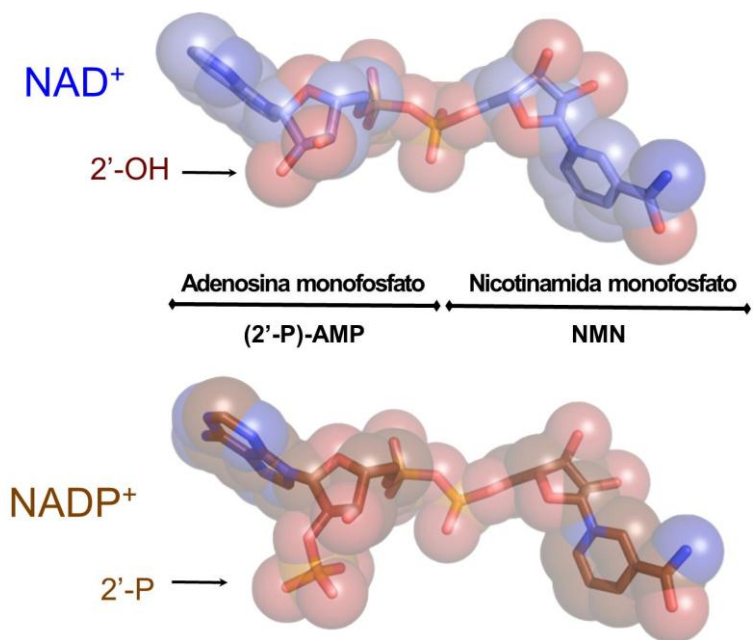
Figura 1. Reacción y sustratos de las ALDHs (EC 1.2.1). (A) Oxidación irreversible de aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos con la concomitante reducción de NAD^+ o NADP^+ . (B) Sustratos usados por algunas ALDHs. Los sustratos se seleccionaron de manera que se mostrara un panorama de los aldehídos con distintos grupos R que las ALDHs son capaces de oxidar.

Algunas ALDHs son muy específicas en cuanto a los sustratos aldehídos que son capaces de usar eficientemente, mientras que otras usan una gran variedad de aldehídos con un arreglo diverso de grupos funcionales. Su participación en rutas metabólicas y en procesos de detoxificación es muy importante, ya que transforman aldehídos tóxicos de origen exógeno o endógeno en ácidos carboxílicos inocuos (Williams, 1959). Un ejemplo de ALDH que posee una función de detoxificación es la benzaldehído deshidrogenasa (ALDH3) que participa en la eliminación de xenobióticos. Otras ALDHs sintetizan compuestos ácidos importantes, como es, por ejemplo, el caso de las betaína aldehído deshidrogenasas (BADHs pertenecientes a diferentes familias de las ALDHs) que catalizan la síntesis de compuestos osmoprotectores, la glicina betaína (GB), que juegan un papel relevante en la respuesta al estrés osmótico (Andresen et al., 1988); o de las succínico semialdehído deshidrogenasas (ALDH5) y aminoadipato semialdehído deshidrogenasas (ALDH7) que forman intermediarios ácidos importantes en el metabolismo de aminoácidos.

II.1.2. Preferencia por la coenzima

El NAD(H) y el NADP(H) (Figura 2) son cofactores usados por las llamadas piridín deshidrogenasas en las reacciones redox que catalizan. Las ALDHs, que catalizan la reacción de reducción del cofactor y que no son capaces de realizar la reacción opuesta de oxidación, se pueden clasificar en tres grupos de acuerdo a su especificidad por el

dinucleótido: (1) las ALDHs dependientes de NAD^+ , que son enzimas que presentan una clara preferencia por el NAD^+ sobre el NADP^+ ; (2) las ALDHs dependientes de NADP^+ , que son enzimas con una preferencia por el NADP^+ sobre el NAD^+ , y (3) las ALDHs con especificidad dual, donde no existe una preferencia por uno de los nucleótidos. Esta especificidad por los nucleótidos de piridina en ciertos casos se puede correlacionar con la



función metabólica de las deshidrogenasas, como proveedoras de NADH o NADPH .

Figura 2. Estructura de los dinucleótidos de nicotinamida y adenina (A) Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+). (B) Nicotinamida adenina dinucleótido 2'-fosfato

(NADP^+). Se indica en ambos nucleótidos, con una flecha, el grupo funcional de la posición 2'. También se remarcan con líneas la adenosina monofosfato y la nicotinamida monofosfato. La figura se realizó con PyMol (<http://www.pymol.org>).

La mayoría de las ALDHs son NAD^+ -específicas y unas pocas son NADP^+ -específicas, como la ALDH3 de rata (Perozich *et al.*, 2000); la ALDH caracterizada de *Vibrio harveyi* (Byers y Meighen, 1984); la gliceraldehído 3-P deshidrogenasa no fosforilante de *Streptococcus mutans* (SmGADP; ALDH11) (Cobessi *et al.*, 1999); la γ -succinato-semialdehído deshidrogenasa de *Escherichia coli* (ALDH5) (Langendorf *et al.*, 2010); la ALDH6 de *Saccharomyces cerevisiae* (Westwater *et al.*, 1997). Otras ALDHs, probablemente un número aun más reducido, son capaces de usar tanto al NAD^+ como al

NADP⁺ eficientemente, como es el caso de las BADHs (ALDH9) de *Arthrobacter globiformis* (Mori *et al.*, 2002), *Xanthomonas translucens* (Mori *et al.*, 1992) y *P. aeruginosa* (PaBADH, Nawasawa *et al.*, 1976;; Velasco-García *et al.*, 2000); la Δ^1 -pirrolina 5-carboxilato deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* (TtP5CDh; ALDH4) (Inagaki *et al.*, 2006); la γ -succinato-semialdehído deshidrogenasa de humano (ALDH5); y las ALDH4 y 5 de *Saccharomyces cerevisiae* (Wang *et al.*, 1998). La especificidad por el nucleótido principal que lógicamente depende de los aminoácidos que interaccionan con el grupo 2'-OH o 2'-P de la adenina de la coenzima, o de aminoácidos que están en la región cercana a donde se unen estos grupos. Sin embargo, cuando se comenzó este trabajo de tesis se desconocían las características estructurales que sustenten la especificidad dual por la coenzima en algunas ALDHs.

II.1.3. Mecanismos cinético y químico de la reacción catalizada por las ALDHs

El mecanismo cinético que se ha encontrado en las ALDHs hidrolíticas es un Bi Bi ordenado en estado estacionario, en el que el primer sustrato en unirse a la enzima es el NAD(P)⁺ y el último producto en disociarse de la enzima es el NAD(P)H (Feldman y Weiner, 1972; Vallari y Pietruszko, 1981; Rivett y Tipton, 1981; Forte-McRobbie y Pietruszko, 1986; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993; Velasco-García *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 2000). Este mecanismo cinético es consistente con el mecanismo químico propuesto para la reacción catalizada que se describe a continuación, pero se desconoce la razón por la cual el nucleótido tiene que unirse antes que el aldehído, siendo que los sitios de entrada de ambos están en lados opuestos de cada subunidad y podría darse una unión al azar. En las BADHs de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993) y riñón de cerdo (Figuroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000) se ha encontrado el mismo mecanismo

ordenado pero con carácter Iso, es decir, después de liberarse el nucleótido reducido existe un paso de isomerización de la enzima libre antes de que pueda iniciarse un nuevo ciclo catalítico.

Las ALDHs catalizan la reacción de oxidación irreversible de un aldehído vía formación de un intermediario covalente entre el sustrato aldehído y la cisteína catalítica (Cys286¹, numeración de la PaBADH). Los aspectos más relevantes del mecanismo químico de las ALDHs han sido revisados de forma extensa por Talfournier et al. (2008) y por Muñoz-Clares et al. (2009 y 2011, artículos en Anexos 1 y 2²). El mecanismo químico propuesto para la reacción catalizada por las ALDHs involucra tres pasos principales (Feldman y Weiner, 1972): (1) el ataque nucleofílico del azufre de la Cys catalítica-286 sobre el carbono carbonílico del sustrato aldehído, lo que lleva a la formación del intermediario tiohemiacetal entre el sustrato y la enzima; (2) la transferencia del hidruro desde el intermediario al anillo de piridina, produciendo un intermediario tioéster y NAD(P)H, y (3) el paso de desacilación, en el que se forma el producto ácido de la reacción por hidrólisis del tioéster (ALDHs hidrolíticas) o por tiolisis llevada a cabo por el acetyl CoA (ALDHs dependientes de CoA). En las ALDHs hidrolíticas ambos productos se liberan de la enzima posteriormente en forma ordenada, siendo el nucleótido reducido el último en salir (Figura 3).

¹ Para referencia de un residuo determinado se usó su código de tres letras y por claridad en las figuras y para describir una mutante se usó el código de una letra.

² Los anexos son copias de los artículos que se obtuvieron como productos tangibles derivados de la tesis

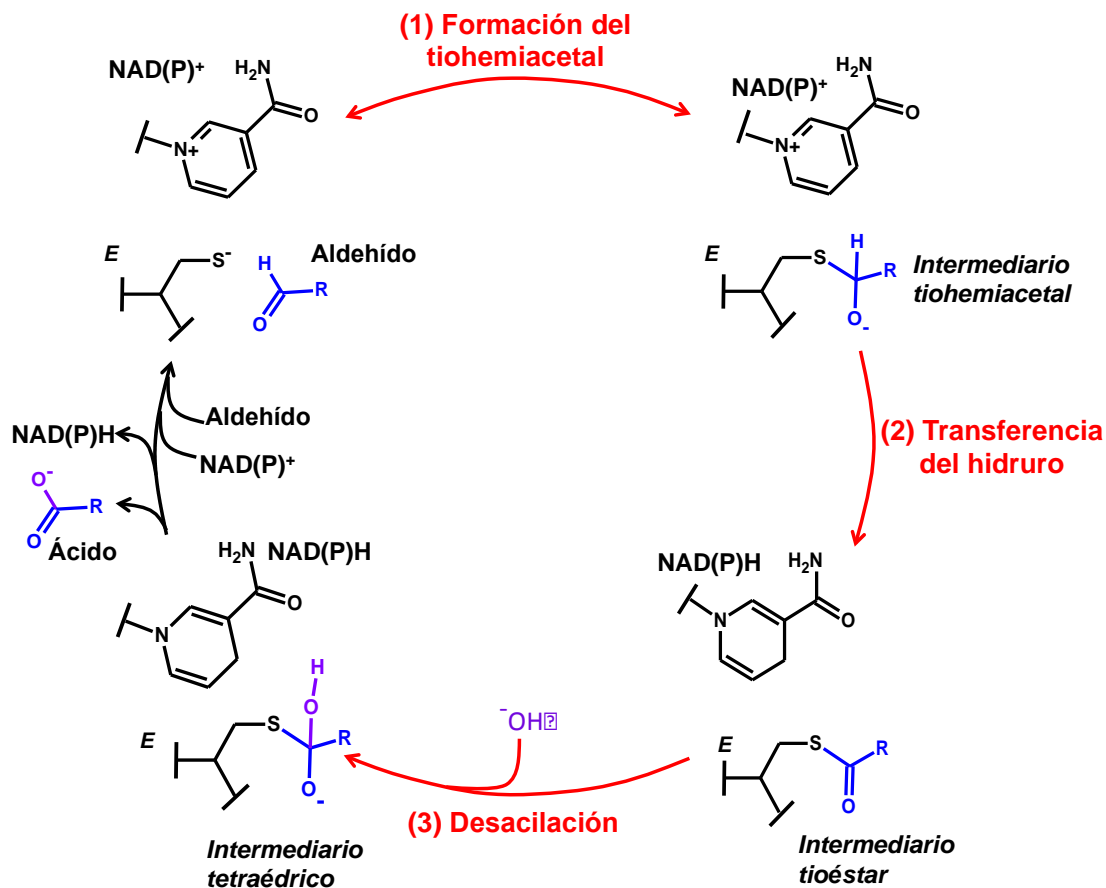


Figura 3. Mecanismo químico mínimo de la reacción catalizada por las ALDHs hidrolíticas. El mecanismo se resumió en los tres pasos indispensables para la oxidación NAD(P)⁺-dependiente de un sustrato aldehído.

I.4. Dinámica conformacional del sitio activo de las ALDHs durante la reacción catalizada

En las estructuras tridimensionales de las ALDHs se ha observado que la Cys286 y el Glu252 pueden adoptar distintas conformaciones. En González-Segura et al. (2009), se clasificaron y sistematizaron estas conformaciones dándoles un significado mecanístico (Figura 4). La Cys286 puede adoptar dos conformaciones alternativas: (1) una conformación llamada “de descanso” porque el grupo tior está en una posición en la que no puede realizar el ataque nucleofílico sobre el sustrato aldehído, y (2) en una conformación llamada “de ataque”, en la que el grupo tior está posicionado para llevar a

cabo este ataque y formar el intermediario tiohemiacetal. La conformación de descanso se observa en algunas estructuras cristalinas de las ALDHs obtenidas con la enzima libre o en complejo con el nucleótido reducido (pero en este último caso la nicotinamida está afuera de la región del sitio activo donde se lleva a cabo la reacción. La cadena lateral del Glu252 se ha observado en tres conformaciones: (1) una conformación que se ha llamado “adentro” (González-Segura et al., 2009), en la que su grupo carboxilo se encuentra cerca de la Cys catalítica de manera que podría abstraerle un protón (Tsybovski et al., 2007), formándose así el ion tiolato mucho más reactivo que el tiol; (2) en una conformación llamada “intermedia” (González-Segura et al., 2009) en la que se toma el protón de la molécula de agua hidrolítica activándola para el ataque nucleofílico, y finalmente en una conformación llamada “hacia fuera”, en la que podría participar en la descarga del protón que tomó del agua hidrolítica, con la ayuda de la Lys162 y Glu464, que forman un sistema de descarga de protones (González-Segura et al., 2009).



Figura 4 Conformaciones adoptadas por la Cys y el Glu catalíticos en las ALDHs. La conformación “de descanso” de la Cys286 y las conformaciones “afuera” e “intermedia” del Glu252 se observaron en el cristal de la PaBADH en complejo con NADP⁺ (código de

acceso PDB 2wme; cadena verde). La conformación de “ataque” de la Cys286 y “adentro” del Glu252 se observaron en la ALDH2 (código de acceso PDB 1o02; cadena azul). La figura se hizo usando PyMol (<http://www.pymol.org>).

II.1.4 Estructura tridimensional de las ALDHs

Las ALDHs son enzimas tetraméricas o diméricas formadas por monómeros de alrededor de 500 residuos de aminoácidos, con una masa relativa (Mr) de aproximadamente de 55,000. Cada monómero tiene un plegamiento característico de la superfamilia de las ALDHs que consiste en un dominio de oligomerización, un dominio de unión del nucleótido y un dominio catalítico (Figura 5) (Liu et al., 1997; Steinmentz et al., 1997).

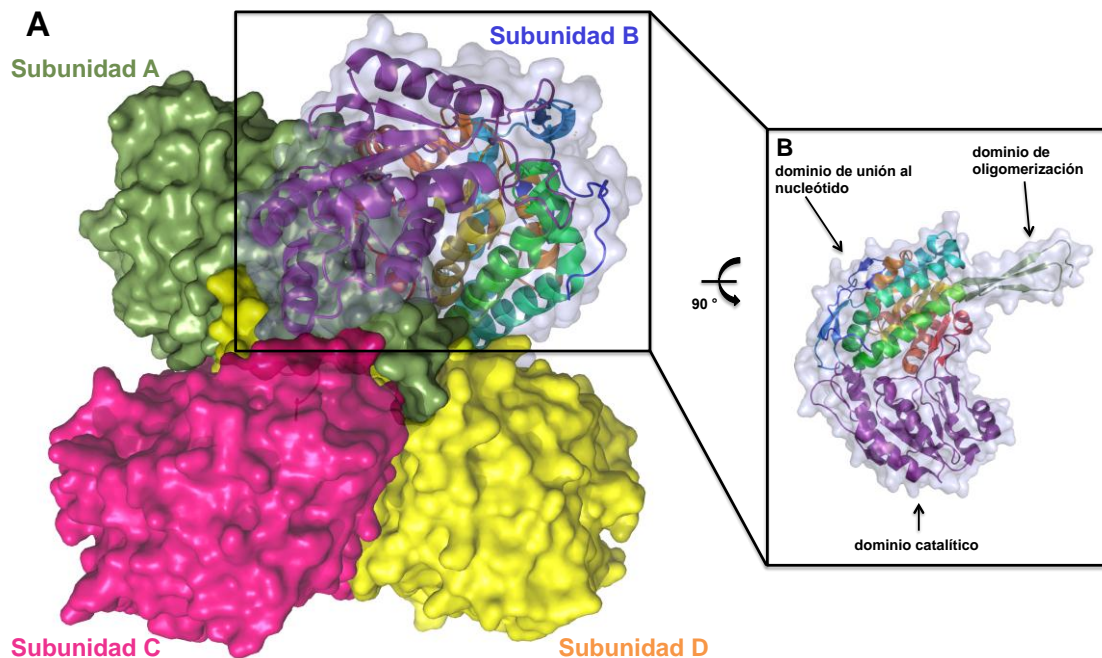


Figura 5 Estructura cristalina de la ALDH2. (A) Se muestra la unidad biológicamente activa de esta enzima que corresponde a un tetramero, un dímero de dímeros. Los dominios típicos del plegamiento de las ALDHs se muestran en la subunidad B. para mayor claridad en (B) se muestra un monómero en donde se aprecian los tres dominios. La figura se hizo usando PyMol (<http://www.pymol.org>) y las coordenadas depositadas en el PDB con el código de acceso 1o00.

II.1.4.1. El dominio de oligomerización

Consta de una hoja β formada por tres o cuatro hebras β que se continúa o extiende con otra hoja β presente en el dominio catalítico de la otra subunidad con la que forma un dímero (Liu et al., 1997). Esta conexión con el dominio de la otra subunidad contribuyen en parte a la estabilización del dímero (Johanson et al., 1998) (Figura 6).

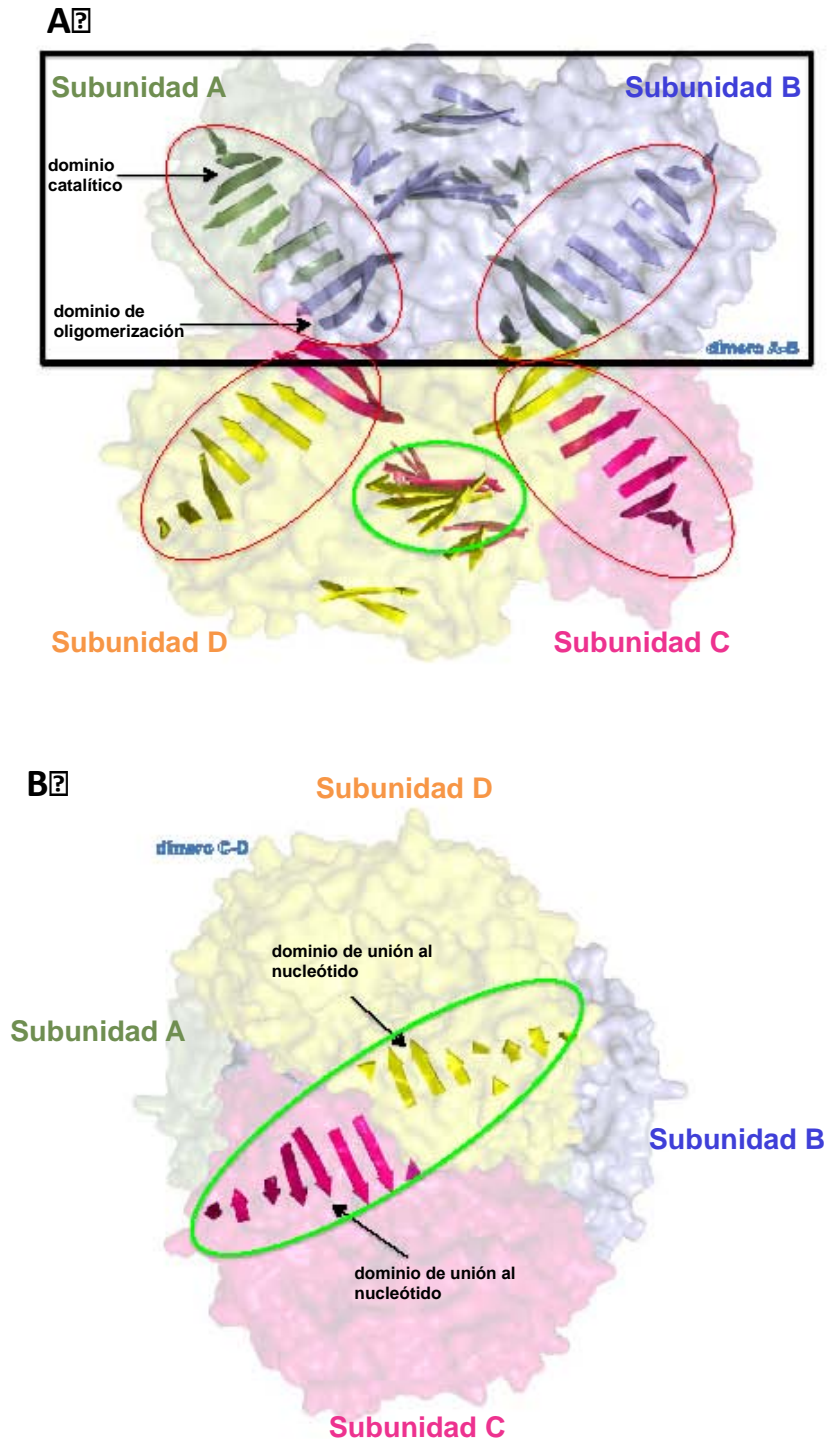


Figura 6 Topología de las hojas β presentes en la estructura tridimensional de las ALDHs. (A) Superficie del tetrámero de la ALDH2 y en listones se remarcan las hebras β de las hojas. En los óvalos se muestra la extensión de las hojas β y en el cuadro se señala el dímero entre las subunidades A y B. (B) Otra vista del tetrámero en donde se muestra la extensión de la hoja β entre los dominios de unión del nucleótido en el dímero C-D. este intercambio de dominios se observa en cada dímero del tetrámero y en aquellas ALDHs dimericas. La figura se adaptó de Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto, 2007 y se hizo usando PyMol (<http://www.pymol.org>) y las coordenadas cristalográficas de la enzima ALDH2 código PBD 1o00.

II.1.4.2. El dominio de unión del nucleótido

Presenta una región con una topología $\beta\alpha\beta\alpha/\beta\alpha\beta\alpha$ (Liu et al., 1997), que es una variación del llamado plegamiento Rossmann (Rossmann, 1974). La variación consiste en que en las ALDHs se observa una hebra β menos que en el de las enzimas que presentan el dominio Rossmann clásico. En este dominio se une la parte de la adenosina mononucleótido(2'-P) del NAD(P)⁺ (Figura 7).

El nucleótido se une en los extremos C-terminal de las hebras de la hoja β paralela, justo entre dos hélices α y las tres primeras hebras β (Rossmann 1974; Eklund y Branden 1987) (Figura 7). En esta región del dominio tipo Rossmann se une la parte de la adenina mononucleótido del NAD(P)⁺. Esta es la parte de la enzima que fija al dinucleótido al sitio activo como un ancla, mientras que la parte de la nicotinamida mononucleótido posee mayor flexibilidad conformacional (Hammenn et al., 2001; Perez-Miller y Hurley 2003). La parte de la nicotinamida mononucleótido no se une en el plegamiento tipo Rossmann del dominio de unión al nucleótido sino en el dominio catalítico. La especificidad por el dinucleótido se determina principalmente por la complementariedad electrostática y

geométrica entre la enzima y el mononucleótido de adenina, entre los que se establecen numerosos puentes de hidrógeno. En las deshidrogenasas en general, la correcta orientación del anillo de la nicotinamida en el dominio catalítico es un prerequisite para la eficiente transferencia del hidruro desde el sustrato que se oxida al dinucleótido oxidado, o desde el dinucleótido reducido al sustrato que se reduce. La nicotinamida mononucleótido se mete por el túnel del nucleótido, donde en la mitad del túnel, justo donde se encuentra la Cys286, el anillo de piridina adquiere una conformación, propuesta como la adecuada para que se transfiera el ion hidruro.

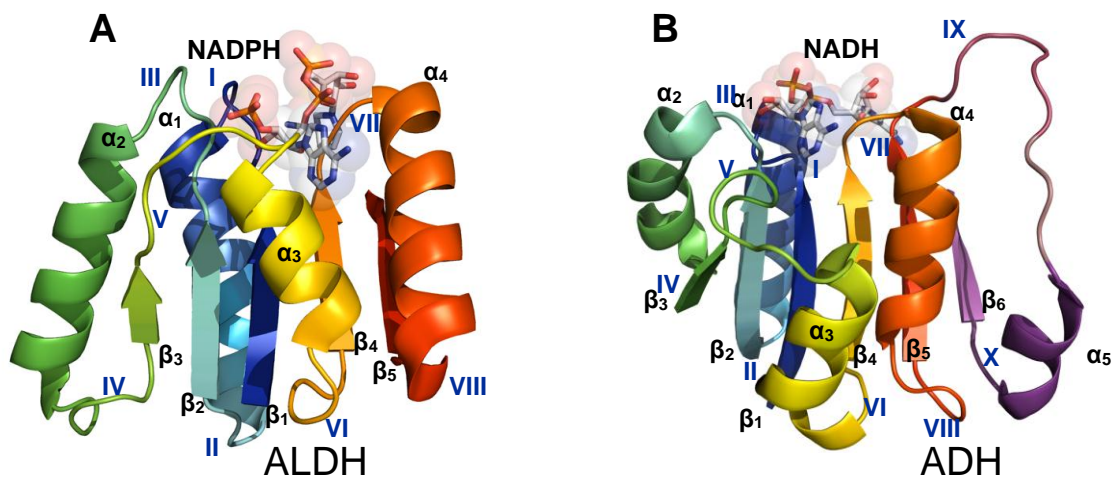


Figura 7. Estructura tridimensional del dominio Rossmann. (A) Dominio no típico observado en las ALDHs (en el cristal de la PaBADH, código PDB 2wme). (B) Dominio típico observado en las alcohol deshidrogenasas (en el cristal de la alcohol deshidrogenasa de caballo código PDB 4dxh). La hebra β de color morado en el p nel B es la que no se observa en las ALDHs. Los números romanos indican la numeración de las asas del plegamiento tipo Rossmann. La figura se hizo usando PyMol (<http://www.pymol.org>).

Los residuos determinantes de la especificidad por la coenzima generalmente se localizan en el carboxilo-terminal de la hebra $\beta 2$ o en el asa que conecta a $\beta 2$ con la hélice αB (Asa III). Ya se conocen los determinantes estructurales de la especificidad de los nucleótidos para las enzimas NAD^+ - y $NADP^+$ -dependientes en distintas familias de deshidrogenasas.

El análisis de la estructura tridimensional de los dominios Rossmann muestra que varios de los residuos de aminoácidos que participan en la unión directa de los nucleótidos se comparten entre los distintos miembros de una familia o superfamilia de deshidrogenasas. La forma en que estas enzimas discriminan a uno u otro nucleótido es mediante las interacciones que establecen con el 2'-OH o el 2'-P de las ribosas de la parte de la adenina del NAD⁺ y del NADP⁺, respectivamente (Figura 2). Estas interacciones se han observado en varias deshidrogenasas por cristalografía de Rayos X y se han confirmado por mutagénesis sitio-dirigida. Este conocimiento ha servido para invertir la especificidad por el nucleótido de una deshidrogenasa cambiando algunos de sus residuos por los que presenta otra deshidrogenasa con especificidad por el nucleótido opuesta (Baker et al., 1992, Nakanashi et al., 1996, Eppink et al., 1999; Perozich et al., 2000, Lunzer et al., 2005, Zhu et al., 2005, Yin y Kirsch, 2006, Mohamed et al., 2007, Despatz et al., 2007, Watanabe et al., 2007, Endo et al., 2007, Bubner et al., 2008, Pire et al., 2009; Zeng et al., 2009). En la mayoría de las deshidrogenasas dependientes de NAD⁺ e incluso en algunas deshidrogenasas dependientes de FAD, se ha observado que un residuo de Asp o de Glu es el responsable de la exclusión estérica y electrostática del grupo 2'-P del NADP⁺ (Figura 8). También se ha observado que la posición equivalente de estos residuos acídicos se encuentra un residuo polar, como una serina, una treonina o una histidina, en aquellas enzimas que usan al NADP⁺ eficientemente (Ahvazi et al., 2000; Cobessi et al., 2000) (Figura 8). En el caso de las enzimas que usan al NAD⁺ y al NADP⁺ con eficiencia catalítica similar, no se puede asignar tan fácilmente los determinantes estructurales involucrados en la especificidad por ambos dinucleótidos y, por ello, los intentos por rediseñar los sitios de unión de estas enzimas a favor de la unión de uno solo de los dinucleótidos en la mayoría de los casos se ha tenido poco éxito. Por ejemplo, en

deshidrogenas de las cuales se conoce su estructura tridimensional y su preferencia por el nucleótido, se ha intentado cambiar la especificidad de: la glucosa deshidrogenasa—que es la enzima que usan algunos organismos en el catabolismo de azúcares sin que se formen intermediarios fosforilados—(John et al., 1994), la glucosa 6-P deshidrogenasa de *Pseudomonas* (Rowland, 1994), la gliceraldehído 3-P deshidrogenasa fosforilante (Corbier et al., 1990), y a algunas isocitrato deshidrogenasas bacterianas. En estos estudios se ha realizado mutagénesis sitio-dirigida para cambiar la especificidad del dinucleótido, pero en todos los casos se afectó la unión de ambos dinucleótidos, aunque se logró obtener alguna preferencia por uno de ellos.

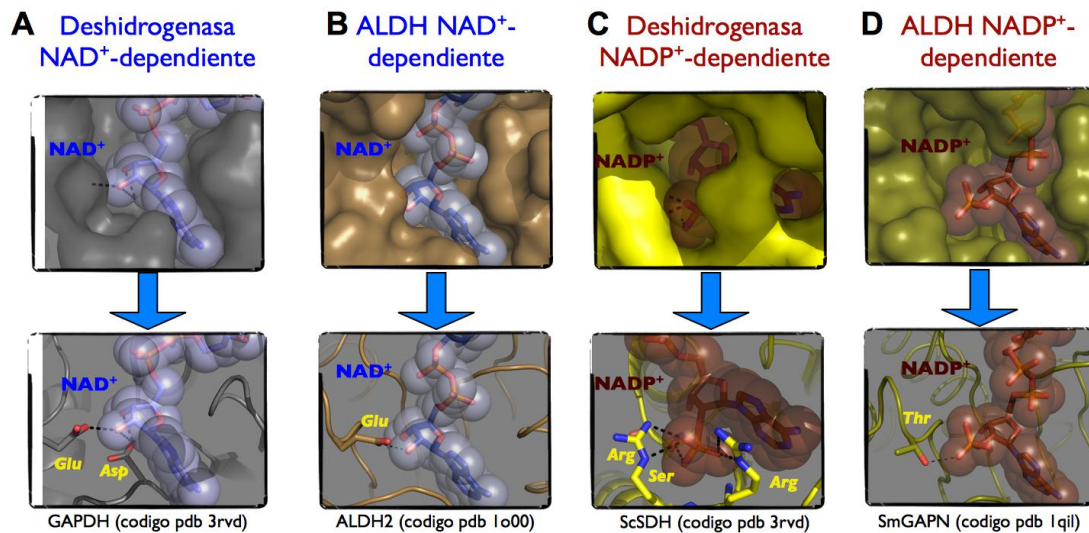


Figura 8. Residuos responsables de la especificidad por el nucleótido en algunas deshidrogenasas dependientes de nucleótidos de piridina. (A) En la ALDH2 (código PDB 1o02). **(B)** En la serina deshidrogenasa de *Sccharomyces cereviciae* (ScSDH, código pdb 3rku). **(C)** En la gliceraldehído 3-P deshidrogenasa fosforilante de espinaca (SoGAPDH, código PDB 3rvd). **(D)** En la SmGAPN (código PDB 2esd). La figura se realizó con PyMol (<http://www.pymol.org>).

En el caso de la superfamilia de las ALDHs, las enzimas NAD^+ -dependientes poseen un residuo de Glu (Glu179, numeración de la PaBADH) que es el responsable de la

especificidad por el NAD^+ (Steinmentz et al., 1997), mientras que en las que NADP^+ -dependientes este residuo ha sido sustituido por Thr o Ser (Ahvazi et al., 2000; Cobessi et al., 2000). Un caso interesante lo constituye la PaBADH que a pesar de poseer el residuo de glutámico en esta posición puede unir tanto al NAD^+ como al NADP^+ gracias a un residuo de arginina que lo aleja de la proximidad del 2-P de la ribosa de la adenosina del NADP^+ (González-Segura et al., 2009). Otros ALDHs también poseen el Glu179 y pueden usar y pueden usar ambos nucleótidos como son el caso de la ALDH3 de rata (RnALDH3) y la TtP5CDh.

II.1.4.3. El dominio catalítico

Presenta una topología β/α . Una parte de este dominio es similar al plegamiento Rossmann, lo que se puede explicar en parte porque la nicotinamida mononucleótido del NAD(P)^+ , se une en el dominio catalítico y probablemente esta topología facilite su unión. La cisteína catalítica se encuentra en un asa, justo en la posición +3 de un giro β , motivo de la estructura secundaria conservada en todas las ALDHs de las que se conoce su estructura tridimensional. Otros residuos importantes para la catálisis se encuentran en este dominio, como la base general, el Glu catalítico (Glu252, numeración de la PaBADH) el NH_2 de la Asn153 que junto con el nitrógeno amídico de la Cys286 forman el hoyo del oxianión; los residuos que participan en el mecanismo de descarga del protón, la Lys162 y el Glu464 (González-Segura et al., 2009); así como la Thr248 que es importante para la colocación del anillo de la nicotinamida en la conformación de transferencia del hidruro (Pailot et al., 2006; Ho et al., 2006).

II.2. Generalidades de la PaBADH y de la SoBADH)

Recientemente se han publicado revisiones sobre las BADHs (Muñoz-Clares et al., 2009; Fitzgerald et al., 2009) por lo que sólo se mencionarán aquí aquellos aspectos funcionales y estructurales de las enzimas de *Pseudomonas* (PaBADH) y de espinaca (SoBADH) relevantes para este trabajo. Con fines comparativos se hará hincapié en sus diferencias como justificación de por qué es importante realizar estudios bioquímicos en dos proteínas homólogas, estudios que pudieran parecer redundantes.

II.2.1 Propiedades cinéticas

Como ya se ha mencionado la PaBADH tiene especificidad dual para el nucleótido. El mecanismo cinético preferido de las reacciones NAD^+ - y NADP^+ -dependientes de la PaBADH es un Bi-Bi ordenado en estado estacionario, para ambos nucleótidos (Velasco-García et al., 2000; Figura 9). El mecanismo cinético de la BADH de *Amaranthus hypochondriacus* (AhBADH), una enzima ALDH10 muy similar funcional y estructuralmente a la SoBADH, es un Iso Bi-Bi ordenado en estado estacionario (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares 1993; Figura 9), sin que por el momento se conozcan las causas del carácter Iso de este mecanismo.

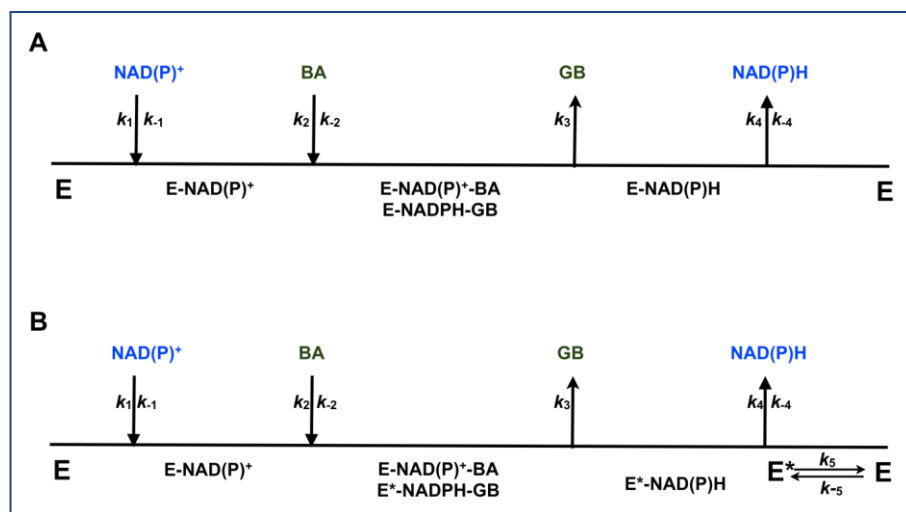


Figura 9. Mecanismo cinético de las reacciones catalizadas por las BADHs. (A) Mecanismo Bi-Bi ordenado de la PaBADH. **(B)** Mecanismo Iso Bi-Bi ordenado de la AhBADH.

La PaBADH y la AhBADH, que tomaremos como enzima representativa de la SoBADH dado que pertenecen a la misma familia, presentan importantes diferencias en su afinidad y especificidad por el nucleótido, en su afinidad por el aldehído y en su k_{cat} . La PaBADH cataliza la reacción de oxidación NAD^+ -dependiente de BAL con una eficiencia catalítica global (k_{cat}/K_aK_b) comparable a la de la AhBADH, ya que aunque esta enzima posee una muy baja k_{cat} y presenta mayor afinidad tanto por el NAD^+ como por la BAL que la PaBADH (Tabla 1). Pero la enzima de *P. aeruginosa* tiene una constante de especificidad para el NAD^+ 300 veces menor que la enzima de amaranto. Además, la AhBADH prefiere al NAD^+ más de 50 veces sobre el $NADP^+$, a diferencia de la PaBADH que prefiere al $NADP^+$ 4 veces sobre el NAD^+ .

| | PaBADH ¹ | | AhBADH ² |
|--|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | Reacción con NAD ⁺ | Reacción con NADP ⁺ | Reacción con NAD ⁺ |
| k_{cat} (s ⁻¹) | 139 ± 6 | 131 ± 6 | 1.9 ± 0.1 |
| K_a (M) | 385 ± 43 | 83 ± 9 | 40 ± 4 |
| K_b (M) | 435 ± 45 | 507 ± 43 | 56 ± 6 |
| K_{ia} (M) | 185 ± 35 | 48 ± 8 | 40 ± 6 |
| k_{cat}/K_a (M ⁻¹ s ⁻¹) | 3.6x10 ⁵ | 1.57x10 ⁶ | 4.75x10 ⁴ |
| k_{cat}/K_b (M ⁻¹ s ⁻¹) | 3.17x10 ⁵ | 2.55x10 ⁵ | 3.39x10 ⁴ |
| k_{cat}/K_aK_b (M ⁻² s ⁻¹) | 8.25x10 ⁸ | 3.0x10 ⁹ | 8.48x10 ⁸ |
| $k_{cat}/K_{ia}K_b$ (M ⁻² s ⁻¹) | 1.71x10 ⁹ | 5.25x10 ⁹ | 1.19x10 ⁹ |

Tabla 1. Parámetros cinéticos de las reacciones catalizadas por las BADHs

¹Valores tomados de Velasco-García et al., 2000. ²Valores tomados de Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993.

II.2.2. Papel fisiológico

II.2.2.1. En *P. aeruginosa*

P. aeruginosa posee la capacidad de crecer en colina o en sus precursores, sustancias éstas abundantes en los sitios de infección (Pesin y Candia, 1982; Wright y Clements, 1987), como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Nawasawa et al., 1976; Sage et al., 1997). La PaBADH es una enzima crítica para el crecimiento de la bacteria en presencia de colina o los precursores de ésta ya que cataliza el segundo paso de la ruta catabólica de colina (Nawasawa et al., 1975 y 1976; Sage et al., 1997; Velasco-García et al., 1999 y 2005) (Figura 10 y Figura 11). Cataliza la oxidación de BAL a GB, usando tanto al NAD⁺

como al NADP^+ como coenzimas con eficiencias catalíticas comparables en ambas reacciones (Velasco-García et al., 2000). Considerando esta utilización dual del dinucleótido, es probable que la PaBADH sea una enzima anfibólica que provea a la bacteria de equivalentes de reducción tanto para obtener energía (NADH) como para biosíntesis y destoxificación celular de agentes oxidantes (NADPH), esto último debido el estrés oxidativo al que la bacteria está sometida por los mecanismos de defensa de los hospedadores, por ejemplo el humano. La PaBADH comparte esta función fisiológica con otras ALDH9 bacterianas que pueden crecer en medios que contengan sólo colina (Mori et al., 2002; Smith et al., 1988), mientras que otras de estas enzimas tienen como función fisiológica la síntesis de GB en respuesta a un estrés osmótico (Falkenberg y Strøm, 1990).

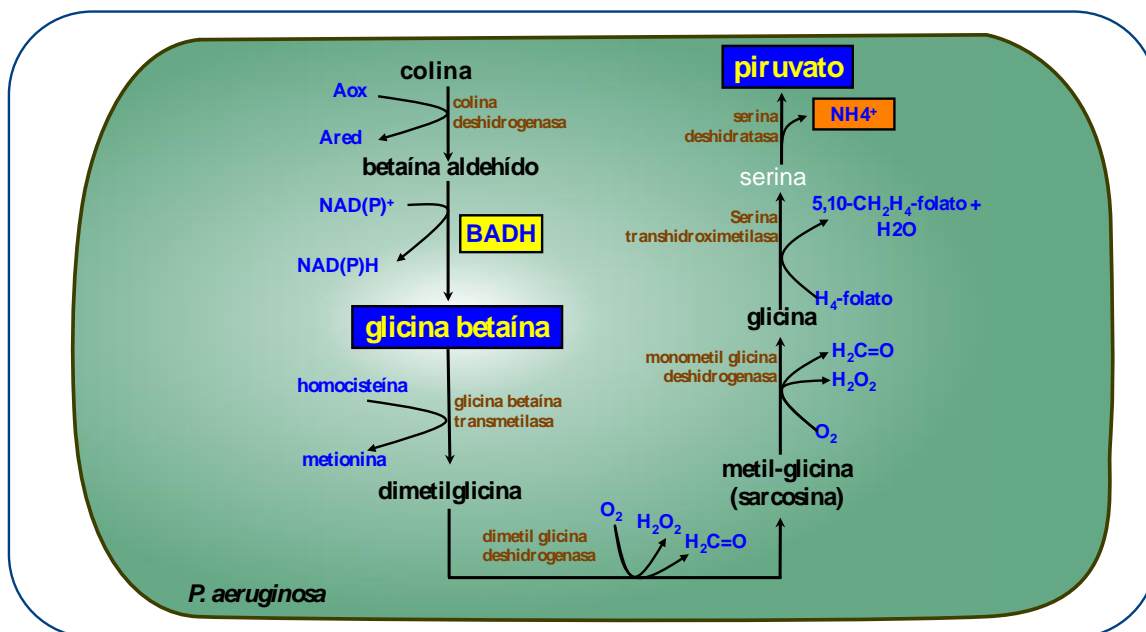


Figura 10. Papel fisiológico de las PaBADH. Ruta de degradación de la colina en *P. aeruginosa* (Velasco-García et al., 2006; Diab et al., 2006).

Durante el catabolismo de colina y sus precursores la actividad de la PaBADH provee a la bacteria del osmoprotector GB, que de ser degradado representa una fuente de carbono, nitrógeno y energía, mientras que si se acumula funcionará como osmoprotector.

Cuando *P. aeruginosa* es sometida a estrés osmótico se reprime la expresión de las enzimas involucradas en el catabolismo de GB, lo que conduce a su acumulación (Diab et al., 2006). Este mismo mecanismo de regulación había sido observado en *Sinorhizobium meliloti* (Smith et al., 1988). En *P. aeruginosa* la expresión de la BADH se induce por colina (Nawasawa et al., 1976; Velasco-García et al., 2006), al igual que en todas las otras bacterias en que se ha estudiado su expresión. Pero la expresión de la PaBADH no se aumenta por una alta concentración de sales (Velasco-García et al., 2006), a diferencia de otros organismos que usan a la GB sólo como un osmoprotector y no la catabolizan en los que la expresión de la BADH se induce además de por colina por bajas temperaturas, una disminución en el contenido de agua o por estrés salino (Falkenberg y Strøm, 1990).

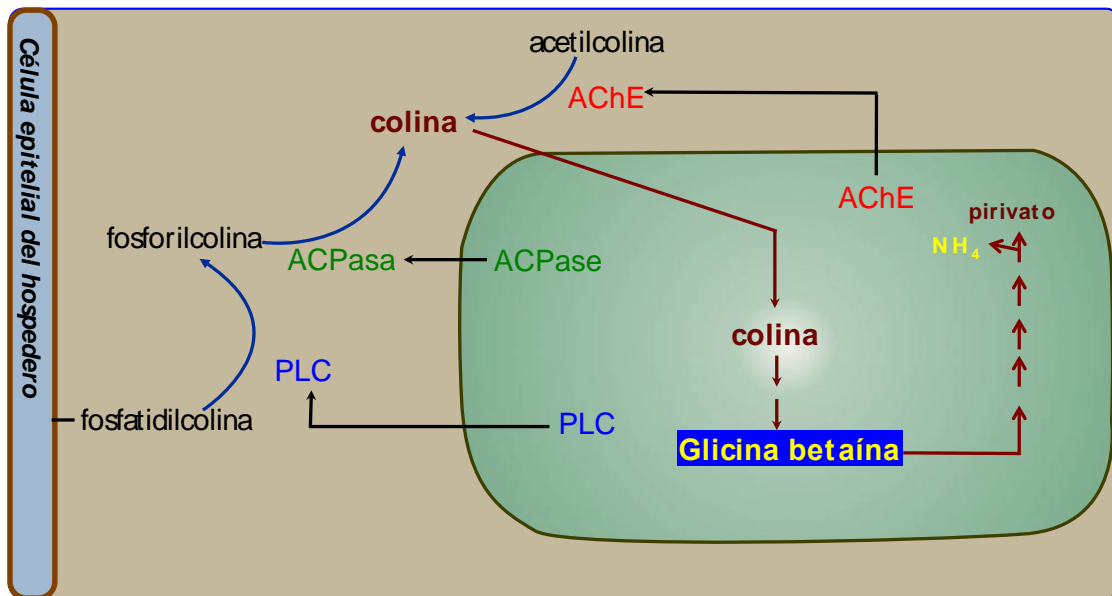


Figura 11. Catabolismo de colina y sus moléculas precursoras en *P. aeruginosa*. La bacteria expresa tres enzimas críticas: La fosfolipasa C (PLC), la fosfatasa ácida (ACPasa) y la acetilcolinesterasa (AChE). La actividad de estas enzimas lleva a la producción de colina a partir de fosfatidil colina y de acetilcolina.

Aunque *P. aeruginosa* utiliza para su crecimiento preferentemente a algunos intermediarios del ciclo de Krebs como succinato (Hylemon y Phibbs, 1972; Ng y Dawes,

1973, Hester et al., 2000, Diab et al., 2006), también metaboliza glucosa a través de la ruta de Entner-Doudoroff (Lessie y Phibbs, 1984). Las enzimas y los transportadores de esta vía se inducen cuando la bacteria crece en presencia de glucosa y se reprimen por algunos intermediarios del ciclo de Krebs (Wolff et al., 1991). La segunda reacción de la ruta de Entner-Doudoroff es catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), una enzima también anfibólica y la principal proveedora de NADPH cuando la bacteria crece en glucosa (Hunt y Phibbs, 1983; Ma et al., 1998). En ausencia de glucosa, o cuando la ruta de su degradación está reprimida, la PaBADH podría suplir la función de la G6PDH si la bacteria se encuentra en presencia de colina. A este respecto es importante señalar que la PaBADH se expresa y está activa aun en presencia de glucosa (Velasco-García et al., 2006a) o de succinato (Záldivar-Machorro, 2011). Estos hallazgos sugieren que la PaBADH no está sujeta a represión catabólica, o lo está a una represión catabólica parcial, lo que apoya nuestra hipótesis de que esta enzima podría ser una importante fuente de NADPH cuando la bacteria crece bajo las condiciones de infección, en donde por efecto del estrés oxidativo que producen los macrófagos del hospedador, la demanda bacteriana de NADPH es mayor. Otras reacciones que podrían generar NADPH en *P. aeruginosa* son las catalizadas por la glutamato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa y la transhidrogenasa (<http://www.pseudomonas.com>). Hasta ahora no se conoce la regulación de la expresión y de la actividad de estas enzimas en función de las condiciones ambientales en las que se encuentre la bacteria, pero pudiera darse alguna condición en que estas enzimas no estén funcionando y la principal proveedora de NADPH sea la PaBADH, si es que la bacteria está creciendo en presencia de colina.

II.2.2.1. En *S. oleracea*

El estrés osmótico causado por sequía, salinidad y bajas temperaturas es la mayor limitante en la producción agrícola a nivel mundial. Ciertas plantas son capaces de sintetizar y acumular GB, que es el osmoprotector más eficiente hasta hoy conocido (Courtenay et al., 2000), a partir de BAL en una reacción catalizada por la enzima BADH (Figura 12). Entre éstas se encuentra espinaca (Hanson et al., 1985; Weretilnyk y Hanson, 1989; Arakawa et al., 1987) por lo que la función fisiológica de la SoBADH es la síntesis del osmoprotector que le permite a la planta ser más tolerante al estrés osmótico (Hanson y Wyse 1982; Weretilnyk et al., 1989). Como se mencionó, las BADHs de plantas forman parte de las ALDH10, y la mayor parte de estas enzimas que han sido caracterizadas bioquímicamente poseen actividad de aminoaldehído deshidrogenasa (AMADH) ya que pueden catalizar la oxidación de ω -aminoaldehídos, como el 3-aminopropionaldehído (APAL) y el 4-aminobutiraldehído (ABAL) (Vojtěchová et al., 1997; Trossat et al, 1997; Šebela et al, 2000; Livingstone et al., 2003; Oishi y Ebina, 2005; Fujiwara et al., 2008; Bradbury et al., 2008) y de ω -trimetilaminoaldehídos, que poseen un grupo trimetilamonio (TMA), como la betaína aldehído (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Burnet et al., 1995; Nakamura et al., 2001; Fujiwara et al., 2008; Kopěčný et al., 2011) y el 4-N, trimetilaminobutiraldehído (TMABAL) (Brauner et al., 2003; Fujiwara et al., 2008).

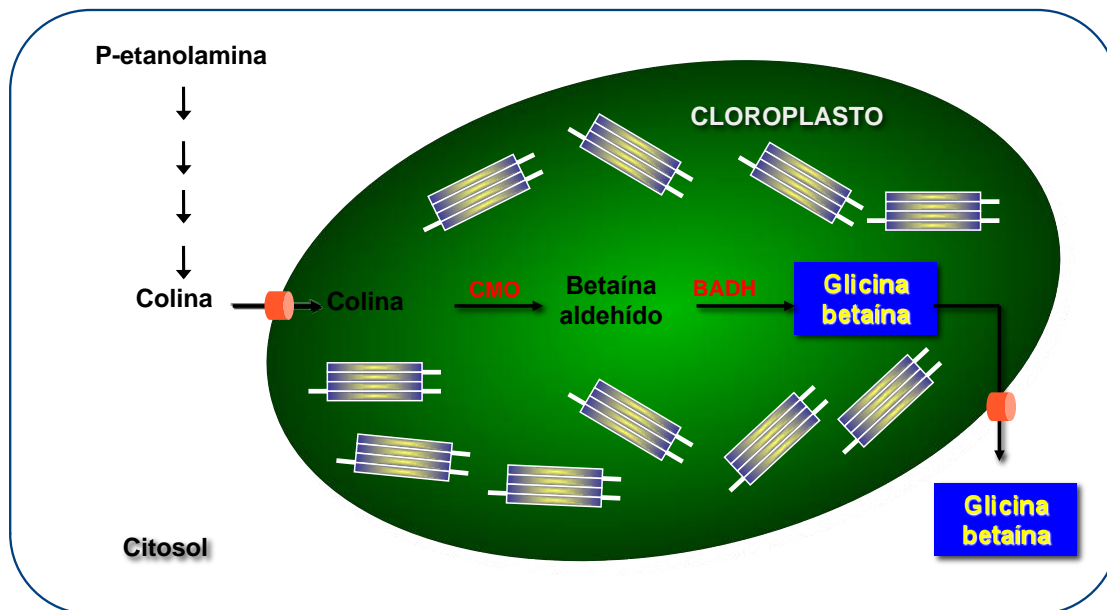


Figura 12. Papel fisiológico de las SoBADH. Ruta de síntesis de GB en cloroplasto (Weretilnyk y Hanson, 1989).

Además, pueden oxidar al dimetilsulfoniopropionaldehído (DMSPAL) (Vojtěchová et al., 1997; Trossat et al., 1997), cuyo grupo dimetilsulfonio presenta similitud estructural al TMA. La oxidación del DMSPAL produce el osmoprotector dimetilsulfoniopropionato (DMSP) (Figura 13). Dependiendo del sustrato usado las ALDH10 de plantas pueden participar en numerosos procesos fisiológicos (Figura 13); tales como la síntesis de los osmoprotectores GB, DMSP, GABA y β -alanina betaína, otro osmoprotector usado por ciertas plantas (Rathinasabapathi et al., 2000), o el catabolismo de poliaminas y la síntesis de carnitina. Existen reportes de enzimas ALDH10 de plantas que son incapaces de usar a la BAL como sustrato, aunque si usan de forma eficiente a los otros ω -aminoaldehídos (Sébela et al., 2010), al inicio de este trabajo se desconocían las razones de la especificidad por el sustrato en las ALDH10. De igual forma, se desconocían los residuos de aminoácidos involucrados en la unión de los ω -aminoaldehídos.

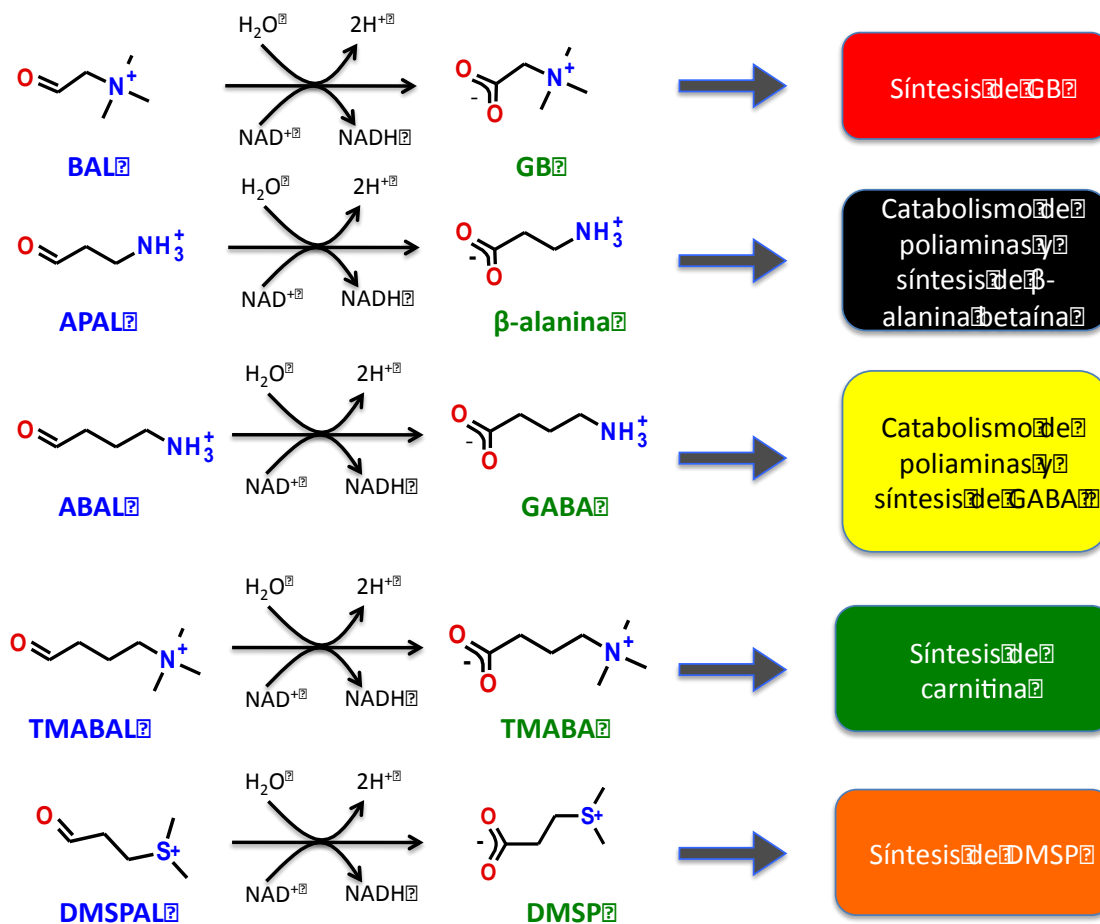


Figura 13 Diferentes papeles fisiológicos de las reacciones catalizadas por las ALDH10 de plantas dependiendo del sustrato usado.

III. HIPÓTESIS

Las diferencias en las propiedades cinéticas, afinidad y especificidad por sustratos entre la PaBADH y la SoBADH están determinadas por diferencias sutiles en las estructuras de estas dos enzimas que no involucran la topología global de las ALDHs, ni a los residuos catalíticos.

IV. PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Ampliar y profundizar en el conocimiento de la función y el papel fisiológico de las ALDHs, mediante (1) la determinación y análisis de las estructuras tridimensionales de la

PaBADH y de la SoBADH, y (2) el estudio de las propiedades cinéticas y de regulación de ambas enzimas silvestres y de sus mutantes seleccionadas y construidas en este trabajo. De esta manera se pretende entender algunas de las causas estructurales que determinan diferencias funcionales importantes entre dos enzimas homólogas.

V. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el mecanismo de catálisis de las PaBADH y SoBADH para extender el conocimiento de la reacción catalizada por las ALDHs.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener las estructuras tridimensionales de la PaBADH en complejo con NADPH y de la SoBADH en complejo con NAD⁺.
2. Identificar en las estructuras cristalinas de la PaBADH y de la SoBADH residuos potencialmente críticos para la unión del nucleótido y de la BAL.
3. Obtener y caracterizar enzimas mutantes de la PaBADH cambiando por mutagénesis sitio dirigida los residuos de aminoácidos que puedan ser críticos para la unión del NADP(H) y enzimas mutantes de la SoBADH de los residuos de aminoácidos que puedan ser críticos para la unión de la BAL.
4. Estudiar el papel del NAD(P)H en la regulación de la actividad de las BADHs.
5. Estudiar los determinantes estructurales de la especificidad por BAL en las BADHs

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

La mayoría de los materiales y los métodos empleados en esta tesis se describen en los artículos derivados de ella. A continuación se describen brevemente sólo aquellos que no se incluyen en estos artículos.

VII.1. Identificación de residuos críticos en la unión de los nucleótidos de la PaBADH y en la SoBADH

La identificación de los residuos de aminoácidos que potencialmente pueden participar en la unión de los nucleótidos NAD(P)⁺ y NAD(P)H se realizó empleando como herramienta los programas de cómputo PyMOL (<http://www.pymol.org>), Chimera-UCFC (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) y Ligplot (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/ligplot/ligplot.html>), estimando el tipo y la distancia de los enlaces entre los grupos químicos de las cadenas laterales de los aminoácidos identificados y los nucleótidos presentes en las estructuras cristalinas actualmente disponibles en el PDB o en nuestro grupo de trabajo. Algunas de estas estructuras se obtuvieron en este trabajo de tesis: la PaBADH silvestre y mutante C286A en complejo con NADPH (Díaz-Sánchez et al., 2011; códigos de acceso PDB 2wox y 3zqa, respectivamente) y la SoBADH en complejo con NAD⁺ (Díaz-Sánchez et al., 2012; código de acceso PDB 4aom). El análisis de otras estructuras depositadas en el PDB, pero que aún no han sido descritas en un artículo, ha servido para interpretar resultados y proponer algunos experimentos. Éste es el caso de la mutante E252A de la PaBADH en complejo con NADPH (código de acceso PDB 2xdr); de la PaBADH en complejo con NADH y de la PaBADH silvestre y la mutante V453F en su forma apo. Se usó también la estructura de la PaBADH en complejo con NADP⁺ (código de acceso PDB 2wme) ya analizada en un artículo publicado (González-Segura et al., 2009). Alternativamente se buscaron residuos

potencialmente críticos para la unión de los nucleótidos usando el programa ROSSETA (Chivian et al., 2003), con el cual se realizaron mutaciones sitio-dirigidas *in silico* (individuales o múltiples), para lo cual contamos con la colaboración del Dr., Rogelio Rodríguez-Sotres del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM.

VII.2. Mutagénesis sitio-dirigida y sobreexpresión de las enzimas recombinantes en *E. coli*

Las enzimas PaBADHs y SoBADH mutadas se generaron, expresaron y purificaron como se describió en González-Segura et al., 2005 y Díaz-Sánchez et al., 2011 y 2012 (Anexos 3 y 4).

VII.3. Ensayos enzimáticos y estudios cinéticos en estado estacionario

La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente a 340 nm siguiendo la formación de NAD(P)H, de acuerdo al método descrito por Velasco-García et al. (1999). El medio de reacción estándar consiste en betaína aldehído 1 mM y NAD(P)⁺ 0.3 mM en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0 para la PaBADH y BAL 0.5 mM y NAD⁺ 1 mM en amortiguador de Hepes-KOH 50 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0 para la SoBADH.

Los patrones de velocidad inicial se obtuvieron a partir de las reacciones NAD(P)⁺-dependientes catalizadas por las PaBADH silvestre y mutantes, como se describió en Velasco-García et al. (2000). Los datos de velocidad inicial se ajustaron de forma global a la ecuación correspondiente a un mecanismo Bi-Bi ordenado en estado estacionario (Ecuación 1). En los casos en los que se observó una cooperatividad positiva de unión del nucleótido se usó una ecuación modificada en la que se incluyó el coeficiente de Hill en los términos que involucran la unión del nucleótido (Ecuación 2).

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

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

Los parámetros cinéticos estimados de las reacciones NAD⁺ y NADP⁺-dependientes a partir de los valores de los ajustes globales se presentan en la Tabla 6. Las constantes de especificidad para el dinucleótido y para la betaína aldehído son expresadas como k_{cat}/K_a y k_{cat}/K_b respectivamente las constantes de especificidad de la reacción global son expresadas como $k_{cat}/K_a K_b$ y $k_{cat}/K_{ia} K_b$ (Plapp, 1995). Las cinéticas de saturación de la SoBADH silvestre y mutantes se realizaron como se describió en Díaz-Sánchez et al. (2012; Anexo 4).

VII.4. Constantes de disociación del NAD(P)⁺

La unión al equilibrio del NAD(P)⁺ a la PaBADH silvestre y mutantes y a la SoBADH se midió siguiendo el apagamiento de la fluorescencia intrínseca producido por la interacción entre el nucleótido y la enzima, como se describe en Velasco-García et al. (2000). Para evitar la excitación de fenilalaninas y tirosinas, se usó una longitud de onda de excitación de 296 nm y la intensidad de la luz emitida se obtuvo a partir de un barrido de 300 a 450 nm en un espectrofluorómetro (Shimadzu FS5000). Dado que el centro espectral de masas no se afecta por la unión del nucleótido, se usaron los datos de intensidad de fluorescencia máxima. Los datos experimentales se corrigieron teniendo en cuenta los efectos de la dilución de la enzima y de filtro interno, éste último causado por la luz que absorbe el nucleótido oxidado a la longitud de onda que emiten los triptofanos, y se ajustaron a la ecuación de una hipérbola o una sigmoide, como fue apropiado (Ecuaciones 3 y 4, respectivamente).

$$\Delta F = \Delta F_{\max} [L] / (K_D + [L]) \quad \text{(Ecuación 3)}$$

$$\Delta F = \Delta F_{\max} [L]^n / (K_D^n + [L]^n) \quad \text{(Ecuación 4)}$$

VII.5. Cinética rápida

Se midió la velocidad de las reacciones NAD(P)⁺-dependientes de oxidación de la betaína aldehído, catalizadas por las PaBADH silvestre y mutantes y de la SoBADH silvestre, siguiendo la formación del nucleótido reducido en un intervalo de milisegundos, usando concentraciones saturantes de sustratos. Para estos estudios se utilizó un espectrofotómetro de flujo detenido (SX-18MV de Applied Photophysics®), amablemente cedido por la Dra. Silvia Castillo del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Química, UNAM. La aparición del NAD(P)H se siguió por fluorescencia, excitando a 340 nm y detectando la emisión a longitudes de onda superiores a 420 nm por medio de un filtro adecuado, o siguiendo la absorbancia a 340 nm en un detector de luz UV/Vis. En el caso de que los trazos mostraron un “estallido” previo al establecimiento de la velocidad de estado estacionario, los datos se ajustaron a una ecuación que incluye una exponencial creciente y la de una recta (Ecuación 5), y en el caso de las reacciones que no presentaron un estallido a la ecuación de una recta.

$$[\text{NAD(P)H}] = (A - I)e^{kt} + v \cdot x \quad (\text{Ecuación 5})$$

VII.6. Alineamiento de las secuencias de las ALDHs disponibles y análisis mediante redes bayesianas

Para realizar comparaciones de secuencias entre las enzimas miembros de la superfamilia de las ALDHs se usó la información de una versión actualizada del alineamiento múltiple realizado por Julián-Sánchez et al. (2006) usando la herramienta de Blast P y la base de datos de proteínas no redundantes depositadas en <http://www.ncbi.gov> como se describe en Díaz-Sánchez et al. (2012). Para la identificación de los determinantes estructurales de la especificidad por el dinucleótido, los patrones de variación de las secuencias codificantes se analizaron mediante redes bayesianas usando el servidor b-course.cs.helsinki.fi, con el fin de inferir cuáles pudieran ser las fuerzas

evolutivas que han llevado a la fijación de diferentes variantes de proteínas homólogas. En este estudio se contó con la colaboración del Dr. Patricio León Martínez-Castilla del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM. El análisis de los resultados se realizó de acuerdo a Martínez-Castilla (2007) basándose en el supuesto de que las sustituciones sinónimas son relativamente neutrales desde el punto de vista de la selección natural, dado que no provocan cambios en el fenotipo, mientras que las sustituciones no sinónimas si cambian el fenotipo y por lo tanto pueden ser detectadas por medio de este análisis.

VII.7. Simulaciones de dinámica molecular de la PaBADH

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular de la PaBADH en su forma apo y en complejo con NADP⁺ y NAD⁺ usando como templado un tetrámero de la estructura cristalina de la PaBADH (código PDB 2wox). La parametrización de la proteína y de los nucleótidos se realizó de tal forma que se pudiera leer en el campo de fuerzas empleado (GROMACS) para la simulación de una trayectoria del intervalo de los ps. Para estos estudios contamos con la colaboración del Dr. Rogelio Rodríguez-Sotres del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1. Dinámica conformacional del sitio activo de las ALDHs y del nucleótido durante la reacción catalizada

La dinámica conformacional del sitio activo de las ALDHs hidrolíticas se dedujo a partir del análisis de las estructuras cristalinas conocidas y los resultados los publicamos en Muñoz-Clares

et al. (2011; Anexo 1). Debido a la extensa descripción de los resultados obtenidos, en esta sección sólo se describen brevemente los aspectos que consideramos más relevantes.

Las estructuras cristalográficas de distintas ALDHs de numerosos organismos, en su forma libre o con NAD(P)(H), sustratos aldehídos o productos ácidos unidos (a la fecha hay más de 100 estructuras depositadas en el PDB), han permitido conocer detalles específicos a nivel atómico de los residuos involucrados en cada uno de los pasos catalíticos. En estas estructuras se aprecia la flexibilidad conformacional de la parte de la nicotinamida del nucleótido y de los residuos catalíticos de cisteína (Cys286) y glutamato (Glu252).

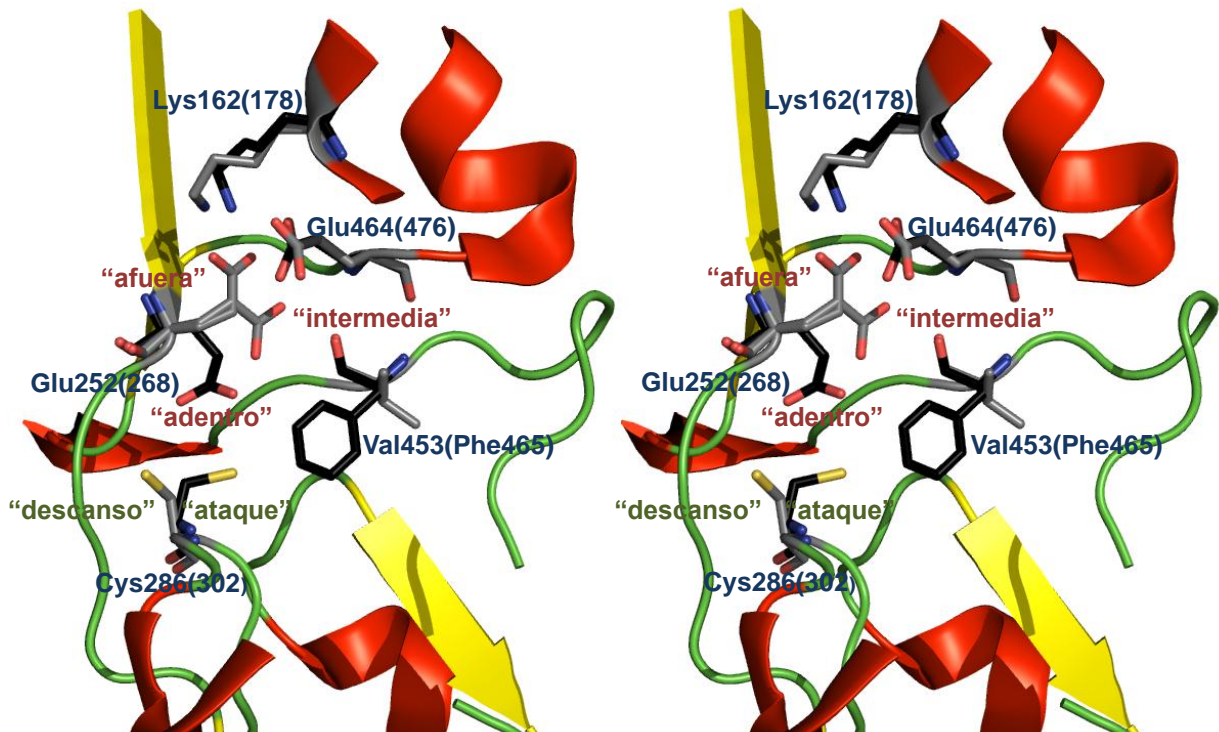


Figura 11. Vista en estéreo del sitio activo de las ALDHs mostrando las diferentes conformaciones de la cisteína catalítica y del glutamato catalítico. Se usaron las coordenadas de la estructura de la PaBADH (en gris; código PDB 2wme), y los de la ALDH2 (en negro; código PDB 1o02) . Los números entre paréntesis indican los residuos equivalentes a los de la PaBADH en la ALDH2 . La figura se hizo usando PyMol (<http://www.pymol.org>). Tomada y adaptada del Anexo 1.

La arquitectura del sitio activo de las ALDHs permite esta flexibilidad conformacional, que indudablemente es crucial para la catálisis en estas enzimas. En este proyecto abordamos el estudio del paso de desacilación de la reacción catalizada por las ALDHs y analizamos y sistematizamos la evidencia cristalográfica sobre los aspectos estructurales responsables de la flexibilidad conformacional del Glu252 (Figura 11) y de la colocación de la molécula de agua hidrolítica dentro del sitio activo de las ALDHs.

VIII.1.1. Regiones del sitio activo relevantes para la dinámica conformacional

En la arquitectura del sitio activo de las ALDHs se observan tres regiones hidrofílicas, u “hoyos”, que son regiones dentro del sitio activo que sirven para unir grupos polares de algunas moléculas observadas en los distintos cristales de las ALDHs, estos hoyos son formados por grupos de la proteína donadores o aceptores de puentes de hidrógeno, que participan en la estabilización del sustrato aldehído, del nucleótido, de los intermediarios de la reacción, o de alguna conformación particular de los residuos catalíticos. Estos “hoyos” juegan papeles cruciales en la catálisis y en la dinámica conformacional del sitio activo de las ALDHs (Muñoz-Clares et al., 2011; Anexo 1).

VIII.1.1.1 Hoyo del oxianión

Esta región es similar al hoyo del oxianión de las serin proteasas. En las ALDHs está formado por el nitrógeno de la amida de la cadena lateral de la asparagina catalítica (Asn153, numeración de la PaBADH) y el nitrógeno amídico de la cisteína catalítica (Figura 12). El papel propuesto del hoyo del oxianión en las ALDHs es la estabilización del oxígeno aniónico del intermediario tiohemiacetal (Steinmentz et al., 1997). En las estructuras cristalinas de las ALDHs en su forma libre se observa en esta región o una molécula de agua o el grupo OH de algún compuesto presente en el medio de cristalización como glicerol o polientilenglicol (Inagaki et al., 2006;

González-Segura et al., 2009). A diferencia del hoyo del oxianión presente en otras enzimas como las proteasas de serina que sólo cumplen la función de estabilización de este oxianión, el de las ALDHs parece ser también importante para el ataque nucleófilico de la cisteína sobre el sustrato aldehído y para la correcta colocación del intermediario tioéster durante el paso de desacilación (Muñoz-Clares et al., 2011). Esto último lo sugiere el hallazgo del átomo de oxígeno de este intermediario adentro del hoyo del oxianión en la estructura cristalina de una mutante de la SmGAPN, en la que la este intermediario pudo ser observado porque la velocidad del paso de desacilación se disminuyó considerablemente (D'Ambrosio et al., 2001). Es muy probable que el oxígeno permanezca dentro de este hoyo durante todo el ciclo catalítico, es decir desde la unión del aldehído hasta la liberación del producto ácido (Muñoz-Clares et al., 2011).

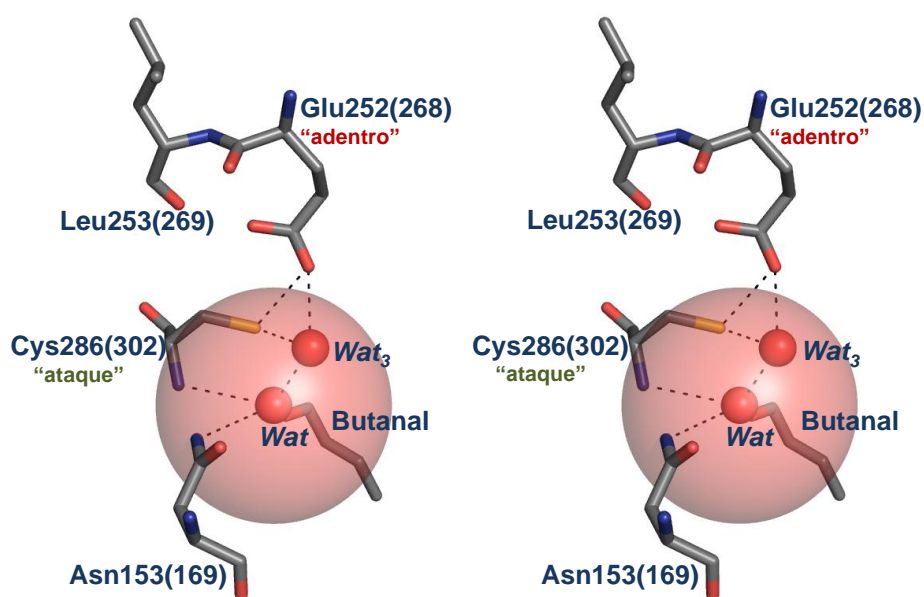


Figura 12. Vista en estéreo del “hoyo del oxianión” de las ALDHs. El hoyo está representado como una esfera de 2.5 Å de radio. Los átomos de los residuos del sitio activo que lo forman son los de la ALDH2 (código PDB 1o02). La molécula de butanal se observó en la ALDH2 con código PDB 1o01; la molécula de agua en la ALDH2 con código PDB 1o04 y la Wat5 en la TtP5Cdh código PDB 1uzb. Los números en paréntesis indican los residuos de la ALDH2

equivalentes a los de la PaBADH. La figura se hizo usando PyMol (<http://www.pymol.org>). Tomada y adaptada del Anexo 1.

VIII.1.1.2 Hoyo de la carboxiamida

Esta región la nombramos así porque une a la carboxiamida del nucleótido oxidado en su conformación productiva de “transferencia del hidruro” (HT de *hydride transfer*). El hoyo de la carboxiamida se forma por el oxígeno y el NH amídicos de la Leu253 y el oxígeno amídico del Glu252 en su conformación intermedia. En este hoyo también se une el carboxilo del Glu252 en su conformación “hacia adentro”, o una molécula de agua en aquellas ALDHs que no tienen unido a ningún sustrato (Muñoz-Clares et al., 2011; Anexo 1). La carboxiamida del nucleótido desplaza a esta molécula de agua, o al Glu252 de la conformación “hacia adentro” que pasa así a la conformación “intermedia”. Una vez que se transfiere el hidruro desde el intermediario tiohemiacetal a la nicotinamida, ésta se sale del hoyo de la carboxiamida, dejándolo libre para aceptar la molécula de agua hidrolítica (Wat1 en la Figura 13), como se observa en la ALDH en complejo con NAD(P)H, en donde la nicotinamida reducida se encuentra en alguna conformación fuera del sitio activo (conformación de “hidrólisis” *Hyd*).

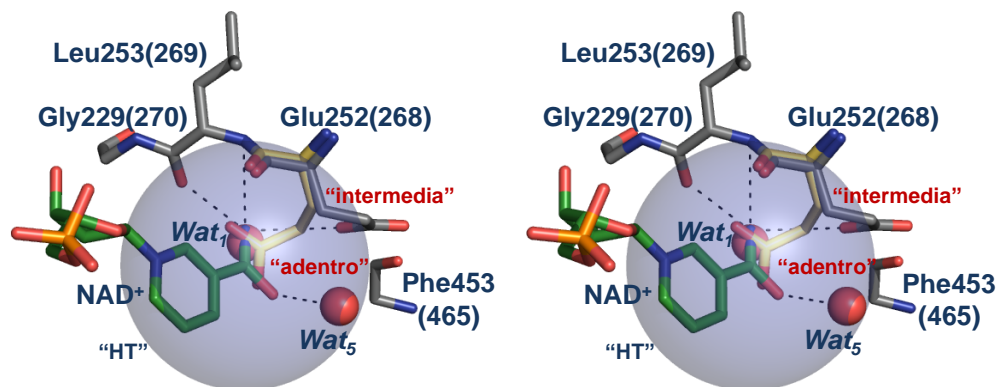


Figura 13. Vista en estéreo del “hoyo de la carboxiamida” de las ALDHs. El hoyo está representado como una esfera de 2.5 Å de radio. Los átomos de los residuos del sitio activo son

los de la ALDH2 con código PDB 1o01, con excepción del Glu268 en la conformación “adentro” que es de la ALDH2 código PDB 1o02. La parte de la nicotinamida en la conformación HT es de la ALDH2 código PDB 1o04; Wat1 y Wat5 son de la ALDH2 códigos PDB 1o01 y 1o04, respectivamente. Los números corresponden a la numeración de la ALDH2. La figura se hizo usando PyMol (<http://www.pymol.org>). Tomada y adaptada del Anexo 1.

VIII.1.1.2 Hoyo del carboxilato

En esta región se une el carboxilo del Glu252 en su conformación intermedia y está formada por el carbonilo de la cadena principal de la Val453 y el NH de la cadena principal del Glu464 (numeración de PaBADH). En las estructuras en donde no se observa el Glu252 en la conformación “intermedia”, una molécula de agua se une en este hoyo del carboxilato (Figura 14). El OE2 del Glu252 interacciona a través de un puente de hidrogeno con el carbonilo de la Val453 /numeración de PaBADH). Esta interacción es de gran relevancia para la activación de la molécula de agua (Muñoz-Clares et al., 2011; Anexo 1), como se discutirá más adelante.

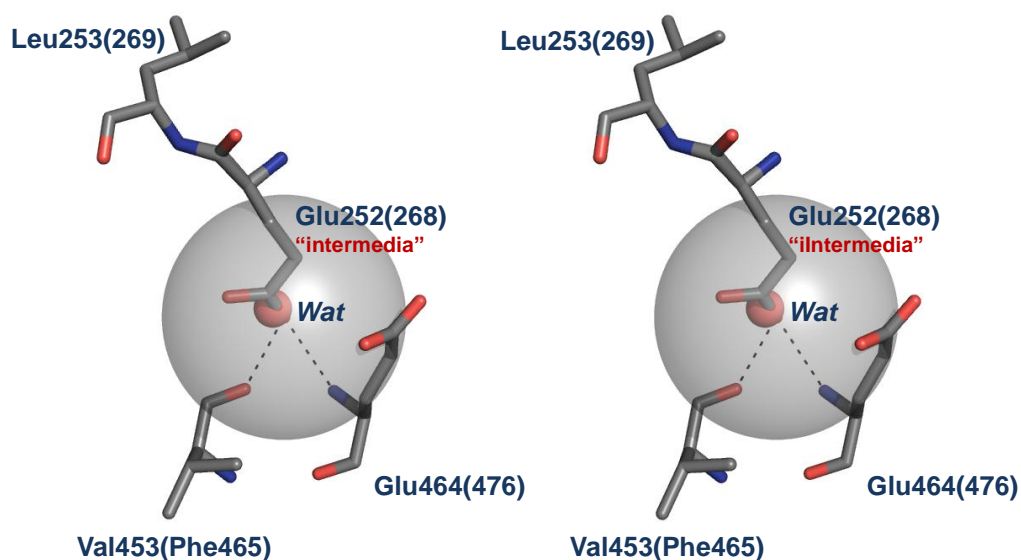


Figura 14. Vista en estéreo del hoyo del carboxilato de las ALDHs. El hoyo está representado como una esfera de 2.5 Å de radio. Los átomos de los residuos del sitio activo son los de la ALDH2 (pdb 1o01). El Glu252 se encuentra en la conformación “intermedia” que es la

conformación en la que participa en la activación de la molécula de agua hidrolítica. Los números corresponden a la numeración de la PaBADH. La figura se hizo usando PyMol (<http://www.pymol.org>). Tomada y adaptada del Anexo 1.

VIII.1.2. Papel de la dinámica del sitio activo durante el paso de desacilación

Desde la determinación de las dos primeras estructuras tridimensionales, la de la ALDH3 de rata (RnALDH3, Liu et al., 1997) y la de la ALDH2 de bovino (Steinmentz et al., 1997), ambas en su forma libre y en complejo con NAD^+ , se estableció que la unión de éste no produce grandes cambios conformacionales. Sin embargo, el análisis de las estructuras tridimensionales disponibles hasta la fecha permitió dar relevancia mecánica a algunos de los cambios conformacionales muy sutiles en las cadenas laterales de los residuos del sitio activo (González-Segura et al., 2009; Talfournier et al., 2009; Muñoz-Clares et al., 2009 y 2011) y del nucleótido unido.

Un aspecto relevante en cuanto a dinámica conformacional de las ALDHs es la flexibilidad que presenta el nucleótido después de que éste recibe el hidruro durante el ciclo catalítico (Hammen et al., 2002; Perez-Miller y Hurley, 2003). Para que el dinucleótido oxidado tome el hidruro del aldehído, la parte de la nicotinamida tiene que adoptar la conformación llamada “de transferencia del hidruro” (HT), en donde se encontrará cerca del intermediario tiohemiacetal en la posición adecuada para recibir el hidruro de este intermediario. Una vez que se transfiriere el hidruro, la nicotinamida reducida tiene que moverse dentro del sitio activo adoptando alguna de las conformaciones llamadas “de hidrólisis” (Steinmentz et al., 1997, Perez-Miller y Hurley, 2003, D’-Ambrosio et al., 2006; Figura 15) ya que la carboxiamida del NAD(P)^+ cuando está en la conformación HT ocupa la posición de la molécula de agua hidrolítica (Steinmentz et al., 1997, Perez-Miller y Hurley 2003, D’-Ambrosio et al., 2006; Tsybovski et al., 2007) y por lo tanto sin este movimiento y cambio conformacional del nucleótido reducido no se podría llevar a cabo el

paso de desacilación. Finalmente los cambios conformacionales que experimenta el Glu268 después de la transferencia del hidruro son relevantes porque este residuo interactúa con distintas moléculas de agua según la posición que adopte (Muñoz-Clares et al., 2011).

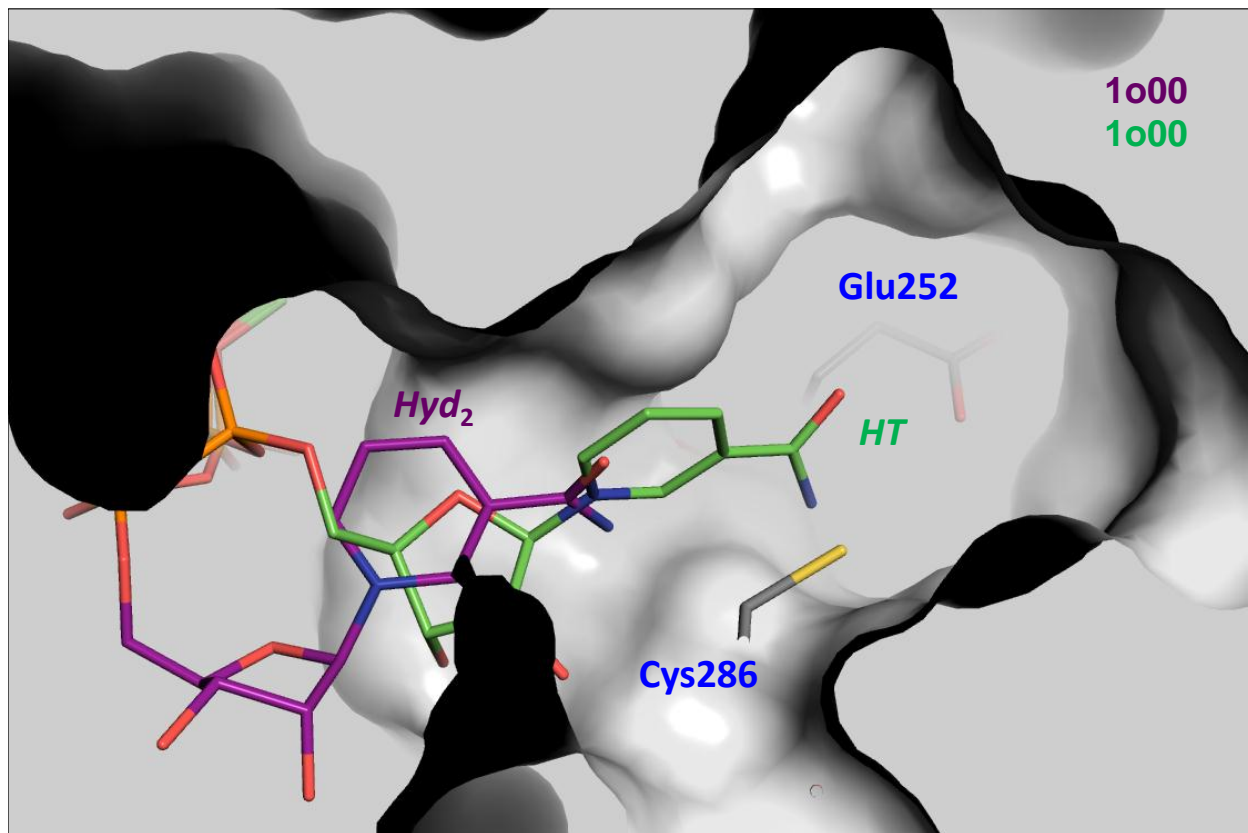


Figura 15. Posición del anillo de piridina de la parte de la nicotinamida en la PaBADH. La PaBADH es representada por la superficie gris (código PDB 2wox). Los átomos de los nucleótidos son los de la ALDH2 (código PDB 1o00). La parte de la nicotinamida en la conformación HT corresponde a la molécula de color verde y la de la conformación de hidrólisis (que llamamos *Hyd₂*) en color morado. La figura se hizo usando PyMol (<http://www.pymol.org>), tomada y adaptada del Anexo 3.

VIII.1.3. Molécula de agua hidrolítica en las ALDHs

La reacción de hidrólisis llevada a cabo por las ALDHs requiere que el residuo de glutámico catalítico, que actúa como una base general (Glu252, numeración de PaBADH), tome el protón de la molécula de agua hidrolítica, para que se pueda llevar a cabo eficientemente el ataque nucleofílico del ion hidroxilo sobre el tioéster a pH fisiológico. El mecanismo de esta desprotonación del agua hidrolítica plantea varios problemas: (1) El grupo carboxilo del Glu catalítico debe estar desprotonado para recibir el protón, pero la carga negativa del carboxilato produciría un aumento del pK_a del agua dificultando su desprotonación y por tanto su activación como agente nucleofílico. (2) Un análisis de las estructuras cristalográficas de diversas ALDHs mostró que el Glu252 está protonado incluso a pH 7.5 (González-Segura et al., 2009) y por tanto no puede recibir un segundo protón, el del agua hidrolítica. (3) Para que haya una transferencia efectiva del protón desde el agua al Glu catalítico, los dos grupos, el que dona el protón y el que lo recibe, deben tener valores de pK_a similares. Por tanto, el pK_a del grupo carboxilo del Glu catalítico debe ser significativamente más alto que su valor típico de 4.5, mientras que el pK_a de la molécula de agua debe ser inferior a su valor típico de 15.7. (4) El agua hidrolítica tiene que estar a distancia de interacción tanto del Glu252 como del intermediario tioéster, y con un ángulo de ataque adecuado con respecto al carbono carbonílico de éste. La resolución y análisis a detalle atómico de la estructura tridimensional de la PaBADH en complejo con NADPH (Díaz-Sánchez et al., 2011; Anexo 3) nos permitió proponer un posible mecanismo de activación de la molécula de agua catalítica en el que el nucleótido reducido juega un papel relevante, y el análisis detallado de las estructuras tridimensionales de las ALDHs disponibles en el PDB (incluida la de la PaBADH en complejo con $NADP^+$) nos permitió proponer cuál de las moléculas de agua estructurales encontradas en el sitio activo de estas enzimas y propuestas como las hidrolíticas estarían en la posición requerida para activarse, es decir desprotonarse, y realizar el ataque nucleofílico en el paso de desacilación (Muñoz-Clares et al., 2011).

Se han propuesto cinco moléculas de agua ordenadas, observadas en distintas posiciones dentro del sitio activo de las ALDHs, que pudieran llevar a cabo la hidrólisis del intermediario tioéster (revisado en Muñoz-Clares et al., 2011) (Figura 16). En las estructuras de la PaBADH se han observado tres de las cinco moléculas propuestas, que nombramos Wat1, Wat2 y Wat5 (Muñoz-Clares et al., 2011). Para evaluar cuál de éstas es la hidrolítica, modelamos el intermediario tioéster en la PaBADH y comparamos la posición de Wat1, 2 y 5, con respecto a la posición ideal hipotética que adoptaría un nucleófilo para realizar el ataque sobre el carbono carbonílico del intermediario (Muñoz-Clares et al., 2011), posición definida por la trayectoria de Bürgi-Dunitz (Bürgi y Dunitz 196) (Figura 17). También modelamos el intermediario tioéster en la TtP5CDh, porque en sus estructuras cristalinas se han observado a Wat3 y 4 (Figura 17). Las posiciones de Wat2, Wat1 y Wat4 son las que más se acercan a la trayectoria de Bürgi-Dunitz. En la PaBADH es probable que Wat2 sea la molécula de agua hidrolítica y ésta se puede acomodar mejor en el sitio activo debido al volumen más pequeño de una Val que el de Phe, Trp o His que son los residuos equivalentes observados en la mayoría de las ALDHs (Muñoz-Clares et al., 2011). En el resto de las ALDHs, Wat1 pudiera ser la molécula de agua hidrolítica, la que una vez activada como ion hidroxilo pudiera adoptar la trayectoria correcta de ataque. Wat4 pudiera ser la hidrolítica en aquellas ALDHs que no presentan el sistema de descarga del protón descrito en González-Segura et al. (2009), ya que en estas enzimas probablemente el Glu catalítico esté en la conformación “adentro” y pueda tomar el protón de esta molécula de agua (Muñoz-Clares et al., 2011).

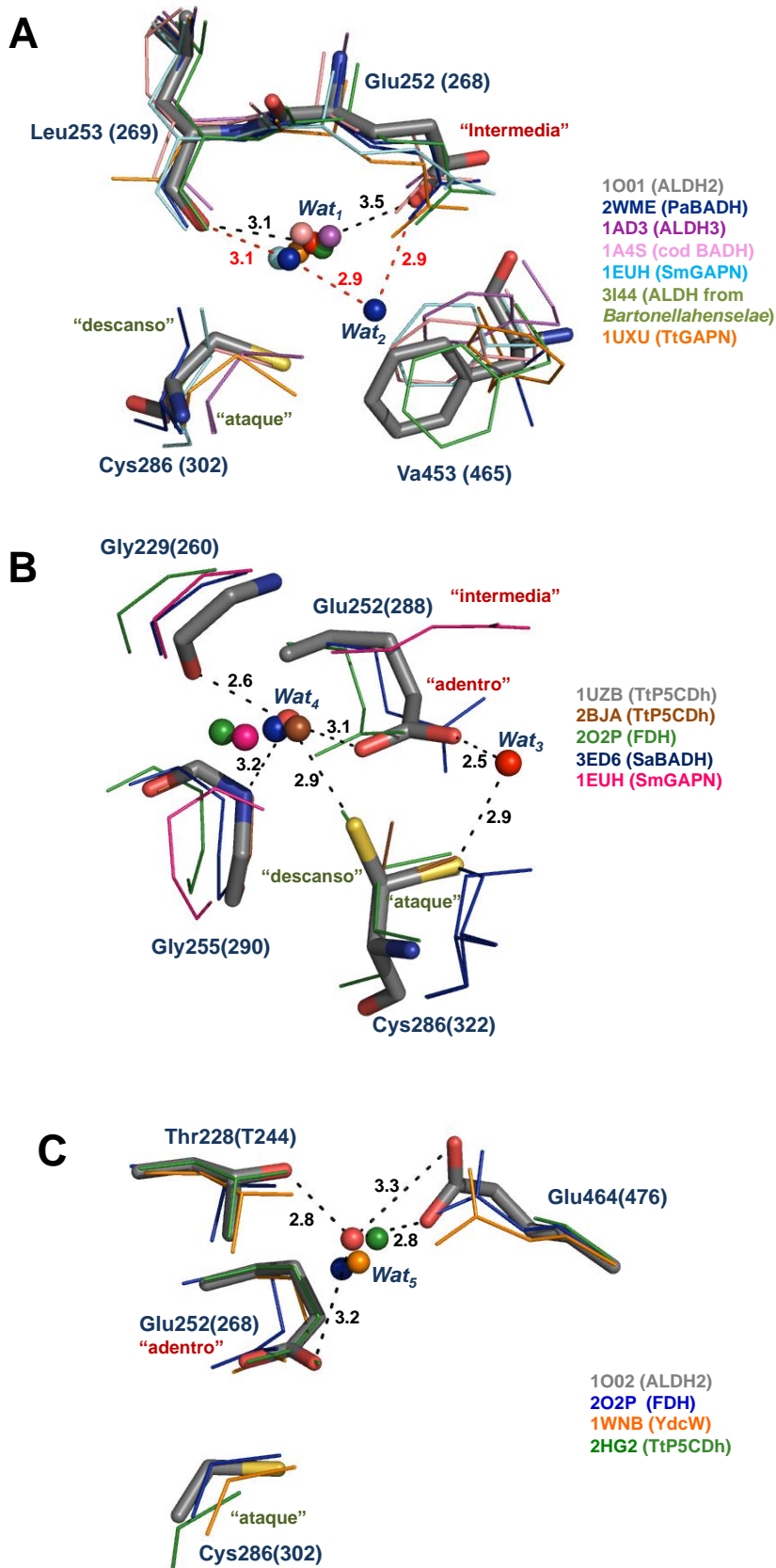


Figura 16. Posición de las distintas moléculas de agua propuestas como las hidrolíticas en las ALDHs. Diferentes posiciones de moléculas de agua propuestas como las hidrolíticas. En representación de barras se muestra aquella estructura que corresponde al primer código de PDB de la lista de la izquierda y por claridad se numeró de acuerdo a la PaBADh y entre paréntesis se indica la numeración correspondiente a la ALDH dada. Las moléculas de agua representadas como bolas, tienen el mismo color que su código PDB correspondiente, al igual que los residuos de aminoácidos representados por líneas. La figura se hizo usando Pymol (<http://www.pymol.org>). Tomada y adaptada del Anexo 1.

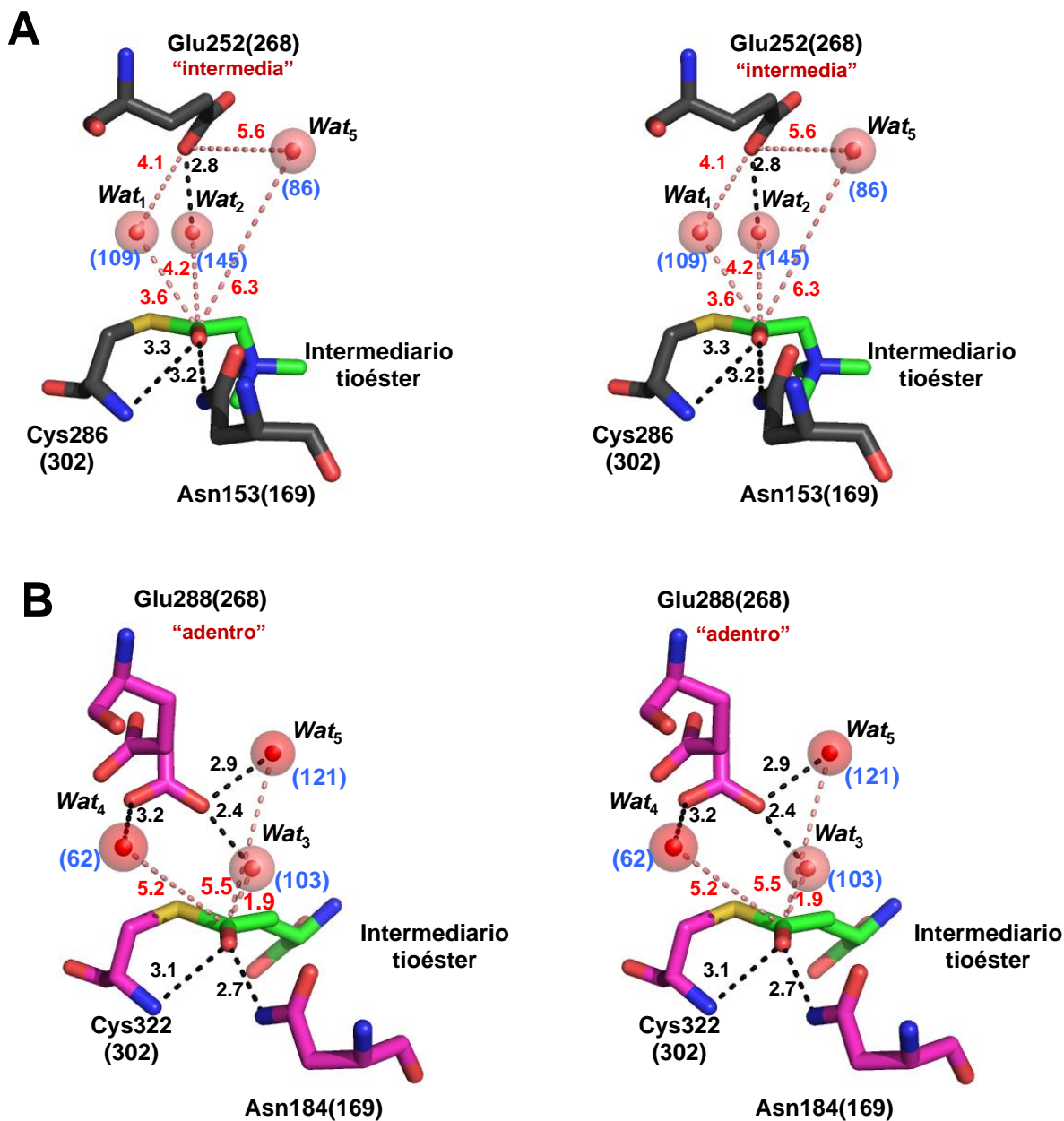


Figura 17. Vista en estéreo de la posición de las moléculas de agua hidrolíticas propuestas mostradas en el sitio activo (A) de la PaBADH (pdb 2wme) o (B) en la TtP5CDh (pdb 1uzb). Se muestran las distancias entre el agua y el carbonilo del intermediario de la GB o del Glu la trayectoria de Bürgi-Dunitz seguida por un nucleófilo hipotético (esfera azul). Wat y Wat2 son estéricamente incompatibles con la conformación del Glu252 en la conformación adentro.

Con base en el análisis de los datos cristalográficos disponibles y de modelos estructurales del intermediario tioéster, así como de los resultados de cálculos teóricos de pK_a del grupo carboxilo del glutamato catalítico en sus tres distintas conformaciones, la flexibilidad conformacional del Glu252 juega un papel en la activación del agua hidrolítica. Este Glu en la conformación intermedia teóricamente tiene un pK_a de 11 lo que lo convierte en una base general ideal para tomar el proton de Wat1 o de Wat2, mientras que en la conformación afuera tiene un pK_a de 3, lo cual lo convierte en ácido. Estos hallazgos son consistentes con el mecanismo de liberación del proton propuesto en las ALDHs (González-Segura et al., 2009; Muñoz-Clares et al., 2011). También proponemos un papel crítico de un enlace peptídico en el proceso de activación del agua, en el cual el glutamato catalítico está unido por puente de hidrógeno (Figura 18).

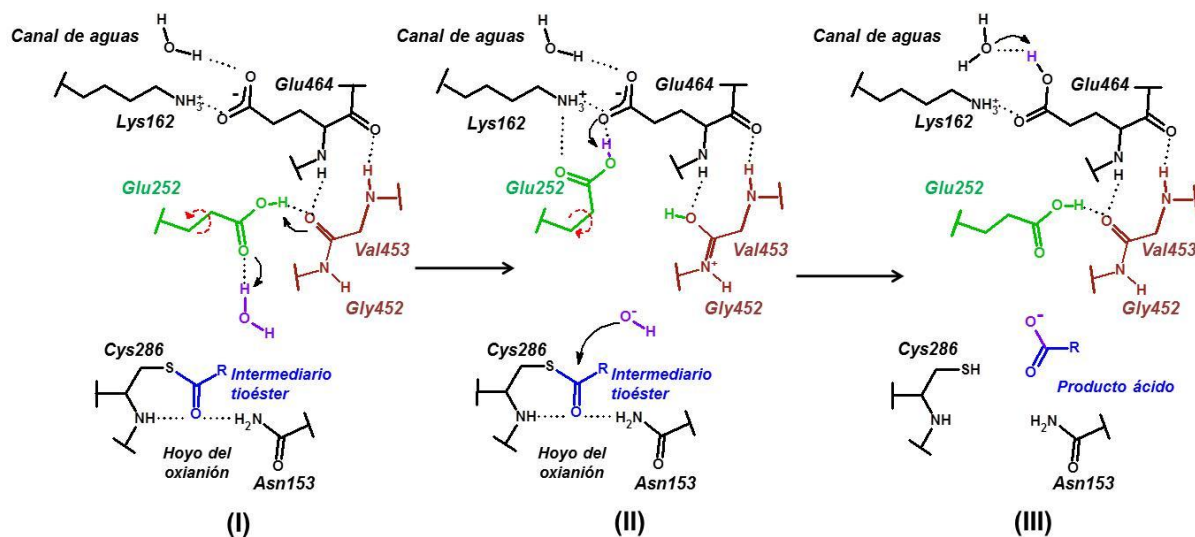


Figura 18. Mecanismo químico propuesto para el paso de desacilación de las ALDHs. (I) El Glu252 protonado en la conformación intermedia se encuentra unido por puente de hidrogeno a la molécula de agua hidrolítica y al carbonilo del enlace peptídico 464-465. El proton involucrado en el último es transferido al oxígeno carbonílico, por efecto de la naturaleza resonante de la amida, formando un ácido imídico y el Glu252 toma el protón del agua. (II) El ion hidroxilo realiza el ataque nucleofílico sobre el intermediario tioéster. El Glu252 se mueve de la conformación intermedia a la conformación afuera. En esta conformación interactúa con la

Lys162 y el Glu464, al cual le cede el protón. (III) El producto ácido de la reacción es formado. El Glu252 regresa a la conformación intermedia en donde la forma imídica del enlace peptídico le transfiere el protón al Glu252 de regreso.

Para verificar la importancia o la facilidad que pudiera tener una molécula de agua de acomodarse en una posición cercana a la trayectoria de Bürgi-Dunitz en el espacio extra presente en el sitio activo de la PaBADH debido a que en ésta, en lugar de un residuo voluminoso, observado en la mayoría de las ALDH en la posición equivalente a la 453, presenta un residuo de Val, obtuvimos la estructura tridimensional a 2.10 Å de la forma apo de la mutante de la PaBADH V453F y estudiamos los efectos de la mutación sobre los parámetros cinéticos de la reacción catalizada. La estructura tridimensional de la enzima mutante es esencialmente idéntica a las otras de la PaBADH previamente determinadas. Aunque no logramos obtener cristales de las formas holo de la V453F ni por co-cristalización ni por remojo, si logramos corroborar que en la enzima libre Wat2 ya no se podía unir porque el anillo de benceno de la cadena lateral de la Phe453 ocupa su posición. No observamos ningún efecto sobre la K_d del nucleótido oxidado, medida siguiendo el apagamiento de la fluorescencia de los triptofanos inducidos por la unión del nucleótido, o como K_{ia} en experimentos cinéticos de velocidad inicial. Observamos una disminución en la k_{cat} de un 25% tanto en la reacción NAD^+ -dependiente como en la $NADP^+$ -dependiente, y una considerable disminución en la K_m del nucleótido oxidado, de 24 veces para el $NADP^+$ y de 16 para el NAD^+ .

VIII.2. Participación del nucleótido en la reacción catalizada por las BADHs

VIII.2.1. Conformación del nucleótido durante la reacción de las ALDHs

Se ha propuesto que durante la reacción catalizada por las ALDHs, una vez que el NAD(P)H se forma debe moverse desde la posición de “*HT*” a una de las posiciones compatibles con la entrada de la molécula de agua hidrolítica al sitio activo, de manera que la reacción pueda continuar (Steinmentz et al., 1997). A cualquiera de estas posiciones se le llama conformación de “hidrólisis” (Perez-Miller y Hurley, 2003; *Hyd* en Muñoz-Clares et al., 2011) y es a partir de estas posiciones que se libera el nucleótido reducido quedando la enzima en la disposición de comenzar un nuevo ciclo catalítico. El nucleótido reducido es el primer producto formado, pero sin embargo en las ALDHs hidrolíticas es el último producto en liberarse de la enzima (recuérdese el mecanismo cinético Bi-Bi ordenado de estas enzimas), por lo que se podría pensar que el NAD(P)H pudiera tener un papel en los últimos pasos del mecanismo catalítico de la reacción catalizada. Para investigar este posible papel, determinamos la estructura tridimensional de la PaBADH en complejo con el NADPH (Díaz-Sánchez et al., 2011; código PDB 2wox y 3zqa ; Anexo 3). Esta estructura mostró, por primera vez en una ALDH, a la carboxiamida del NADPH dentro del sitio activo, interaccionando con un grupo hidroxilo de una molécula de glicerol que ocupa la misma posición que la molécula de agua hidrolítica *Wat2* observada en otra estructura cristalográfica de la PaBADH (Figura 19). Esta interacción sugirió que la carboxiamida del nucleótido reducido juega un papel en el paso de desacilación de la reacción, probablemente promoviendo la activación de la molécula de agua hidrolítica y la escisión del enlace tioéster (Figura 22). Nuestra propuesta es que en primer lugar el nitrógeno amídico de la carboxiamida del NAD(P)H le dona un puente de hidrógeno a *Wat2*, lo que tendría como consecuencia una disminución en su pK_a , facilitando así que el Glu252 le abstraiga un protón. En segundo lugar, el ion hidroxilo resultante de la desprotonación del agua podría interaccionar por puente de hidrógeno con el NH_2 la carboxiamida que de esta forma lo estabilizaría haciendo irreversible la activación de *Wat2* al impedir el regreso del protón desde el Glu268 protonado.

Además, esta interacción, colocaría al ion hidroxilo en una mejor trayectoria para realizar el ataque nucleofílico. En tercer lugar, el nitrógeno de la carboxiamida puede interaccionar con el OH del intermediario tetraédrico haciendo más rápida la escisión del enlace azufre-carbono. Y finalmente, la carboxiamida pudiera participar en la abstracción del protón del carboxilo del producto ácido, favoreciendo la liberación de éste. Este papel no-redox del NAD(P)H pudiera ser, al menos en parte, la razón por la cual el nucleótido reducido es el último producto en liberarse de la enzima durante un ciclo catalítico.

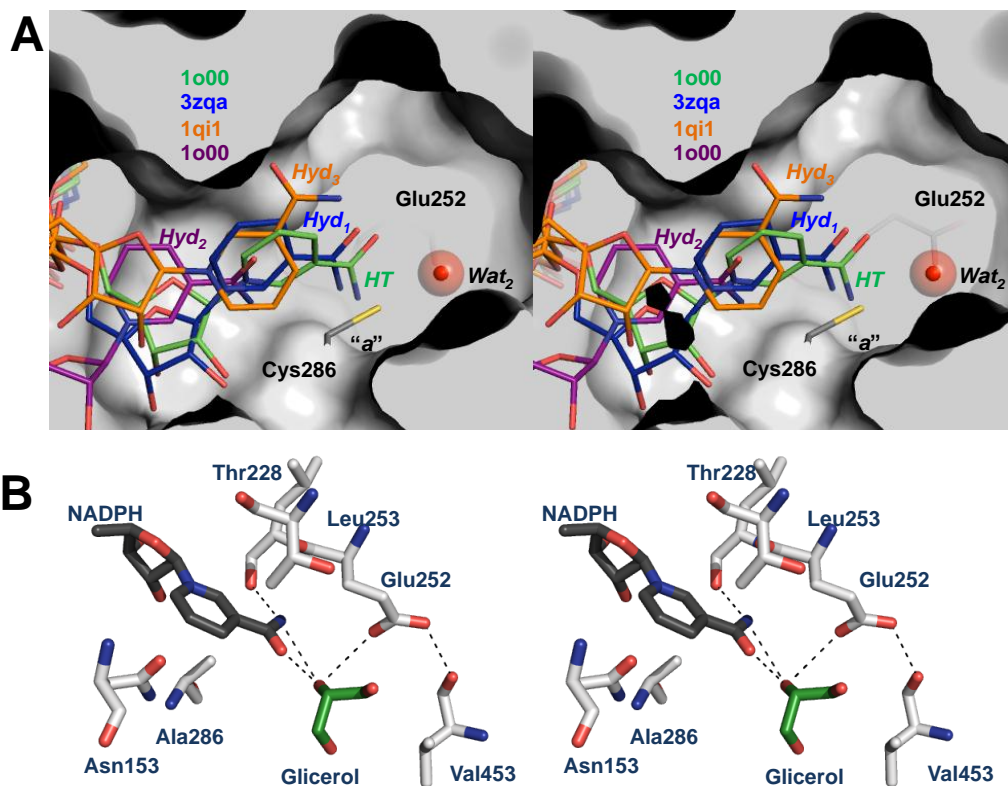


Figura 19. Vista en estero de las posiciones de la parte de la nicotinamida del dinucleótido en la PaBADH. (A) La conformación *Hyd1* (en azul, código PDB 3zqa) del nucleótido reducido; las conformaciones de *HT* (en verde, código PDB 1o00) del nucleótido oxidado y *Hyd2* (en morado, código PDB 1o00) del nucleótido reducido observadas en la ALDH2 y la *Hyd3* (en

naranja, código PDB 1qi1) del nucleótido reducido observada en la SmGAPN. Todas las conformaciones del nucleótido y la molécula de agua Wat_2 se modelaron en el sitio activo del cristal de la PaBADH 2wme (como se describió en Díaz-Sánchez et al., 2011; Anexo 3). Wat_2 puede hacer dos puentes de hidrogeno importantes para su activación, uno con el Glu252 y otro con la carboxiamida del NADPH en la conformación *Hyd1*. (B) Vista de la parte de la nicotinamida del NADPH en la subunidad A de la PaBADH mutante C286A, mostrando los puentes de hidrogeno entre el N7N (NH₂) del grupo de la carboxiamida y el oxígeno carbonílico de la cadena principal de la Leu253 y entre el N7N o entre el O7N y la molécula de glicerol (en verde). El O2 de la molécula de glicerol ocupa una posición similar a Wat_2 (del panel A). La figura se hizo usando PyMol (<http://www.pymol.org>), tomada y adaptada del Anexo 3.

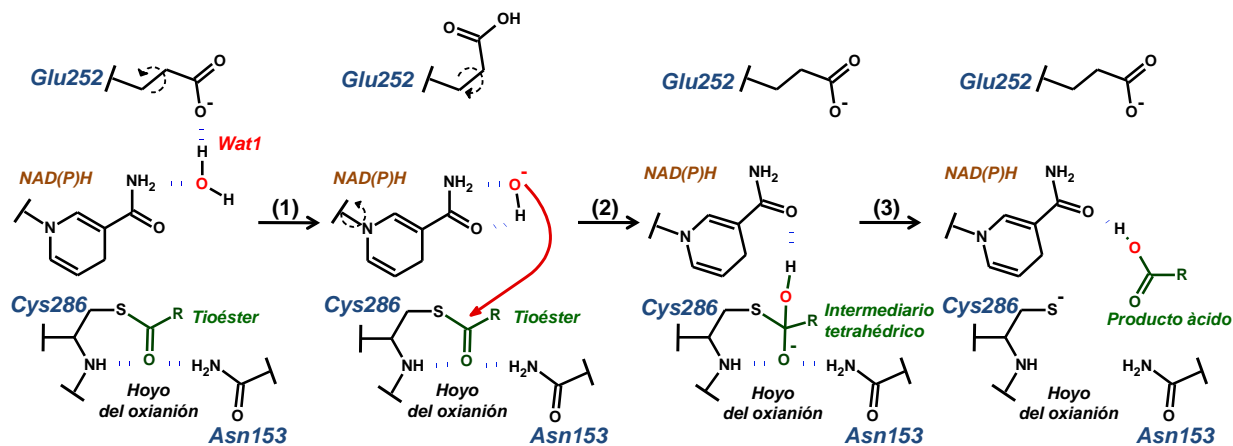


Figura 20. Papel mecánico propuesto del NAD(P)H en la reacción catalizada por la PaBADH. En el texto se detallan cada uno de los pasos.

Para investigar si la conformación de hidrólisis observada en el cristal de la PaBADH en complejo con NADPH, a la que llamamos *Hyd1* (Figura 19), no es influenciada por la Cys286, resolvimos la estructura tridimensional de la PaBADH mutante C286A en complejo con NADPH (Díaz-Sánchez et al., 2011; Anexo 3). En esta estructura encontramos al nucleótido reducido dentro del sitio activo en una posición esencialmente idéntica a la observada en la PaBADH

silvestre y realizando las mismas interacciones con la enzima (Díaz-Sánchez et al., 2011), lo que prueba que ésta es la posición que el nucleótido reducido adopta en la PaBADH.

Las estructuras tridimensionales de la PaBADH en complejo con NADPH de la enzima silvestre y de la mutante C286A se determinaron a 2.30 y 2.45 Å. Ambos cristales pertenecen al grupo espacial P3221 y contienen cuatro subunidades en la unidad asimétrica, formando un tetrámero que corresponde con la unidad biológica de la enzima (Valenzuela-Soto). Los valores de RMSD calculados cuando se comparan las cuatro subunidades de la enzima silvestre con las subunidades de la enzima mutante y con las de la enzima en complejo con NAD(P)⁺ (González-Segura et al., 2009) están en el intervalo de 0.21 a 0.37 Å². Algunas regiones presentaron valores ligeramente más altos, pero en ningún caso más altos que 1.6 Å². Los iones de K⁺ intra e intersubunidad observados en la PaBADH en complejo con NAD(P)⁺ (González-Segura et al., 2009) se observan también en las estructuras de la enzima con NADPH. El plegamiento global de la PaBADH en complejo con NADPH es idéntico al descrito en todas las ALDH conocidas hasta la fecha.

Los mapas de densidad electrónica de las PaBADH silvestre y mutante C286A muestran en cada una de las subunidades densidad electrónica que corresponde al nucleótido completo. La parte de la adenina del nucleótido de la enzima silvestre y mutante realizan esencialmente las mismas interacciones que la adenina del NADP⁺ (ver más adelante). La parte de la nicotinamida del nucleótido se observa en tres distintas conformaciones de hidrólisis en la enzima silvestre, que llamamos Hyd1, Hyd2 y Hyd_n, y en dos en la enzima mutante, la Hyd1 y Hyd2 (Figura 19). En las conformaciones Hyd1 y Hyd2 la carboxiamida del nucleótido está unida en el hoyo de la carboxiamida, de forma similar a como se une la carboxiamida del nucleótido oxidado en la conformación HT. Dos de estas conformaciones Hyd1 y Hyd_n no se habían descrito antes para el nucleótido reducido unido al sitio activo de ninguna ALDH. El hecho de encontrarlo en las tres posiciones en el mismo cristal de la PaBADH corrobora la flexibilidad conformacional del

nucleótido anteriormente descrita en otras ALDHs (Hammen et al., 2002 Perez-Miller y Hurley 2003). El nucleótido en la conformación Hyd1 es el que dona un puente de hidrógeno a uno de los grupos alcohol de una molécula de glicerol y el que probablemente participa en el mecanismo catalítico como se describió anteriormente.

VIII.2.3.2 Aducto covalente entre la cisteína catalítica de la PaBADH y el NADPH

VIII.2.3.2.1 Detección de aducto en el cristal de la PaBADH en complejo con NADPH

En la estructura tridimensional de la PaBADH en complejo con NADPH (código PDB 2wox) se observó un enlace covalente entre el carbono 2 del anillo de la dihidropiridina (C2N) del nucleótido y el átomo de azufre del grupo tiol del residuo de la cisteína catalítica (Figura 21) (Díaz-Sánchez et al., 2011; Anexo 3). Es la primera vez que se encuentra un aducto de este tipo. Tanto el mapa de densidad electrónica $2Fo-Fc$ y el de omisión $Fo-Fc$ muestran la presencia del enlace covalente en todas las subunidades de la unidad asimétrica del cristal. El enlace covalente se forma por medio de una reacción de adición de Michael de la cisteína catalítica al enlace doble de la nicotinamida α,β -insaturada (Figura 24), reacción que es facilitada por la conformación particular que adopta el nucleótido reducido, *Hyd1*, y por la posición de la molécula Wat2 (Figura 13). El hecho de que no se haya encontrado hasta la fecha a este tipo de aducto en otras ALDHs puede deberse en parte a los requerimientos estructurales que tiene que cumplir el sitio activo para que se forme, requerimientos que si tiene la PaBADH. Estos requerimientos son: (1) La cisteína catalítica debe poder adoptar la conformación de “descanso,” de tal forma que su átomo de azufre colisione con el C2N del anillo de piridina. (2) Esta colisión no puede ocurrir si el NAD(P)H no adopta la conformación *Hyd1*. (3) Una molécula de agua se debe colocar en la posición adecuada para donar un puente de hidrogeno al carbonilo de la carboxiamida y un

protón al intermediario oxianión que se forma. Por lo anterior predecimos que este tipo de aductos sólo se formará en las ALDHs que cumplan con estos requisitos.

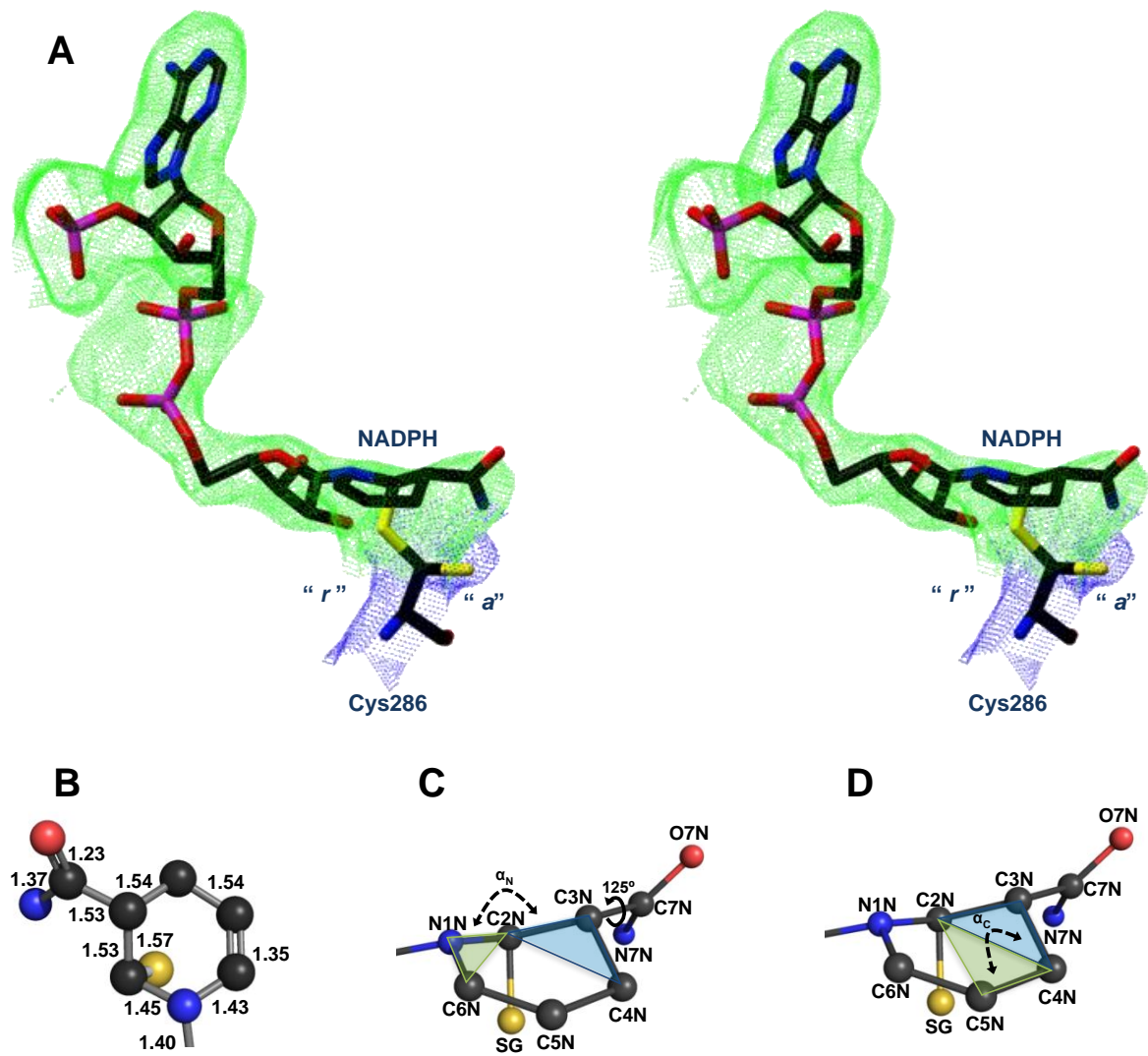


Figura 21. Papel mecanístico propuesto del NAD(P)H en la reacción catalizada por la PaBADH. En el texto se detallan cada uno de los pasos.

VIII.2.3.2.2 Formación de aductos en disolución entre la cisteína catalítica de la PaBADH y el NAD(P)H

La formación de aductos entre el NAD(P)H y la Cys catalítica, como el que se observó en el cristal de la PaBADH, debería producir la inactivación de la enzima al prevenir la formación del primer intermediario de la reacción, el intermediario tiohemiacetal. Por lo tanto, para investigar la habilidad de la PaBADH para formar el aducto con el NAD(P)H en solución, pre-incubamos a la enzima con los nucleótidos reducidos en ausencia del sustrato aldehído, como se describió en Díaz-Sánchez et al. (2011; Anexo 3), y medimos la actividad remanente de la enzima a diferentes tiempos en presencia de concentraciones sub-saturantes de sustratos y con la misma concentración de NAD(P)H usado en la pre-incubación. Tanto el NADPH como el NADH produjeron una pérdida progresiva de la actividad de la PaBADH que es dependiente de el tiempo y de la concentración del nucleótido reducido, que sigue una cinética de pseudoprimer orden y alcanza una meseta (Figura 22A). La constante de inactivación por el NADH es menor que la constante obtenida durante la inactivación por el NADPH (Figura 22B), consistentemente con el grado de saturación menor de la enzima por el NADH que por el NADPH. Las constantes de inactivación observadas (k_{obs}) aumentaron de forma hiperbólica con respecto a la concentración del nucleótido usada (inserto de La Figura 22A), consistente con un proceso reversible de al menos dos pasos: La unión rápida y reversible de los nucleótidos a la enzima, seguida de un cambio lento intramolecular y también reversible, que lleva a una forma de la enzima inactiva (Figura 23). La naturaleza reversible del aducto se confirmó por medio de la reactivación total de la enzima, cuando se removió el NAD(P)H por medio de filtración en gel o por dilución en el medio de ensayo en donde el nucleótido reducido no se incluyó. Los nucleótidos oxidados pueden revertir el aducto entre la enzima y el NAD(P)H, como se probó al recuperar la actividad

de una enzima modificada con NAD(P)H, cuando se midió su actividad en un medio de ensayo en el que la concentración de NAD(P)⁺ es saturante.

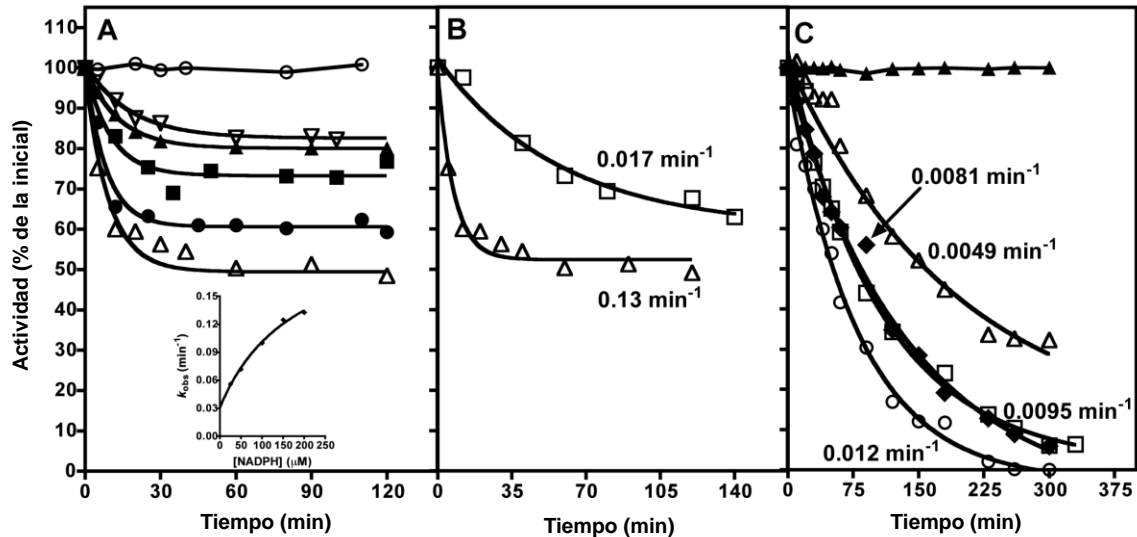


Figura 22. Inactivación de la PaBADH por NAD(P)H y protección de la enzima modificada por NAD(P)H por la inactivación por yodoacetamida (IAM). (A) Cursos temporales de la pérdida de la actividad de la enzima por la pre-incubación con NADPH. La enzima (3.75 μM de sitios activos) se pre-incubó como se describió en Díaz-Sánchez et al. (2011; Anexo 3) en ausencia (○) o en presencia de 25 (▽), 50 (▲), 100 (■), 150 (●) or 200 (△) μM de NADPH. A los tiempos indicados, se agregó al medio de incubación NADP⁺ y BAL (a concentración final de 0.05 y 0.25 mM, respectivamente) e inmediatamente se midió la actividad remanente. Los datos experimentales se ajustaron a una ecuación de una exponencial sencilla. La enzima pre-incubada en amortiguador en ausencia de NAD(P)H (○) permaneció estable durante el experiment. Inserto: Re-gráfico de las constantes de la velocidad de inactivación observadas, estimadas a partir de los datos de la figura primaria, contra la concentración de NADPH usada en la inactivación. La línea teórica resultó del ajuste de los datos a la ecuación: $k_{obs} = k_2 + k_{+2}[NADPH]/(K_d + [NADPH])$. (B) Comparación de la cinética de inactivación por pre-incubación por 200 μM de NADPH (△) y 200 de NADH (□). (C) Efectos de la pre-incubación con NAD(P)H en los cursos temporales de inactivación por IAM. La enzima (3.75 μM de sitios activos) se pre-incubó por 2 h a 25 °C en ausencia (○) o en presencia de 200 μM de NADPH

(Δ) or 200 μM de NADH (\square). Después de la incubación se agregó al medio de incubación 125 μM de IAM y se midió la actividad remanente de la enzima a los tiempos indicados usando 1 mM de NADP⁺ y 1 mM de BAL. Como control, se midió la pérdida de actividad de la enzima cuando se mezcló la IAM a junto con 200 μM de NADPH a una muestra de la PaBADH que se pre-incubó por 2 h en amortiguador en ausencia de NADPH (\blacklozenge). La enzima pre-incubada en amortiguador sin IAM (\blacktriangle) permaneció estable durante el experimento. Los datos experimentales se ajustaron a una ecuación exponencial sencilla; los valores estimados de las constantes de inactivación se dan para cada línea.

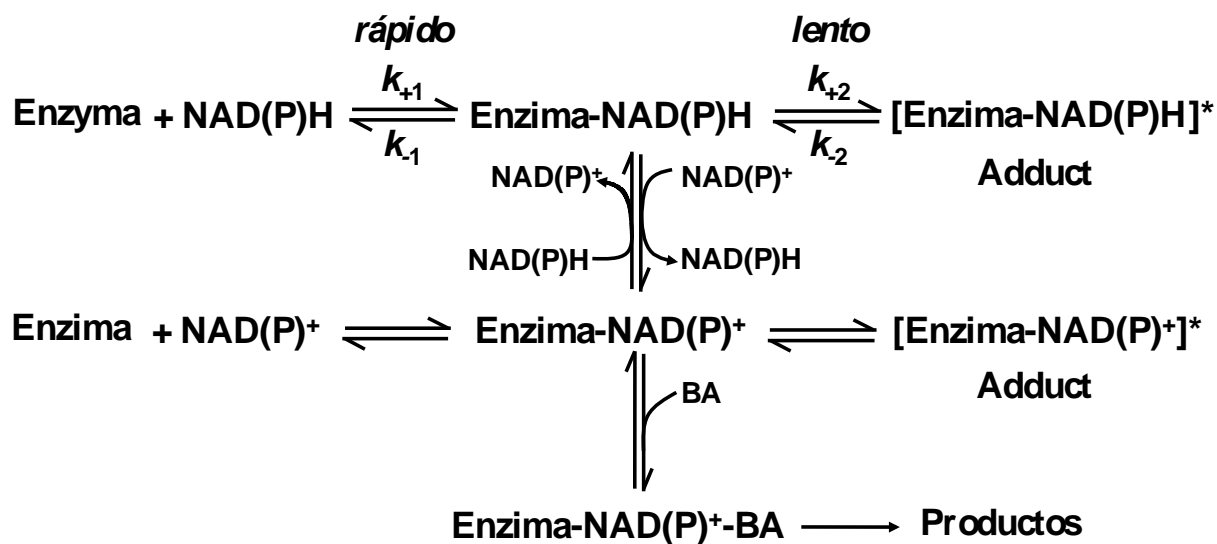


Figura 23. Mecanismo cinético propuesto de la formación reversible de los aductos NAD(P)H-PaBADH y NAD(P)⁺-PaBADH.

Para confirmar que la inactivación de la enzima inducida por el NADPH observada es producida por la formación de un aducto entre el nucleótido y la Cys286, seguimos la cinética de inactivación de la enzima por IAM de muestras de la PaBADH previamente incubadas con 0.2 μM de NAD(P)H hasta que la actividad remanente alcanzo una meseta (120 min). Los ensayos enzimáticos en estos experimentos se llevaron a cabo en ausencia de NAD(P)H y a concentraciones saturantes de sustratos, para permitir la completa reactivación de la enzima por

el NAD(P)H, de tal forma que sólo se siguiera la inactivación por IAM. Como se muestra en la Figura 22C, la protección a la inactivación por el reactivo específico de tioles alcanzada por una determinada concentración de NAD(P)H correlaciona con el nivel de inactivación producida por esa misma concentración de nucleótido. El nivel de protección alcanzado por el NADPH es mayor que el nivel alcanzado por el NADH, de nuevo estos resultados son consistentes con la mayor afinidad de la enzima por el primero. El nivel de protección que se alcanzó por el nucleótido es un poco menos que el de la inactivación, probablemente por la disociación parcial del aducto, favorecida por la reacción de la IAM con el tiolato de los sitios activos libres que existen en equilibrio con el aducto.

VIII.2.3.2.3 Formación de aductos NAD(P)⁺-Cys286

Un aducto entre el azufre de la Cys catalítica y el anillo de piridina del NADP⁺ se observó en la estructura tridimensional de la FDH (Tsyvovsky et al., 2007). Con base a cálculos de QM/MM, se predijo la formación de un aducto entre la Cys catalítica y el NAD⁺ en la ALDH2 (Wymore et al., 2007). Nosotros encontramos que la Cys286 de la PaBADH también es capaz de formar aductos con NAD(P)⁺, los cuales presentan un pico alrededor de 318 nm en el espectro diferencial de absorción de UV/Vis del NAD(P)⁺ (Figura 24) característico de un aducto entre el NAD(P)⁺ con grupos tioles (Van Eys y Kaplan, 1957; Patai y Rappoport, 1964). Este pico de absorción no apareció en el espectro diferencial de la enzima mutante C286A. La preincubación con NAD(P)⁺ no produjo inactivación de la PaBADH, porque los aductos NAD(P)⁺-Cys son muy reversibles en presencia del sustrato aldehído de la reacción ALDH (Tsyvovsky et al., 2007), como se muestra en la Figura 24.

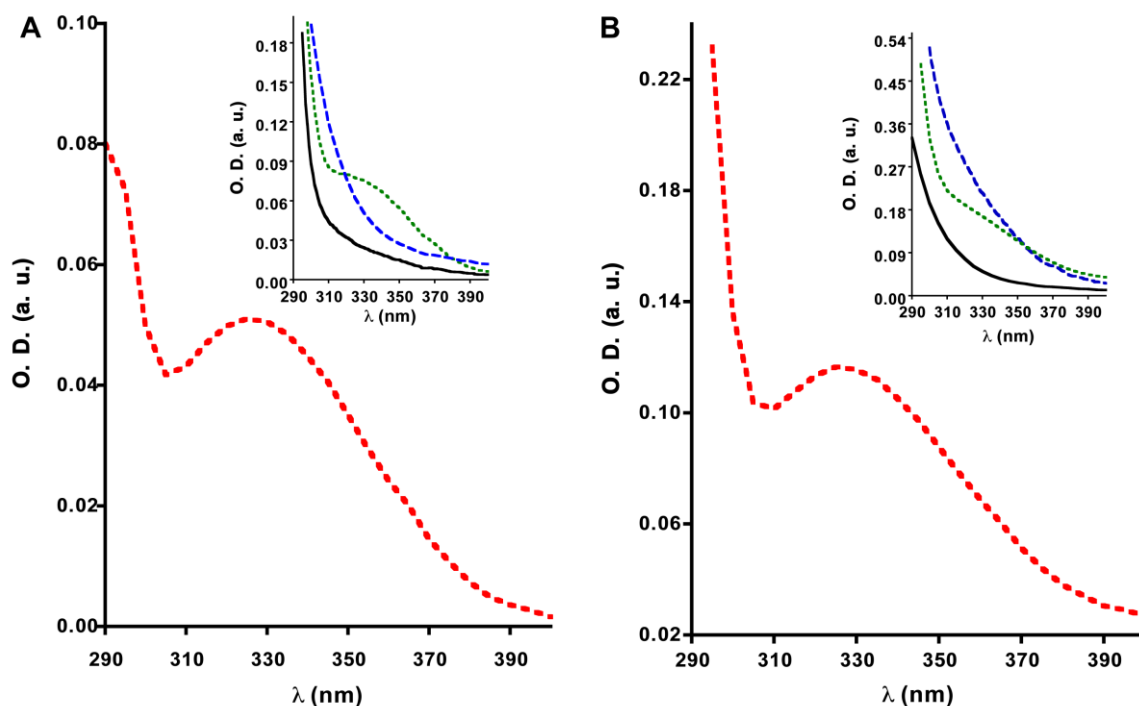


Figura 24. Espectros de absorción UV-Vis de los aductos NAD(P)⁺-Cys en la PaBADH. Las muestras de enzima (8.4 mM de sitios activos) se incubaron con **(A)** NADP⁺ 1 mM o con **(B)** NAD⁺ 2 mM. Las incubaciones se realizaron de acuerdo a Díaz-Sánchez et al. (2011; Anexo 3) en amortiguador de fosfatos a pH 7.5. Los espectros de diferencia (líneas rojas punteadas) se obtuvieron sustrayendo el espectro de NAD(P)⁺ (líneas negras continuas) y la enzima (líneas azules punteadas) del espectro de la mezcla de la enzima con el nucleótido (líneas verdes punteadas). El espectro diferencial muestra el pico a 327 nm, característico de los aductos tiol-NAD(P)⁺

VIII.2.3.2.4 Mecanismo químico de formación de aductos nucleótido-Cys286

El mecanismo de formación del aducto NAD(P)H-Cys que se propuso (Figura 25A), involucra un ataque nucleofílico inicial del tiolato de la cisterna catalítica sobre la posición dos del anillo de dihidropiridina del nucleótido (I), lo que lleva a la formación de un intermediario oxianión (II).

La conjugación de la doble ligadura del carbono carbonílico de la carboxiamida promueve la formación de un centro electrofílico en el carbono dos del anillo, por tanto favoreciendo el ataque, esto lo confirmamos por el pico de resonancia magnética nuclear de este carbono, el cual se observa desplazado a campos más bajos de lo esperado. El oxianión le abstrae un protón a una molécula de agua, proponemos que a Wat1, dada la posición que tendría en la conformación de Hyd1 del NADPH, para dar lugar al intermediario enol (III), el cual se tautomeriza para formar el derivado 1,2,3,4-tetrahidropiridina (IV).

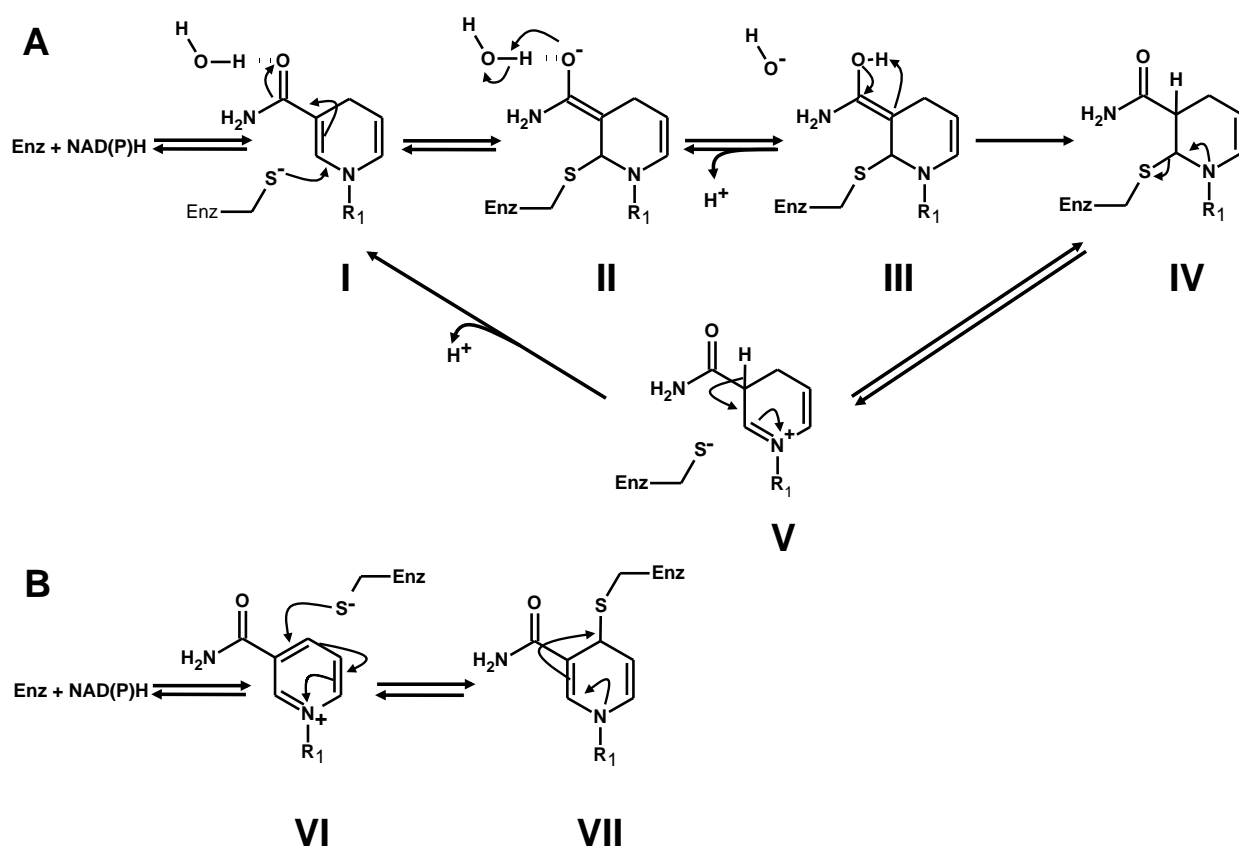


Figura 25. Mecanismo químico propuesto de la formación de (A) aducto NAD(P)H-Cys y (B) aducto NAD(P)-Cys en la PaBADH. (I) anillo de dihidropiridina, (II) intermediario oxianionico, (III) intermediario enol, (IV) derivado 1,2,3,4-tetrahidropiridina, el aducto NAD(P)H-Cys, (V) derivado enamina, (VI) anillo de piridina oxidada y (VI) derivado 1,2-dihidropiridina, aducto NAD(P)-Cys.

El mecanismo de formación del aducto $\text{NAD(P)}^+\text{-Cys}$ que se propuso (Figura 25B) involucra el ataque nucleofílico del tiolato sobre el carbono 4 (C4N) del anillo de piridina del NAD(P)^+ (VI), produciendo, una adición de Michael, un derivado 1,4-dihidropiridina, el aducto NAD(P)-Cys , el cual se puede eliminar por medio de una reacción de eliminación.

Previamente se encontró en la PaBADH una pérdida en la reactividad frente a reactivos específicos de grupos, cuando se pre-incuba la enzima con MMTS, en presencia de NAD(P)^+ y NAD(P)H (González-Segura et al., 2005). Los resultados se explicaron como consecuencia de un cambio conformacional lento, de naturaleza desconocida, de la enzima después de la unión de los nucleótidos. La habilidad de la PaBADH en formar aductos con los nucleótidos oxidados y reducidos da una explicación alternativa de esos resultados. Los nucleótidos producen en la enzima un cambio químico, no un cambio conformacional como se propuso previamente.

VIII.2.3.2.4 Implicaciones de la formación de los aductos NAD(P)H-Cys

La disminución de la reactividad de la Cys catalítica después de la formación del aducto con NADPH o con NADH pudiera proteger a la enzima del estrés oxidativo, como se propuso por otros en el caso de los aductos de las ALDHs con NAD(P)^+ (Wymore et al., 2007), por lo tanto previniendo de la inactivación irreversible. Pero, la formación de los aductos con los nucleótidos reducidos podría jugar un papel regulatorio de importancia fisiológica. La formación de los aductos NAD(P)H-Cys es reversible y podría ser de utilidad en disminuir la velocidad de una reacción irreversible catalizada por la PaBADH, antes de que esta reacción pudiera disminuir significativamente el cociente $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$, produciendo consecuencias adversas. En la reacción catalizada por las ALDHs, el producto ácido es un inhibidor muy pobre, de tal forma que el control negativo de la velocidad de la reacción es producido principalmente por la

inhibición del NAD(P)H. La PaBADH presenta baja afinidad por los nucleótidos reducidos, medida ésta por sus constantes de inhibición competitivas, K_{ic} , 182 y 1075 μM para el NADPH y el NADH, respectivamente (Velasco-García et al., 2000). Estos valores son considerablemente más bajos que las constantes de disociación, K_{ia} , las cuales son 48 y 186 μM para el NADP⁺ y el NAD⁺, respectivamente (Velasco-García et al., 2000), convirtiendo a los nucleótidos, particularmente el NADH, en inhibidores pobres de la reacción de la PaBADH en el intervalo de concentraciones alcanzadas en condiciones fisiológicas. La inactivación irreversible de la enzima por NAD(P)H notablemente pudiera incrementar la sensibilidad a disminuciones de los cocientes de NAD(P)⁺/NADPH y por lo tanto permitir un control más fino de la actividad de la PaBADH en función de las condiciones redox de la bacteria. La formación de aductos NAD(P)H-Cys286 pudiera constituir un mecanismo por el cual la actividad de la PaBADH pueda ser transitoriamente disminuida si es más alta que la velocidad de las reacciones que utilizan el NAD(P)H, permitiendo la regeneración eficiente del NAD(P)⁺. Considerando la naturaleza reversible de la formación de los aductos NAD(P)H-Cys, la actividad de la PaBADH puede recuperarse cuando las concentraciones de NAD(P)H descendan y las concentraciones de NAD(P)⁺ aumenten.

VIII.3. Determinantes estructurales de la especificidad por la coenzima

Para identificar los determinantes estructurales de la especificidad por el nucleótido en las BADHs resolvimos las estructuras cristalinas de la PaBADH en complejo con NAD(P)H y de la SoBADH en complejo con NAD⁺. Buscamos diferencias en la forma de unión de los nucleótidos entre la PaBADH y en la SoBADH que justificaran sus diferencias en afinidad y especificidad. Finalmente, y debido a que la PaBADH presenta una eficiencia catalítica comparable con ambos nucleótidos, cambiamos por mutagenesis sitio dirigida a los residuos que

identificamos como potencialmente críticos en determinar la especificidad dual por el nucleótido. La selección de los residuos la realizamos pensando en afectar con su mutación sólo la unión del NADP, de manera que la enzima pierda su especificidad dual y se convierte en una ALDH NAD⁺-dependiente sin que además se afecte la k_{cat} en esta reacción. Para esto nos basamos no sólo en los cristales de la PaBADH sino de otras ALDHs NAD(P)⁺-dependientes, así como en los resultados de análisis filogenéticos y de dinámica molecular.

VIII.3.1. En la PaBADH

VIII.3.1.1 Unión de la región del mononucleótido de la adenina del NAD(P)H

VIII.3.1.1.1 Identificación de los residuos de aminoácidos potencialmente críticos en la afinidad y especificidad por el nucleótido

En las estructura tridimensionales de la PaBADH en complejo con los nucleótidos con las que contamos se observa que la parte de la adenosina monofosfato (AMP) del NAD(P)⁺ se une en el dominio tipo Rossmann de la enzima esencialmente igual a como se une en todas las ALDHs cuya estructura en complejo con el dinucleótido ha sido depositada en el PDB. Al inicio de este proyecto de investigación sólo contábamos con la estructura cristalográfica de la PaBADH en complejo con NADP⁺ (González-Segura et al., 2009, código PDB 2wme) y por lo tanto no conocíamos las interacciones que la enzima hace con la adenosina monofosfato del NAD⁺. En el cristal de la PaBADH en complejo con NADPH confirmamos las interacciones observadas en González-Segura et al., (2009) y logramos identificar otras, formadas entre la parte de la nicotinamida mono nucleótido y la enzima (Díaz-Sánchez et al., 2011; Anexo 3) (Figura 26 y Tabla 2). Para identificar posibles diferencias en la unión de los dos nucleótidos, generamos un modelo de la enzima en complejo con el NAD⁺, usando la estructura del complejo de la PaBADH con NADP⁺ (2wme) y la ALDH2 (1o04) como moldes (Figura 27). Para encontrar el estado de

mínimo de energía del modelo se minimizó usando el campo de fuerza GROMOS. La reciente determinación de la estructura tridimensional de la PaBADH en complejo con NADH (pdb estructura muy avanzada en su resolución) nos permitió confirmar las interacciones entre la enzima y la región AMP del NAD⁺ identificadas en el modelo. Los residuos que interaccionan por medio de contactos polares con la parte del AMP del NADP(H) se describen a continuación. A menos que se indique lo contrario, lo descrito se observó en todas las subunidades de las unidades asimétricas de todas las estructuras de los cristales de la PaBADH.

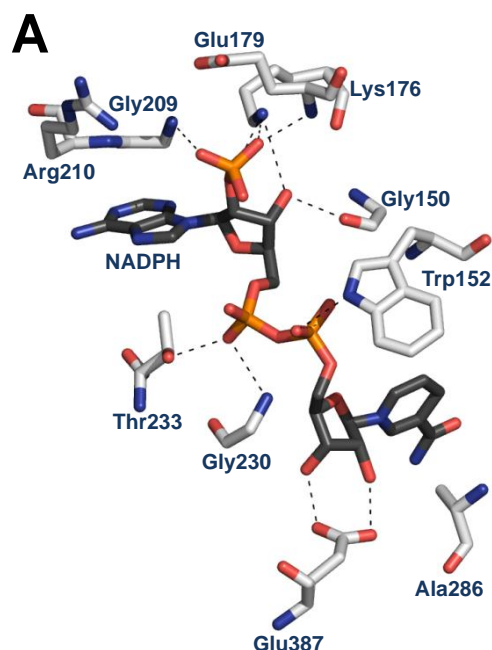


Figura 26. Interacciones del NADPH en el sitio activo de la PaBADH. (A) Se muestra el NADPH unido en la subunidad A, en el cristal de la PaBADH mutante C286A. (código PDB 3zqa). El grupo 2'-P del nucleótido es alejado del Glu179 como se encontró en González-Segura et al. (2009). La figura se hizo con Pymol (<http://www.Pymol.org>). Tomada y adaptada de Díaz-Sánchez et al. (2011); Anexo 3.

| NADPH | Átomo | | Distancia (Å) | |
|-----------------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|--|
| | Proteína o solvente | Silvestre | C286A | |
| Ribosa de la adenina | | | | |
| O2B | NZ Lys176 | 3.04 | 3.04 | |
| O3B | NZ Lys176 | 3.36 ^b | 3.44 ^c | |
| | O Gly150 | 2.60 | 2.76 | |
| 2'-P del AMP | | | | |
| O1X | NZ Lys176 | 2.85 | 2.95 | |
| | N Glu179 | 2.76 | 2.59 | |
| O2X | N Gly209 | 3.01 | 2.75 | |
| O3X | OG Ser178 | 2.73 ^d | 2.81 ^e | |
| Fosfato de la adenina | | | | |
| O1A | OG1Thr233 | 2.74 | 2.60 | |
| | N Gly230 | 2.92 | 3.11 ^f | |
| O2A | OG1Thr233 | 2.66 | - | |
| Fosfato de la nicotinamida | | | | |
| O1N | NE1 Trp152 | - | 2.88 | |
| O2N | NE1 Trp152 | 3.15 | - | |
| Ribosa de la nicotinamida | | | | |
| O2D | OE2 Glu387 | 2.68 | 2.66 | |
| O3D | OE1 Glu387 | 3.00 | 2.51 | |
| | O Gly229 | 3.46 | - | |
| Anillo de la nicotinamida | | | | |
| N7N | O Leu253 | 2.36 | 2.81 | |
| | O2 Glicerol | 3.24 ^g | 3.17 ^g | |
| O7N | O2 Glicerol | 2.79 ^g | 2.90 ^g | |
| | O1 PEG | - | 2.41 ^h | |

Tabla 2. Interacciones del NADPH con la PaBADH. ^aContactos más cortos (menos de 3.5 Å) con los átomos de la proteína y con los compuestos observados, provenientes del medio de cristalización; ^bInteracciones encontradas en las subunidades A y C; ^cInteracciones encontradas en la subunidad A; ^dInteracciones encontradas en las subunidades B y D ; ^eInteracciones

encontradas en la subunidad D; ^fInteracciones encontradas en las subunidades A, B y C; ^gEl glicerol no puede interaccionar simultáneamente con el O7N y N7N; ^hInteracción encontrada en la subunidad A con el O1 del polietilenglicol (PEG), en las subunidades B y D con el O1 y el O3 de un glicerol, respectivamente, y en la subunidad C con una molécula de agua. Tomada y adaptada de Díaz-Sánchez et al. (2011); Anexo 3.

1) **Lys176**: Su grupo ϵ -amino forma un puente salino con uno de los oxígenos del 2'-fosfato de la ribosa de la adenosina del NADP(H). En el caso de la unión del NAD(H) forma dos puentes de hidrogeno con los hidroxilos 2' y 3' de esta ribosa (Figura 26).

2) **Glu179**: Su nitrógeno amídico de la cadena principal le dona un puente de H a uno de los oxígenos del 2'-P de la ribosa de la adenosina del dinucleótido. En cuanto a su cadena lateral se han observado dos conformaciones. En una de ellas, presente en el complejo de la enzima con NADP(H) el grupo carboxilo se aleja de la región de unión del 2'-P del dinucleótido por el puente salino que hace con la R40. De esta forma el grupo carboxilo no impide la unión del NADP(H) por repulsión estérica ni electroestática(Figura 26). Esta interacción se pierde cuando la enzima no tiene unido al NADP⁺, dejando así libre al E179 para interaccionar con el 2'-OH de la ribosa de la adenosina, como se observó en los cristales de la forma apo de la PaBADH y del complejo con NADH (Figura 27). En este caso el E179 adopta una conformación característica de las deshidrogenasas NAD⁺-dependientes que poseen este residuo, en la que uno de los oxígenos del carboxilato recibe un puente de hidrógeno del 2'-OH de la ribosa de la adenosina del NAD⁺ o NADH.

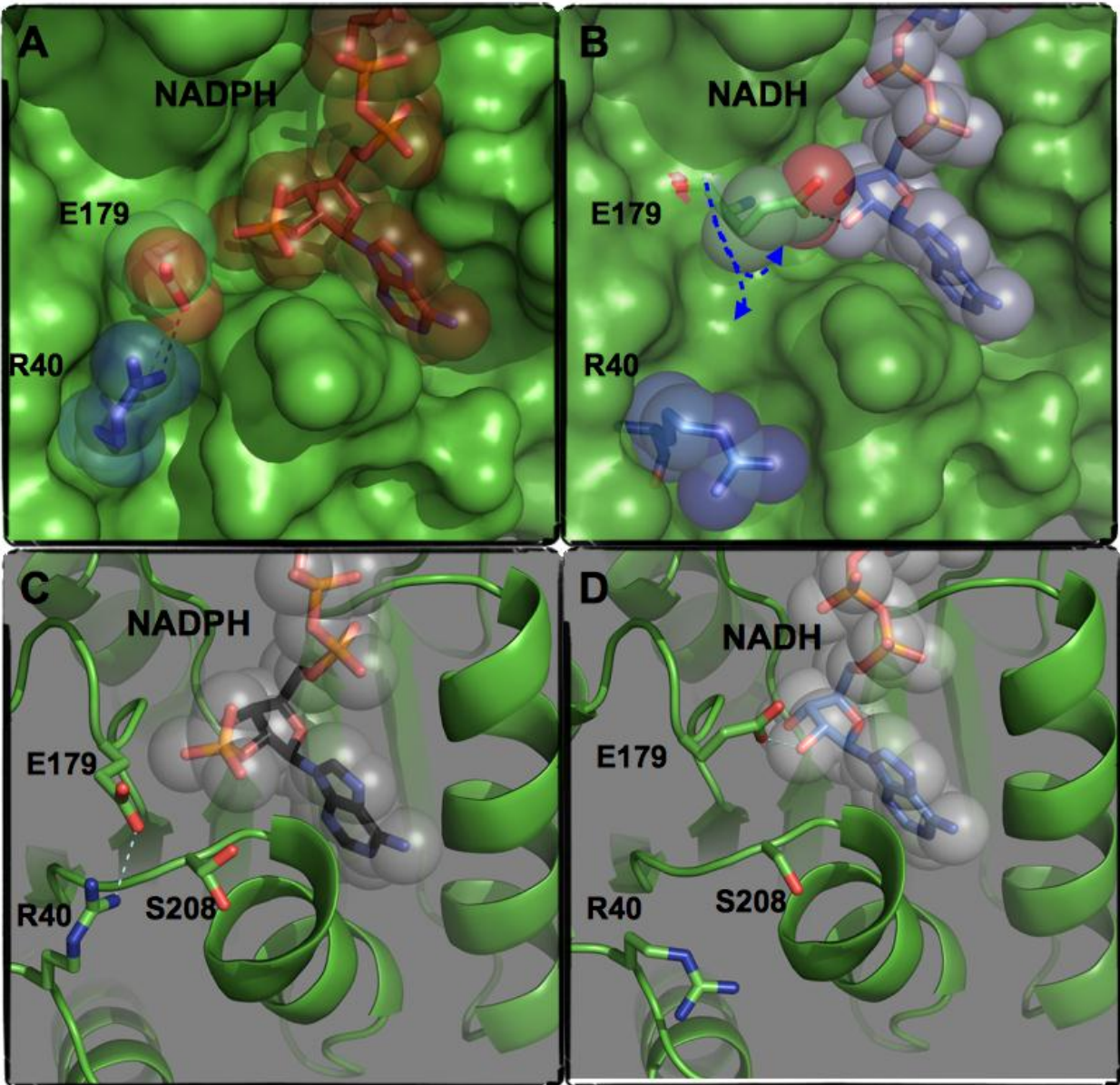


Figura 27. Conformaciones del Glu179 en el sitio activo de la PaBADH y de la ALDH2. (A) Se muestra el NADPH unido en la subunidad A representada en forma de superficie, en el cristal de la PaBADH. (código PDB 2wox). La cadena lateral del Glu179 es alejada del grupo 2'-P del nucleótido. (B) La cadena lateral de Glu179 se mueve a una conformación en donde ahora puede interactuar con el 2'-OH del NAD⁺, observada en el cristal de la PaBADH en complejo con NADH. Esta conformación del Glu es la observada en las ALDHs NAD⁺-dependientes como es el caso de la ALDH2 y otras deshidrogenasas, así como en las simulaciones de dinámica molecular de la PaBADH en su forma libre o en complejo con NAD⁺ (Rodríguez-Sotres,

comunicación personal) y en la estructura cristalina parcialmente resuelta de la PaBADH en complejo con NADH. (C) y (D) corresponden a (A) y a (B), respectivamente en un representación donde se muestran las interacciones de la cadena lateral de Glu179 en las dos conformaciones. La flecha azul en (B) indica el desplazamiento que sufre la cadena lateral del Glu. La figura se hizo con Pymol (<http://www.Pymol.org>).

3) **Ser178**: El grupo hidroxilo de su cadena lateral interacciona por puentes de hidrógeno con el hidroxilo 3'-OH, y en algunas subunidades además con el 2'-P de la ribosa de la adenosina del NADP(H) a través de una molécula de agua. En el caso del NAD(H) también forma el puente de H con el 3'-OH de la ribosa a través de una molécula de agua (Figura 26).

4) **Arg210**: Este residuo presenta alta flexibilidad conformacional (Figuras 28). En una de las conformaciones observadas su grupo guanidinio interacciona con el 2'-P a través de una molécula de agua. En otra conformación es su nitrógeno amídico de la cadena principal el que hace esta interacción, también a través de una molécula de agua. Y en una tercera conformación su grupo guanidinio interacciona con el grupo amino en la posición 6 y con el nitrógeno 7 del anillo púrico de la adenina, ya sea a través de una molécula de agua o por medio de interacciones π .

5) **Ser208**: Este residuo se observa en dos conformaciones en las estructuras de la PaBADH en complejo con NADP(H). En una conformación el grupo hidroxilo de su cadena lateral interacciona con el 2'-P del NADP(H) y en la otra conformación éste se mueve en dirección opuesta al 2'-P e interacciona ya sea con una molécula de agua o con el E211. En el caso de los cristales con NAD(H), su OH queda muy lejos del 2'-OH de la ribosa de la adenosina para realizar una interacción polar (Figura 26).

6) **Gly209**: El nitrógeno amídico de su cadena principal forma un puente de hidrógeno con el 2'-P de la ribosa de la adenosina del NADP(H), pero en el caso del NAD(H) queda fuera del radio de una interacción de este tipo con el 2'-OH de la ribosa (Figura 26).

7) **Thr217**: El oxígeno del carbonilo de la cadena principal interacciona a través de una molécula de agua con el nitrógeno en la posición 1 del anillo de la adenina tanto del NADP(H) como del NAD(H) (Figura 26).

8) **Glu211**: En unas subunidades, la cadena lateral de este residuo interacciona con la Arg40 por medio de una molécula de agua (Figura 28A y E). y en otras interacciona directamente con la Arg40 (Figura 28C).

9) **Dipolo de la hélice $\alpha 3$** : la carga parcial positiva del extremo amino terminal de la hélice $\alpha 3$ participa en la unión del 2'-P del NADP⁺ en las estructuras de la PaBADH en complejo con el NADP⁺ y NADPH.

Todos estos residuos que unen de forma directa al nucleótido son potencialmente críticos para la afinidad por el NAD(P)⁺. Pero solo aquellos que participan en la unión de uno de los nucleótidos, pero no en el del otro o aquellos que producen un impedimento estérico en la unión del 2'-P del NAD(P)⁺ son potencialmente críticos en la especificidad por el nucleótido. En el caso de la PaBADH, que es una enzima con especificidad dual, buscamos si existe algún interruptor molecular que sirva para unir a los dos nucleótidos con afinidades comparables. Para ello nos fijamos si algunos de los residuos descritos en esta sección presenta: Una conformación alternativa entre las subunidades que constituyen la unidad asimétrica de los cristales de la PaBADH en complejo con NADPH; Conformaciones alternativas encontradas en la simulación de dinámica molecular o en el cristal de la PaBADH en complejo con NADH o en su forma libre (en la Figura 28 se resumen los cambios conformacionales observados en el cristal de la PaBADH en complejo con NADPH).

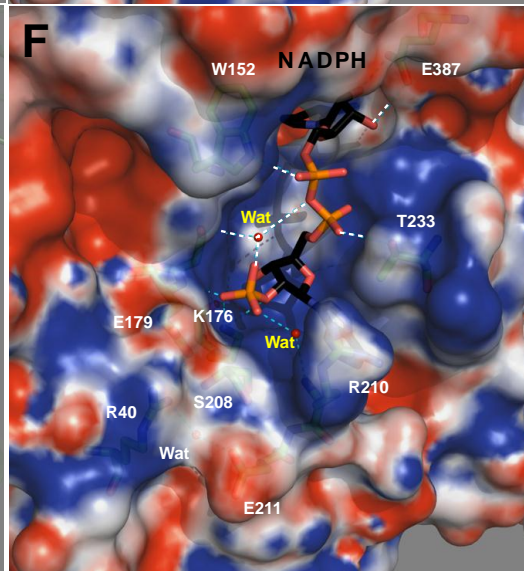
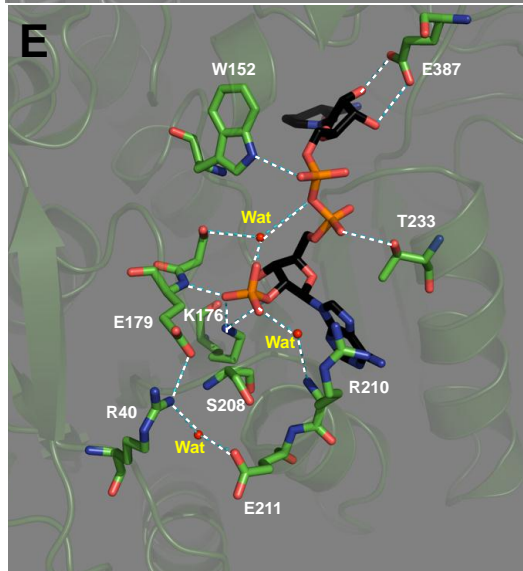
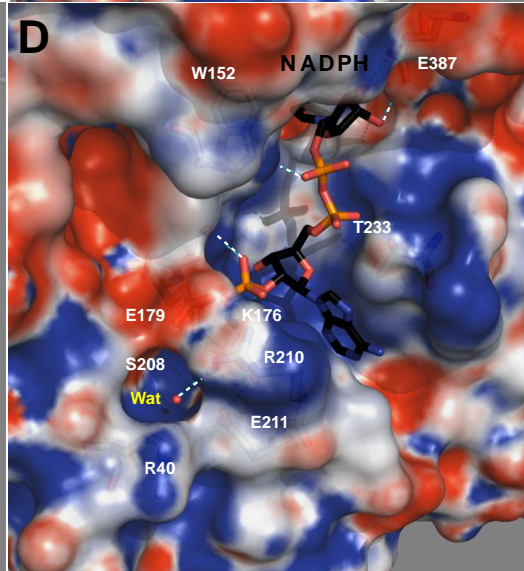
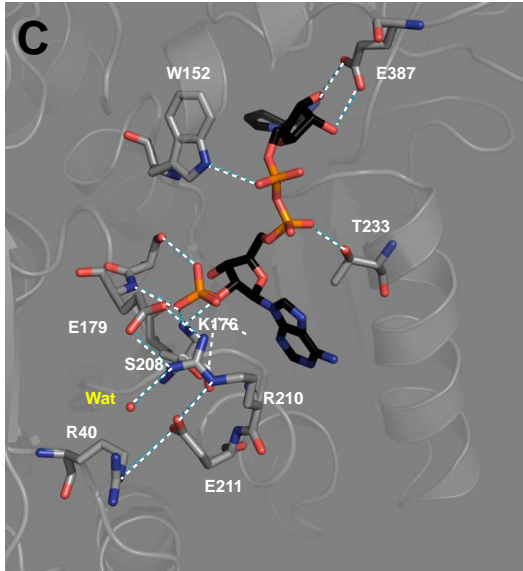
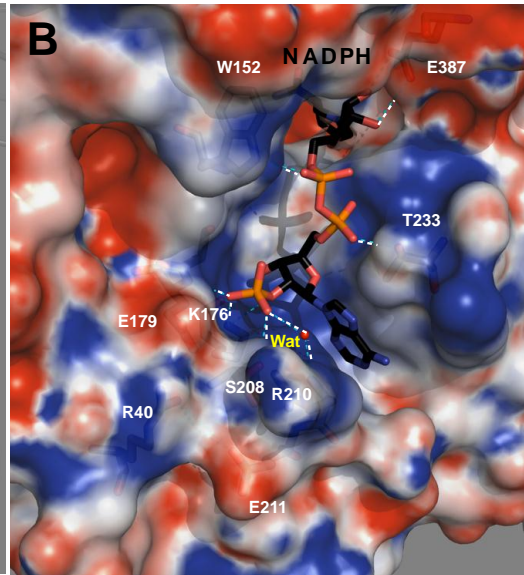
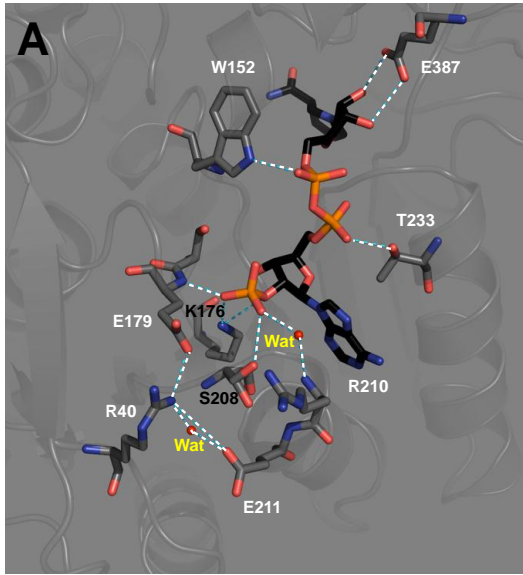


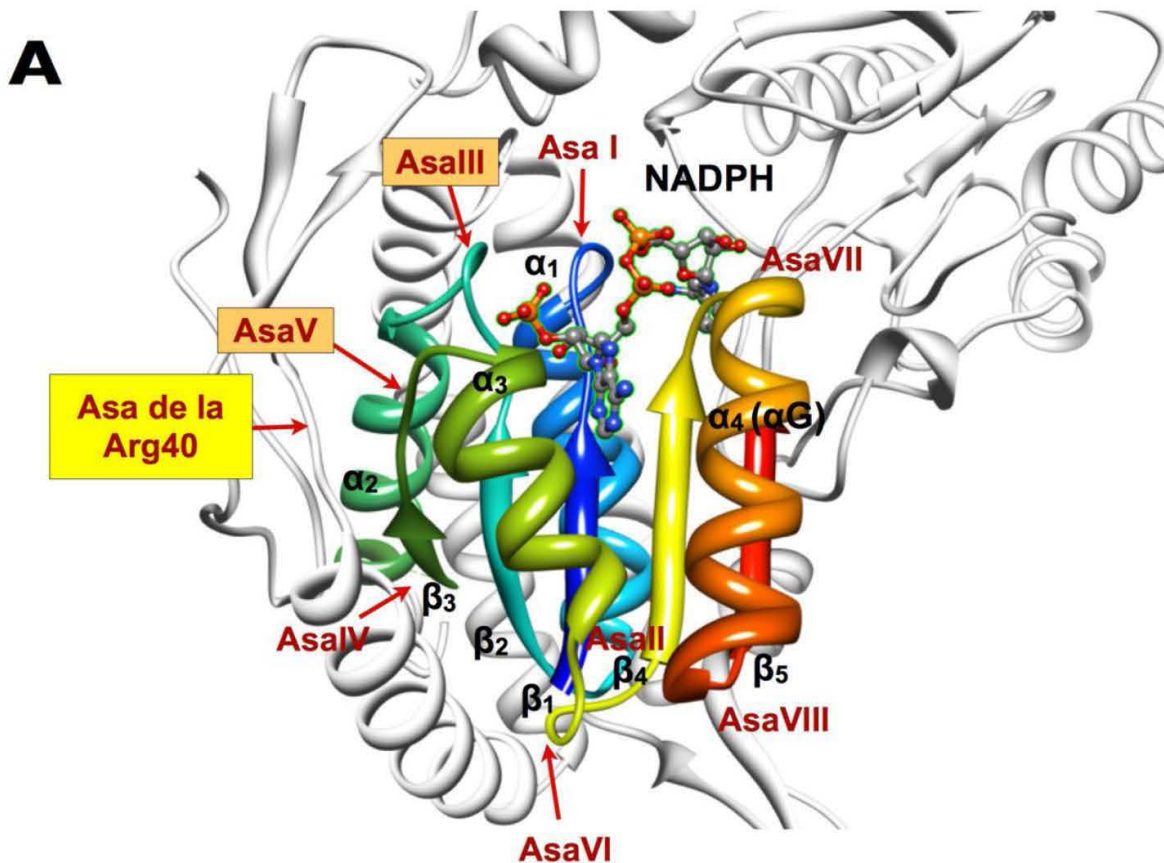
Figura 28. Unión del NADPH en la PaBADH mostrando cambios locales en la conformación de algunos residuos involucrados en la unión de la parte de la adenosina monofosfato. Las distancias representadas por líneas punteadas son interacciones polares. (A) y (B) observada en la subunidad A, (C) y (D) observada en la subunidad B, (E) y (F) en la subunidad C. En los paneles B, D y F se muestran los potenciales electrostáticos superficiales de las subunidades correspondientes. Los potenciales se calcularon con APBS usando el servidor (<http://kryptonite.nbcrl.net/pdb2pqr/>). La figura se hizo usando PyMol (<http://www.pymol.org>).

VIII.3.1.1 Función de los residuos de aminoácidos que participan en la unión de la región del mononucleótido de la adenina del NAD(P)H en otras ALDHs

Se buscó en la literatura información sobre la participación en la unión de los nucleótidos en otras ALDHs de los residuos que nosotros encontramos participan en la PaBADH. Buscamos a estos residuos en las estructuras tridimensionales resultas con NAD(H): la ALDH1 (Moore et al., 1998; pdb 1bxs); la ALDH2 (Steinmentz et al., 1997; pdb 1a4z); la ALDH3 (Liu et al., 1997; pdb 1ad3); la GcBADH (Johansson et al., 1998; pdb 1bpw); la retinal deshidrogenasa (Lamb y Newcomer, 1999; pdb 1bi9); la EcALDHA (Di Costanzo et al., 2007, pdb 2imp); la TtP5CDh (Inagaki et al., 2009; pdb, 2bhp); la BADH de *Staphylococcus aureus* (pdb 3fg0); la YDCW de *E. coli* (Gruez et al., 2004; 1wnb); una ALDH de *Micobacterium tuberculosis* (pdb 3b4w); la metilmalonato semialdehído deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* (pdb 1t90); la succinato semialdehído deshidrogenasas de humano (HsSSADH) (Kim et al., 2009; pdb 2w8r); la ALDH10 de chicharo (Tylichova et al., 2010; AMADH-1, pdb 3iwj) y la SoBADH (Díaz-Sánchez et al., 2012; pdb 4a0m, Anexo 4) y con NADPH: la ALDH de *V. harveyi* (Ahvazi et al., 2000; pdb 1eyy); la FDH (Tsyvovski et al., 2007; pdb 2o2q); la SmGAPN (Cobessi et al., 1999; pdb 2euh); y la de *Thermoproteus tenax* (TtGAPN) (Pohl et al., 2002; pdb 1ky8); EcALDHA (Di costanzo et al., 2007, pdb 2ilu); la SSADH de *E. coli* (Langendorf et al., 2011; pdb 3jz4); la benzaldehído

deshidrogenasa de *Burkholderia xenovorans* (Bains y Boulanger 2008; pdb 2vro); la TtP5CDH (Inagaki et al., 2009; pdb 2ehq) y una ALDH3 de *P. putida* (PaALDH3, 3lv1). Los residuos que identificamos se encuentran en el asa I (del 176 al 179) y en el asa II (del 207 al 211) del plegamiento tipo Rossmann y la Arg 40 se encuentra en un asa que no forma parte del plegamiento, pero se encuentra en el dominio de unión a la coenzima (Figura 29).

1) **K176**: Este residuo está altamente conservado en las ALDHs de secuencia conocida (Vasiliou et al., 1999; Perozich et al., 2000; Julian-Sánchez et al., 2006). Al igual que en la PaBADH, el grupo ϵ -amino del residuo de lisina equivalente a K176 interacciona con los hidroxilos 2' y 3' de la ribosa de la adenosina en las estructuras tridimensionales resueltas con NAD(H). El grupo ϵ -amino, además de interaccionar con el 3'-OH, interacciona con el 2'-P del NADP⁺ a través de un puente salino en las enzimas cuya estructura se determinó en complejo con este nucleótido. La participación de la Lys en la unión tanto del NAD⁺ como del NADP⁺ se ha confirmado por mutagénesis sitio-dirigida en la ALDH3 (Ho y Weiner, 2005; Perozich et al., 2000), lo que es consistente con que se encuentra conservado en más del 98% de las ALDHs reportadas hasta la fecha (Julián-Sánchez, comunicación personal). Algunas ALDHs no caracterizadas bioquímicamente presentan una Gln en lugar de la Lys176. Su participación en la unión tanto del NAD⁺ como del NADP⁺ se ha confirmado por mutagénesis sitio-dirigida en la ALDH3 (Ho y Weiner, 2005; Perozich et al., 2000), lo que es consistente con que se encuentra conservado en más del 98% de las ALDHs reportadas hasta la fecha (Julián-Sánchez et al., 2006; Perozich et al., 2000).



B

| Enzima | Codigo pdb | Asa de la Arg | | Asa III | | Asa V | |
|--|------------|---------------|--------------------|---------------|-----------------|-------|--|
| | | 40 | 176 179 | 208 210 | | | |
| NAD⁺-dependientes | ALDH1 | 1bxs | EVE EGDKED | VKPAEQ | GYGPTA | | |
| | ALDH2 | 1o00 | QVA EGDKED | MKVAEQ | GF GPTA | | |
| | GcBADH | 1bpw | QMVP CGAEE | FKPSPM | G- GAET | | |
| | SoBADH | 4a0m | DIPA A TAED | LKPSEL | GL GPDA | | |
| | EcALDHA | 2ILU | RIP D GQAED | IKPSEF | GR GETV | | |
| | EcALDHB | 1wnb | EIA E ASAEQ | LKPSEI | GR GKTV | | |
| NADP⁺-dependientes | HsFDH | 2o2p | QVSLAQVSD | IKPAQV | GSGSLV | | |
| | VhALDH | 1eyy | ----- | VKGHTA | GN QRAL | | |
| | SmGADP | 2esd | SVPAMSTEE | FKPPTQ | GR GSEI | | |
| | EcALDHC | 3jz4 | SVP K MGADE | LKPASQ | GS SAGAV | | |
| | BxALDH | 2vro | RVS-SEGLD | VKPATA | GSS AGL | | |
| NAD(P)⁺-dependientes | PaALDH3 | 3lv1 | ----- | IKPSET | G- GRDE | | |
| | ALDH3 | 1ad3 | ----- | LKPSEV | GG VPET | | |
| | TtP5CDh | 1uzb | TTA K AGKAE | AKPAED | GV GEEV | | |
| | PaBADH | 2wox | KV Q RASRED | FKPSEV | GSG REV | | |

↑
↑
↑

Figura 29. Porción de un alineamiento de la cadena polipeptídica con los residuos involucrados en la unión del nucleótido en algunas de las ALDHs cristalizadas y localización en el plegamiento Rossmann. (A) Se muestra la estructura de un monómero de la PABDH (código PDB 2wox) y se resalta en colores el plegamiento tipo Rossmann. (B) Alineamiento entre algunas ALDH representantes de acuerdo a su clasificación por la preferencia del nucleótido. Las secuencias y los alineamientos se realizaron usando el programa P.BLAST de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). La numeración usada es la correspondiente a la secuencia de la PaBADH. Para este análisis se comparó con el alineamiento realizado por Julián-Sánchez et al. (2006), que consta de 546 ALDHs no redundantes. Las flechas indican las posiciones potencialmente importantes en la especificidad dual por el nucleótido.

2) **Glu179:** En las enzimas que usan NAD^+ , el residuo de glutámico equivalente al Glu179 interacciona con los hidroxilos 2' y 3' de la parte de la adenina del NAD^+ , por lo que inicialmente se pensó que el carboxilo de este Glu, o de un Asp en otras piridin deshidrogenasas, era el responsable de la exclusión del NADP^+ en estas enzimas por repulsión electrostática con el 2'-P (Baker et al., 1991; Steinmentz et al., 1997). Sin embargo, la ALDH3, la TtP5CDh, la PaALDH3 y la PaBADH conservan este glutamato y son capaces de unir al NAD^+ o al NADP^+ de forma casi indistinta. En la familia de las ALDHs, este residuo se encuentra presente en el 80% de sus miembros. La mutación de este glutamato en la ALDH3 de rata (Perozich et al., 2000) sugirió que es en parte responsable de la alta afinidad por el NAD^+ en la enzima, y que deben existir interacciones adicionales que den cuenta de la habilidad de esta enzima para utilizar al NADP^+ . El 1 % de los miembros de las familias de las ALDHs tienen un aspartato y sólo un miembro presenta un residuo con carga positiva (una Lys, aunque este podría ser el caso de un error en la secuenciación). En las enzimas con especificidad dual por el nucleótido, por ejemplo la VhALDH (Ahvazi et al., 2000) y SmGAPN (Cobessi et al., 1999), que son enzimas que usan a los dos

nucleótidos eficientemente, pero presentan una preferencia por el NADP^+ significativa con respecto al NAD^+ , el E179 se encuentra sustituido por una Thr que forma puentes de hidrógeno con el 3'-OH y el 2'-P del NADP^+ . La FDH posee en lugar del Glu una Gln cuya cadena lateral es excluida del sitio de unión del fosfato de la ribosa de la adenosina del NADP^+ de forma idéntica a como lo es la del E179 en la PaBADH, es decir por una interacción con el residuo de Ala equivalente a la Arg40 (pdb 2o2q).

Arg40: Este residuo está presente sólo en un 8 % de las ALDHs. En otras ALDHs, en esta posición se encuentran otros residuos con carga positiva como histidina, presente en un 1.5% de las secuencias conocidas, y lisina, presente en un 6 %. Estos dos residuos podrían jugar el mismo papel que la arginina en aquellas enzimas que tienen además el residuo equivalente al Glu179, estabilizando la conformación del Glu179 compatible con la unión del NADP(H) , por lo que se podría predecir que estas enzimas también son capaces de unir al NADP^+ . Alrededor del 90 % de las ALDHs que presentan la Arg o en su lugar una His o una Lys presentan también al Glu179. Este hallazgo sugiere que en estas enzimas es probable que el Glu adopte la conformación compatible con la unión del NADP^+ , siempre y cuando no exista en éstas un residuo que evite que el Glu se mueva. Por otra parte, en esta posición existe un glutamato o aspartato en un 30 y 8%, respectivamente, de las ALDHs, por lo que es probable que estos residuos potencien la exclusión del NADP^+ en las enzimas NAD^+ -dependientes al repeler al residuo ácido equivalente al E179, presente en todas ellas, y obligarlo a adoptar la conformación que sólo es compatible con la unión del NAD^+ .

Glu211: la posición de este residuo es variable en las ALDHs con secuencia conocida. El 40 % de los miembros presenta un Glu y el 25 % presenta un Asp. Otros miembros presentan residuos

polares como una Thr o una Ser y el resto presenta una Ala o una Val. El Glu o el Asp pudieran ser importantes en las enzimas con especificidad dual por el nucleótido que además poseen el Glu179 y la Arg40.

Arg210: Esta arginina está presente en el 6 % de las ALDHs reportadas hasta la fecha, mientras que el 4 y 6 % de las enzimas tienen una histidina o una lisina, respectivamente. El 8 y el 3 % tienen un glutamato o un aspartato, respectivamente. Estos residuos con carga negativa, junto con la del Glu179 podrían ser en parte responsables de la repulsión electrostática del NADP^+ en estas enzimas. En el resto de las ALDHs se encuentra mayoritariamente un residuo de Ala.

La Arg210 de la ALDH de *V. harveyi* contribuye a la alta afinidad por el NADP^+ (K_m de 1.2 μM) por medio de interacciones π entre el grupo guanidinio de la arginina y el anillo de la adenina y un puente salino con el 2'-P del nucleótido (Ahvazi et al., 2000). Se ha sugerido que la cadena lateral de esta arginina en la VhALDH actúa como una compuerta que mantiene al anillo de la adenina en posición y unida a la enzima (Ahvazi et al., 2000). En la PaBADH, en la VhALDH y en la GAPN de *Thermus acidophilus* (TaGAPN) la Arg210 interacciona con el 2'-P de la ribosa de la adenina, lo que apoya la idea de que esta arginina es responsable de la alta afinidad por el NADP^+ observada en la VhALDH (Ahvazi et al., 2000) y en la TaGAPN de *T. acidophilus* (Jung y Lee, 2006). En la PaBADH no hemos observado hasta la fecha las interacciones π con el anillo de la adenina, porque la Arg adopta una conformación distinta a la observada en la VhALDH pero en su lugar establece dos puentes de hidrógeno con este anillo, y de hidrogeno con el 2'-P del NADPH a través de una molécula de agua (Figura 28).

Dipolo de la hélice α : Este dipolo también se ha descrito que participa en la unión del 2'-P del NADP^+ en la estructura de la SmGADP (Perozich et al., 2000).

S208: En las ALDHs hay dos tipos de residuos en esta posición: Residuos voluminosos que se encuentran en las ALDH que son dependientes de NAD^+ y que presentan el residuo de Glu179 o en ALDHs NADP^+ -dependientes que en lugar del Glu179 presentan un residuo relativamente pequeño como una His, una Thr o una Ser; o bien residuos relativamente pequeños observadas en enzima con especificidad dual y que además presentan el Glu179. Este residuo había pasado desapercibido en los estudio estructurales de las ALDHs

Desde la descripción del dominio de unión de los nucleótidos de piridina en las deshidrogenasas por Rossmann et al. (1977), y por Eklund y Branden [\(1992\)](#), se estableció que el residuo de aminoácido localizado aproximadamente a unas 90 posiciones río arriba del motivo GXXGXXGX es el responsable de la especificidad por el nucleótido. Las enzimas dependientes de NAD(H) presentan un residuo de glutámico o aspártico y las enzimas dependientes de NADP(H) presentan generalmente un residuo polar y relativamente pequeño, como una serina o treonina. En las ALDHs esta posición equivale a la 179 (numeración de la PaBADH. Cómo se describió anteriormente, el Glu179 se ha observado en dos conformaciones en los cristales de las ALDHs disponibles. En una conformación, el grupo carboxilo está hacia dentro de la cavidad donde se une la ribosa de la adenosina del NAD^+ interaccionando con los hidroxilos 2' y 3' (Steinmentz et al., 1997), conformación a la que llamamos “compatible con la unión del NAD^+ ” (Figura 27). En la otra conformación el grupo carboxilo está afuera de esta cavidad (González-Segura et al., 2009), conformación a la que llamamos “ NADP^+ compatible” (Figura 27). En la estructura tridimensional de la PaBADH en complejo con NADH y en la forma apo se observa el Glu en la conformación compatible con el NAD^+ . Cuando la PaBADH une al NADP^+ , su 2'-P obliga por repulsión electrostática entre su carga negativa y la carga negativa del Glu179 a adoptar la conformación compatible con el NADP^+ y que cuando la enzima une al NAD^+ el 2'-OH no empuja al glutámico y éste no adopta la conformación en la cual el Glu queda afuera de la

cavidad (Figura 29). Este cambio conformacional del Glu179 es permitido a consecuencia del volumen relativamente pequeño de un residuo de Ser localizado en el asa V del plegamiento tipo Rossmann (Figura 29). La Arg40 se sitúa en un asa e interacciona con el Glu179 en la conformación compatible con el NADP⁺ o con el Glu211, o de acuerdo a las dinámicas moleculares con la Phe. A diferencia de la PaBADH, quien tiene una preferencia por el NADP⁺ con respecto al NAD⁺ cuatro veces mayor, la TtP5CDh, quien carece de la Arg40, prefiere siete veces al NAD⁺ sobre el NADP⁺, por lo que pensamos que la presencia de la Arg40 es importante en la preferencia por NAD(P)⁺ sobre el NAD⁺. Por lo anterior, proponemos que en la PaBADH, existe un interruptor de la especificidad por la coenzima, que permite unir tanto al NAD⁺ como al NADP⁺. Este interruptor estaría formado por la Arg40, el Glu179, la Ser208, la Arg210 y el Glu211. Reemplazamos cada uno de estos residuos para evaluar su papel en la especificidad dual. También reemplazamos al Glu179 por Pro y a la Arg40 por Pro, ya que la GcBADH, una ALDH-NAD⁺-dependiente, que presenta en estas posiciones residuos de Pro y finalmente reemplazamos a la Lys176, la Ser178 y la G209. Con el objetivo de conocer el papel de estos residuos en la unión del nucleótido.

VIII.3.1.1.2. Mutagénesis sitio-dirigida de residuos de la región de unión del mononucleótido de la adenina del NAD(P)H

Los cambios de los aminoácidos los realizamos basándonos en los datos de las relaciones evolutivas entre las ALDHs NAD⁺-dependientes con el fin de disminuir los efectos no deseados que podrían producir algunas de las mutaciones en otras propiedades de la enzima, como su estabilidad.

(1) **Mutaciones de la Lys176.** Este residuo se cambió por Glu y por Ala, en el primer caso con la idea de producir una repulsión electrostática entre el grupo carboxilo y el O3X del 2'-P de la ribosa de la adenosina del NADP⁺, aunque ningún miembro de las ALDHs hasta ahora reportado presenta Glu en esta posición, y en el segundo con la idea de que se produjera una disminución de la afinidad de la enzima por el NADP⁺ por la pérdida de un puente salino muy estable entre el ε-amino de la Lys y el O3X del 2'-P.

Mutaciones del Glu179. Este residuo se cambió por Pro, con la intención de producir un impedimento histérico en la unión del NADP⁺ porque se encuentra muy próximo al 2'-P de la ribosa de la adenina en el complejo de la holoenzima (González-Segura et al., 2009; Muñoz-Clares et al., 2009; Anexo 2).

Mutaciones de la Ser178. Este residuo se cambió por Asp, con la idea de introducir una repulsión electrostática entre su grupo carboxilo y el O2X del grupo fosfato de la ribosa de la adenosina del NADP⁺, y por Ala, para disminuir la afinidad de la enzima por el NADP⁺ por la pérdida del puente de hidrógeno entre el OG de la Ser178 y el O2X del 2'-P del NADP⁺.

Mutación de la Arg210. Este residuo se cambió por Ala (que es el residuo que está presente en la mayoría de las ALDHs conocidas), con la intención de disminuir la afinidad de la enzima por el NADP⁺ por la pérdida de la interacción electrostática entre el NH1 de la R210 y el O1X del 2'-P del NADP⁺.

Mutaciones de la Arg40. Este residuo se cambió por Pro y por Ile, con la hipótesis de que estos cambios desestabilicen el conformero del E179 observado en el complejo PaBADH-NADP⁺ y considerando que el grupo carboxilo del Glu produciría una repulsión electrostática del fosfato del NADP⁺.

Mutación de la Ser208. Se cambió la Ser que es un residuo pequeño por un residuo más voluminoso, una Phe, esperando que impidiera que el Glu179 adquiriera la conformación observada en la PaBADH en complejo con NADP(H) (conformación NADP⁺-compatible).

Mutación del Glu211. Este residuo se cambió por Ala, para probar si la pérdida de la interacción entre la su carboxilo y la Arg40 afecta la unión de los nucleótidos.

A) Obtención y purificación de las enzimas mutantes

Las proteínas mutantes se obtuvieron por medio de PCR, se sobre-expresaron en la cepa Bl-21 pLys(S)-(DE3) (Agilent) y se purificaron a homogeneidad de acuerdo a Velasco-García et. al. (2006) (Figura 30A), con excepción de las enzimas mutantes E179P, S208F y R40I/S208F que adicionalmente se pasaron por una columna Mono-Q (GE). Se purificaron a homogeneidad las PaBADHs mutantes R40I, S178A, E179P, S208F, R210A, E211A y la R40I/S208F. Las mutantes R40P, K176E y S178D se obtuvieron en los cuerpos de inclusión de las bacterias y no se purificaron (Figura 30B); las mutantes K176A y G209D no presentaron actividad con ninguno de los dos nucleótidos y tampoco se purificaron.

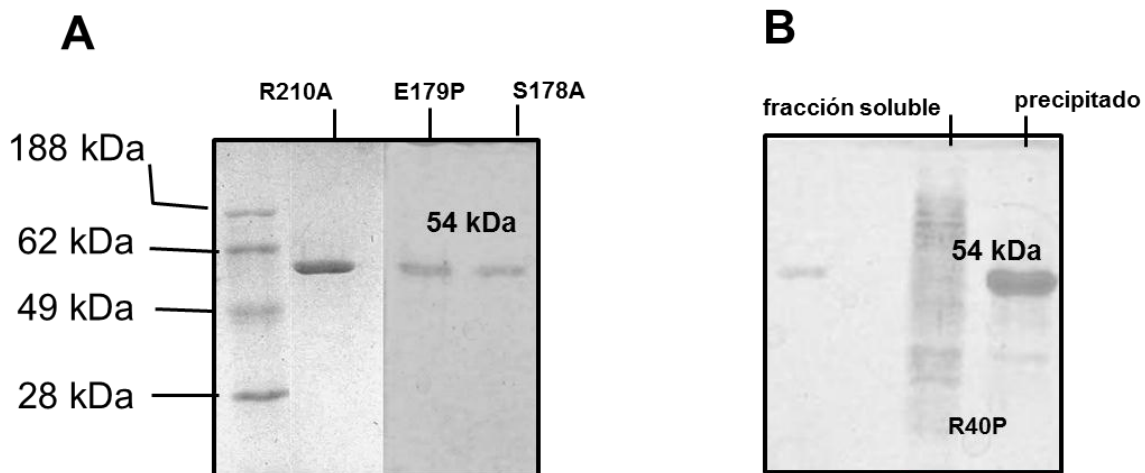


Figura 30. Gel de electroforesis en acrilamida-bisacrilamida(SDS-PAGE). Al 10 % y teñido con azul de Coomassie ®. (A) Fracciones puras de las enzimas mutantes R210A, S18A y E179P. Todas las proteínas mutantes obtenidas presentaron un patrón de electroforesis esencialmente

idéntico y por eso sólo se muestran el de estas enzimas. La masa relativa del monómero de las PaBADHs mutantes siempre resultó en la masa esperada. **(B)** Fracción soluble y precipitado de la enzima mutante R40P donde se muestra que la proteína se obtuvo en la fracción insoluble.

B) Caracterización cinética y unión del nucleótido al equilibrio de las enzimas mutantes

Las saturaciones con NAD(P)^+ de las enzimas silvestre y mutantes a concentraciones fijas variables de BAL presentaron un comportamiento hiperbólico y un patrón de velocidad inicial consistente con un mecanismo cinético secuencial Bi-Bi ordenado en estado estacionario o con un mecanismo Bi-Bi al azar en equilibrio rápido (Figura 31). Los datos obtenidos se ajustaron de forma global a la Ecuación 1 o 2, obteniéndose los parámetros cinéticos que se incluyen en la Tabla 3.

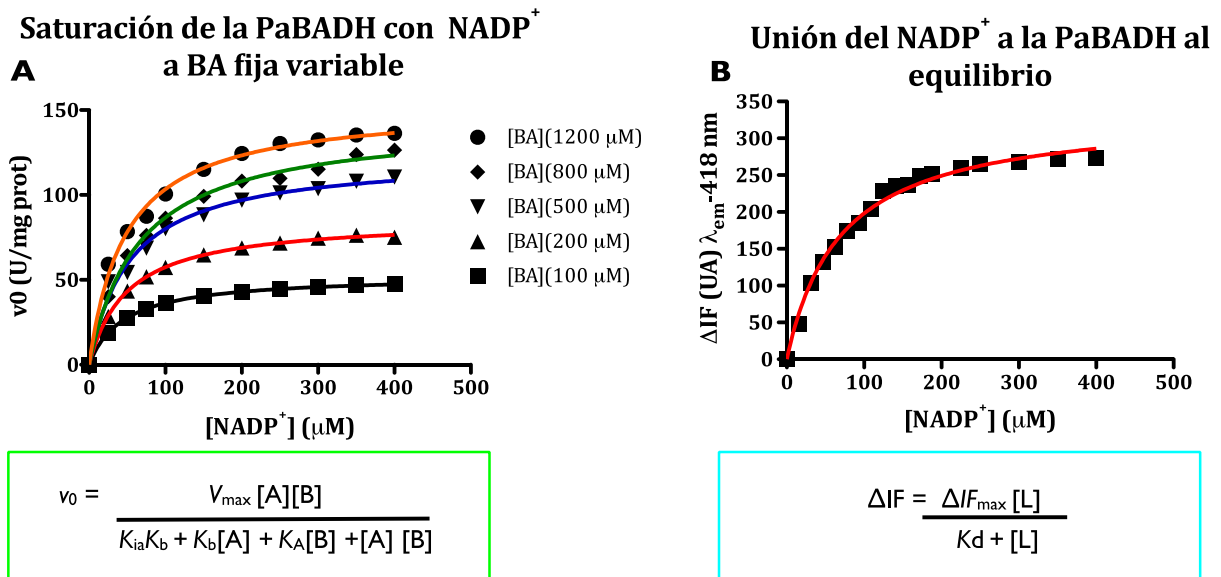


Figura 31. Caracterización bioquímica de la unión del nucleótido en la PaBADH (A) Patrones de velocidad inicial de la reacción de oxidación de BAL NADP^+ -dependiente NADP^+ . Se determinó la velocidad de la reacción a cada una de las concentraciones del nucleótido indicadas a concentraciones fijas variables de BAL. Las líneas son el resultado del mejor ajuste de forma global a los datos experimentales. Esencialmente todas las enzimas mutantes

presentaron familias de datos que se ajustaron de forma aceptable a la Ecuación 1 o 2 como mejor resultado. **(B)** Unión del nucleótido al equilibrio en la PaBADH silvestre. Los datos experimentales se ajustaron a la Ecuación 3.

La especificidad por la coenzima de las enzimas silvestre y mutantes se determinó por el valor de k_{cat}/K_a . Los cambios de las constantes de especificidad para el dinucleótido de las enzimas mutantes con respecto a la silvestre se expresan como el cociente entre las constantes de especificidad de la enzima silvestre y mutantes (Figura 32). Los cambios en la preferencia por el nucleótido con respecto a la que presenta la enzima silvestre se muestran en la Figura 33.

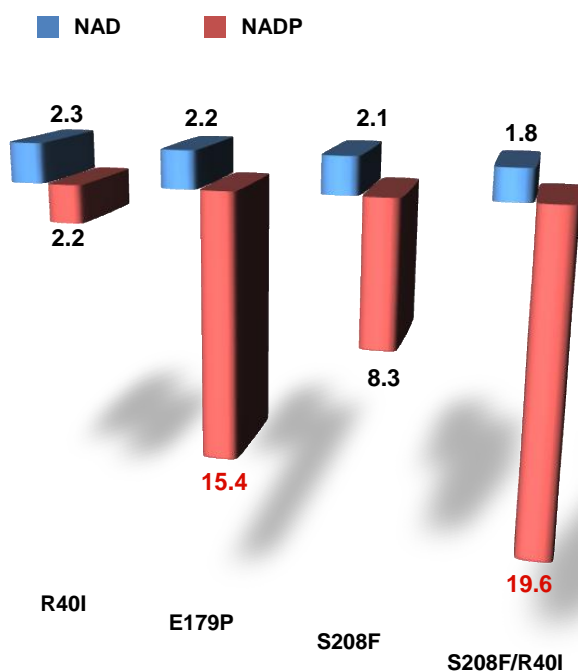


Figura 32. Cambios en la especificidad por el nucleótido con respecto a la especificidad de la enzima silvestre. Medida por el cociente de las constantes de especificidad (k_{cat}/K_a) de los nucleótidos de la enzima silvestre entre las de la mutante.

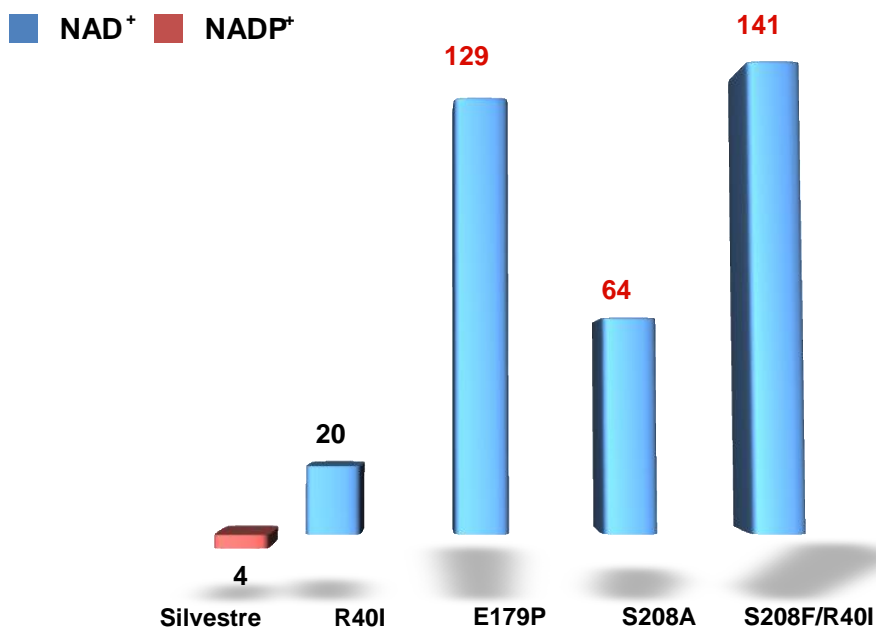


Figura 33. Cambios relativos en la preferencia por el nucleótido con respecto a la especificidad de la enzima silvestre. Los cambios se midieron evaluando el cambio en la especificidad por el nucleótido, medida por el cociente entre las constantes de especificidad (k_{cat}/K_a) para el NAD⁺ y las del NADP⁺ que presenta la enzima silvestre con respecto al NAD⁺, que es de cuatro veces las enzimas mutantes con respecto a la observada en la reacción de la enzima silvestre.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la reacción de oxidación de BAL NAD(P)⁺-dependiente.

Se midió la unión del NAD(P)⁺ a las PaBADHs silvestres y mutantes siguiendo los cambios de fluorescencia intrínseca (apagamiento) que producen los residuos de triptófanos. Los datos experimentales obtenidos y tratados de acuerdo a Velasco-García et al. (2000) se ajustaron a la Ecuación 3 o 4. Los valores de las K_d s obtenidas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Constantes de disociación para el NADP⁺ y el NAD⁺ de las enzimas silvestre y mutantes.

Mutación de la Arg40 por Ile. Este cambio produjo una disminución en la preferencia por el NADP⁺ y un aumento por la del NAD⁺. Aunque la k_{cat} de ambas reacciones aumentó, por una razón que desconocemos, los valores de K_{ia} , K_m y de K_d para ambos nucleótidos aumentaron, lo que resultó en un enzima menos eficientemente que la enzima silvestre.

Mutación de la Ser178 por Ala. En esta mutante la constante de especificidad para el NAD⁺ disminuyó casi tres veces mientras que para el NADP⁺ aumentó casi dos veces, es decir, que no sólo no estropeamos la especificidad para el NADP⁺ sino que obtuvimos una enzima con una preferencia por el NADP⁺ 12 veces más alta que la de la enzima silvestre. La K_d para el NADP⁺ y la K_{ia} son idénticas a las de la enzima silvestre, pero la K_d para el NAD⁺ es aproximadamente dos veces mayor que la de la enzima silvestre.

Mutación del Glu179 por Pro. Este cambio produjo una disminución en la afinidad de la enzima por el NADP⁺ de alrededor de cinco veces, medida por su cambio en la K_a y K_{ia} y una disminución de alrededor de seis veces en su k_{cat} , por lo que su especificidad por el NADP⁺ disminuyó aproximadamente 35 veces y la preferencia por este nucleótido cambió 140 veces con respecto a la de la enzima silvestre. En cuanto a la reacción NAD⁺-dependiente, se observó un aumento en su constante de especificidad de aproximadamente dos veces. A diferencia de los resultados obtenidos por los estudios de cinética, en los experimentos de unión al equilibrio se observó un aumento en los valores de K_d de ambos nucleótidos.

Mutación de la Ser208 por Phe. Esta mutación produjo una disminución de 8 veces en la constante de especificidad para el NADP⁺ y un aumento de 2 veces en la del NAD⁺. Esto llevó a un cambio de 64 veces en la preferencia por el nucleótido con respecto a la enzima silvestre. En

cuanto a la afinidad por el nucleótido se observó una disminución para el NADP^+ de 34 veces, medida por el cambio en su K_{ia} y K_a , comparada con una disminución de apenas dos veces en la afinidad del NAD^+ . Estos resultados apoyan la hipótesis de que residuos voluminosos en esta posición impiden que el Glu179 adopte la conformación NADP^+ -compatible.

Mutación de la Arg210 por Ala. A diferencia de las PaBADHs mutantes S178A y E179P esta mutación produjo un aumento de dos veces en la constante de especificidad por ambas coenzimas con respecto a la enzima silvestre. Al equilibrio se observaron constantes de disociación para el NADP^+ y el NAD^+ con valores de seis y de cuatro veces, respectivamente, por debajo de los de la enzima silvestre. Un resultado interesante es que la saturación de la enzima con NADP^+ , midiendo la unión al equilibrio, muestra una cinética sigmoideal (con un coeficiente de Hill de 2), lo que sugiere que el nucleótido se une de forma cooperativa (Figura 34).

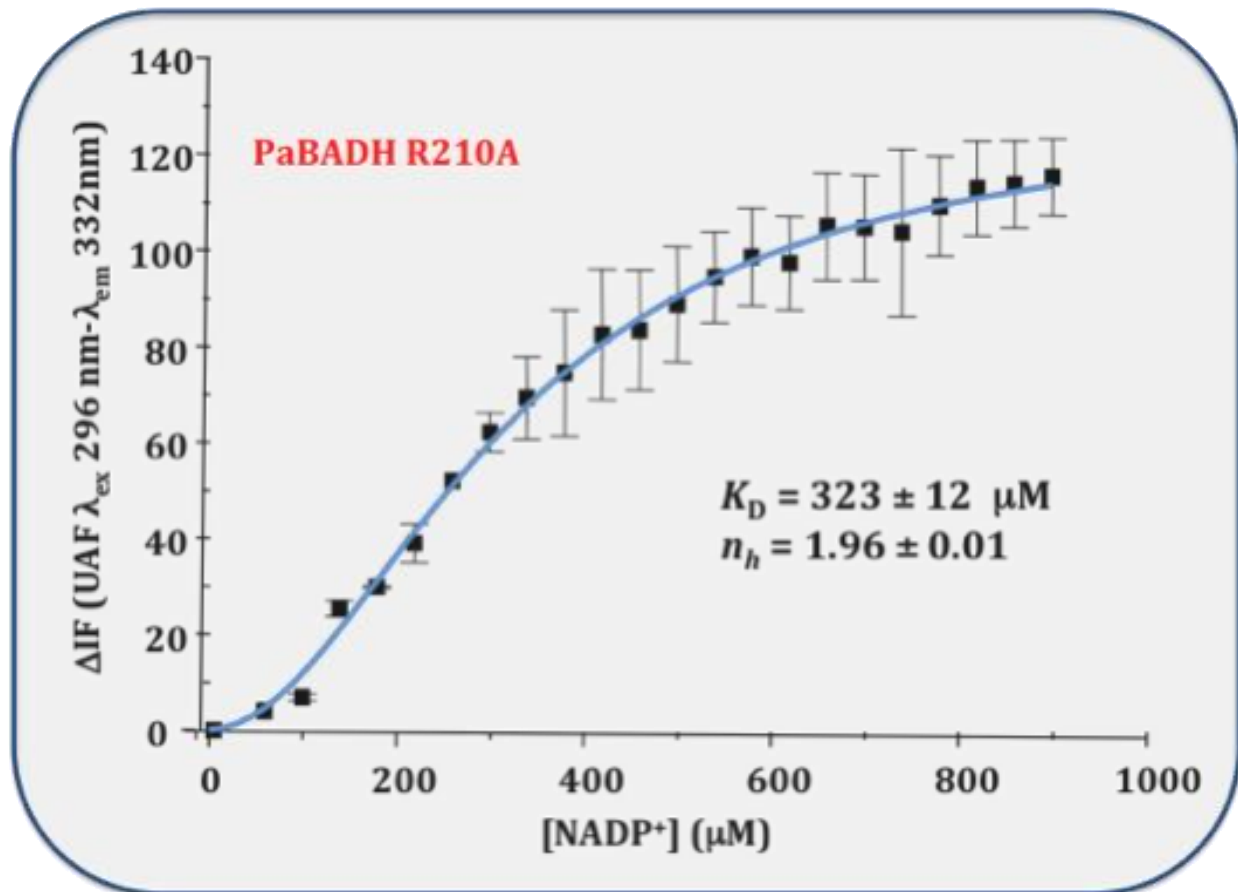


Figura 34. Unión del nucleótido al equilibrio en la PaBADH mutante R210A. Los datos experimentales se ajustaron a la Ecuación 4.

Mutación del Glu211 por Ala. En la mutante E211A se observó una disminución en la constante de especificidad para el NADP^+ y el NAD^+ . Este cambio se explica por una disminución en la K_a para ambos nucleótidos. La unión al equilibrio y los valores de K_{ia} sugieren que la afinidad para ambos nucleótidos disminuye modestamente, lo cual sugiere que este residuo participa en la unión de ambos nucleótidos.

Mutación de la R40I y S208F. En esta doble mutante se observó una disminución de la constante de especificidad del NADP^+ de 27 veces y un aumento en la del NAD^+ de dos veces, lo que llevó a un cambio en la preferencia por la coenzima de 200 veces con respecto a la enzima silvestre. Esta enzima es otro candidato para los estudios del papel de la reacción de la PaBADH dependiente del NADP^+ en la fisiología de la bacteria.

VIII.3.1.2 Unión de la región del mononucleótido de la nicotinamida del NAD(P)H

Como parte de la caracterización estructural de los residuos involucrados en la unión de los nucleótidos en la PaBADH y otras ALDHs, identificamos los residuos que participan en la unión del fosfato de la adenina mononucleótido y de la nicotinamida mononucleótido (Tabla 2) (Muñoz-Clares et al., 2011; Anexo 1 y Díaz-Sánchez et al., 2011; Anexo 3) y realizamos mutagénesis sitio dirigida de:

Trp152. Su anillo interacciona con el fosfato de la nicotinamida del NAD(P)^+ (Figura 35). Se encuentra muy conservado en las ALDHs y en una menor proporción se encuentra una Phe o una

Leu. Este residuo se cambió por Leu para evaluar su papel en la unión tanto del NAD^+ como del NADP^+ .

Thr233. Su grupo OH interacciona con el fosfato de la nicotinamida (Figura 35). Algunas ALDHs presentan una Arg en esta posición. Este residuo se cambio por Val para evaluar su papel en la unión tanto del NAD^+ como del NADP^+ .

Glu387. Su grupo carboxilo interacciona con los grupos OH de la ribosa de la adenina del NAD(P)^+ (Figura 36). Este residuo se cambio por Ala para evaluar su papel en la unión de la parte de la nicotinamida dentro del sitio activo.

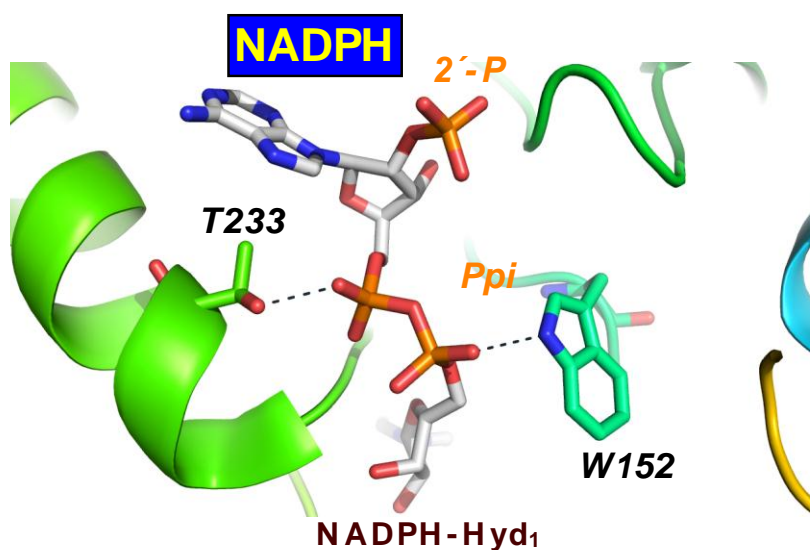


Figura 35. Unión del fosfato de la parte de la adenina y de la nicotinamida mononucleótido del NADPH en la PaBADH. Las líneas punteadas representan interacciones polares entre los residuos y los fosfatos del dinucleótido (PDB 2wox). La figura se hizo con Pymol (<http://www.pymol.org>)

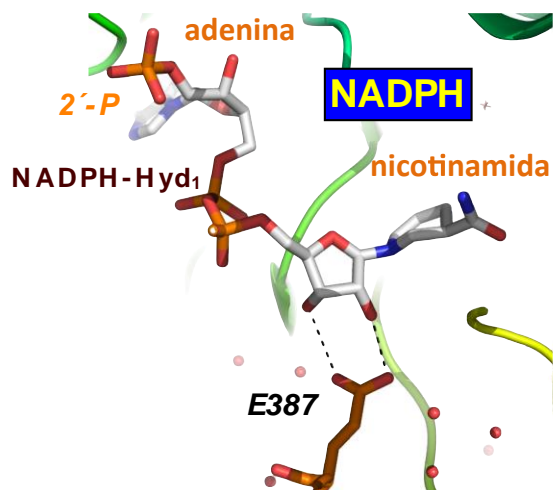


Figura 36. Unión del fosfato de la parte de la adenina y de la nicotinamida mononucleótido del NADPH en la PaBADH. Las líneas punteadas representan interacciones polares entre los residuos y los fosfatos del dinucleótido (PDB 3zqa). La figura se hizo con Pymol (<http://www.pymol.org>)

Evaluamos el papel del W152, de la T233 y del Glu87 en la unión de los nucleótidos realizando experimentos de cinética del estado estacionario de la reacción BADH y de unión al equilibrio del NAD(P)^+ .

La mutante T233V presentó una disminución en la constante de especificidad tanto para el NAD^+ como para el NADP^+ , mostrando una disminución en k_{cat} y un aumento en K_a . Experimentos de unión del nucleótido al equilibrio y los valores de K_{ia} confirmaron que este residuo es importante para la unión de los dos nucleótidos (Figura 37). Al respecto es importante mencionar que la T233 es un residuo muy conservado entre los miembros de la superfamilia de las ALDHs de las que se conoce su secuencia.

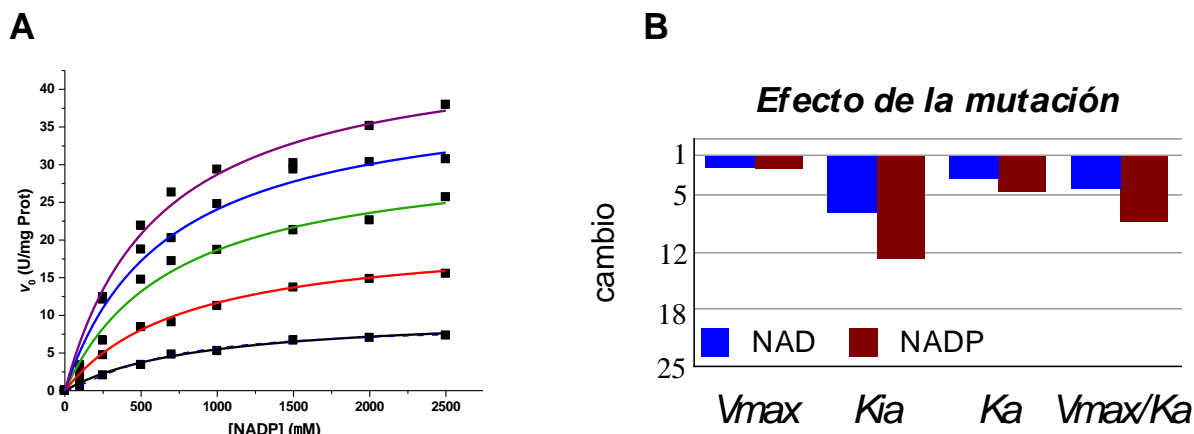


Figura 37. Caracterización bioquímica de la unión del nucleótido en la PaBADH mutante T233V (A) Patrones de velocidad inicial de la reacción de oxidación de BAL NADP^+ dependiente. Se determinó la velocidad de la reacción a cada una de las concentraciones del nucleótido indicadas a concentraciones fijas variables de BAL. Las líneas son el resultado del mejor ajuste de forma global a los datos experimentales. El patrón de velocidad inicial usando NAD^+ produjo una familia de datos que se ajustaron de forma aceptable a la Ecuación 1 como en el caso de (A). (B) Cambios en la especificidad por el nucleótido con respecto a la especificidad de la enzima silvestre. Medida por el cociente de las constantes de especificidad (k_{cat}/K_a) de los nucleótidos de la enzima silvestre entre las de la mutante.

La mutante W152L presentó una disminución en la afinidad por el NADP^+ , medida como K_{ia} y K_d , y en la constante de especificidad, con una disminución en k_{cat} y un aumento en K_a . Por el contrario a lo observado en la mutante T233V, la afinidad por el NAD^+ no se vio grandemente afectada. Por ejemplo, la K_{ia} del NADP^+ de la enzima mutante es 29 veces más grande que la de la silvestre mientras que para el NAD^+ este valor es 0.8 veces el de la silvestre (Figura 38). Igual que en el caso de la T233, el W152 es un residuo muy conservado tanto en las enzimas que usan al NAD^+ como en las que usan al NADP^+ , por lo que esperabamos que las afinidades por ambos

nucleótidos fueran igualmente afectadas. Estos resultados sorprendentes sugieren diferencias en los mecanismos de unión productiva (dinámica de la flexibilidad conformacional) del NAD^+ y del NADP^+ a la PaBADH y quizás también en otras ALDHs con la capacidad de usar eficientemente ambos nucleótidos.

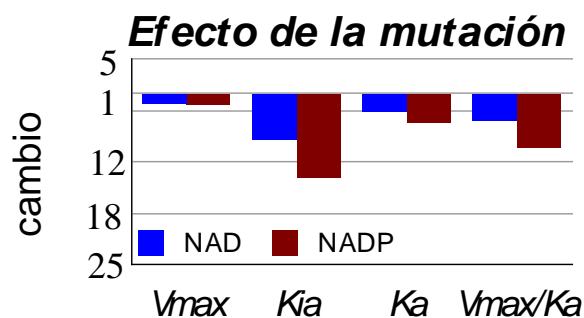


Figura 38. Caracterización bioquímica de la unión del nucleótido en la PaBADH mutante W152L. Cambios en la especificidad por el nucleótido con respecto a la especificidad de la enzima silvestre. Medida por el cociente de las constantes de especificidad (k_{cat}/K_{ia}) de los nucleótidos de la enzima silvestre entre las de la mutante. Los patrones de velocidad inicial que se obtuvieron se ajustaron de forma aceptable a la Ecuación 1 y en la gráfica se muestra el resumen de los cambios.

VIII.3.2. En la SoBADH

VIII.3.2.1 Unión de la región del mononucleótido de la adenina del NAD^+

Para extender el conocimiento de las bases estructurales de la especificidad por el NAD^+ , resolvimos la estructura tridimensional de la SoBADH en complejo con NAD^+ , por medio de cristalografía y difracción de Rayos X. Los detalles de la estadística de la difracción y del refinamiento de la estructura están descritos en Díaz-Sánchez et al. (2012; artículo anexo 4). Al igual que la PaBADH, la SoBADH presenta el residuo de Glu179, pero a diferencia de la

PaBADH, la SpBADH no presenta a Arg40 sino que en su lugar tiene Ala41 y en la posición equivalente a la Ser208 posee un la Leu, que es un residuo relativamente voluminoso, que impide al Glu179 de la SoBADH adquirir la conformación NADP⁺-compatible, lo que explica su baja afinidad por esta pareja de piridín nucleótidos (Figura 39). En la SoBADH el Glu179 interacciona con los hidroxilos 2' y 3' de la ribosa de la adenina del NAD⁺, de forma idéntica a como se ha observado en las deshidrogenasas dependientes de NAD⁺.

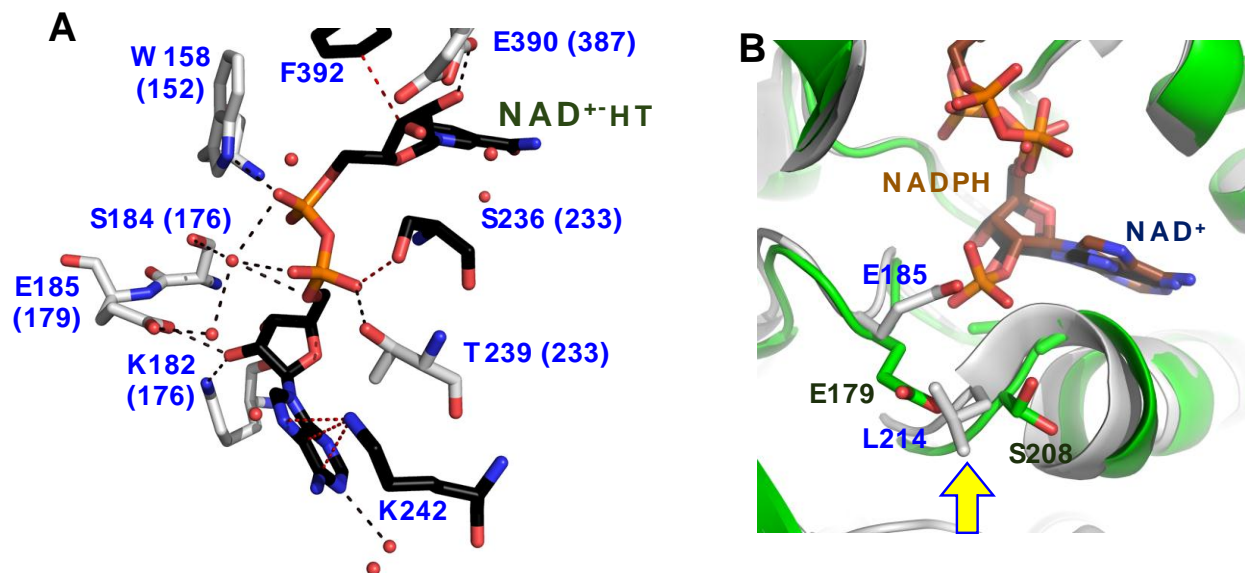


Figura 39. Unión del nucleótido en la SoBADH (A) Se muestran las interacciones polares (líneas discontinuas) entre la SoBADH y el NAD⁺ (código PDB 4a0m). La numeración corresponde a la SoBADH y entre paréntesis se etiquetaron las equivalentes en la PaBADH. El nucleótido oxidado se observó en la conformación de HT. **(B)** Comparación de las conformaciones del Glu179 en SoBADH y entre la paBADH. La flecha amarilla señala que la Leu214 evita que el Glu adquiera la conformación compatible con la unión del NADP⁺. La figura se hizo con Pymol (<http://www.Pymol.org>).

Estos resultados son completamente consistentes con las bases estructurales de la especificidad dual por el nucleótido que proponemos para la PaBADH. La SoBADH que es una enzima que

usa preferentemente al NAD^+ sobre al NADP^+ , es incapaz de catalizar la reacción de forma eficiente con el NADP^+ , debido a que el Glu179 sólo puede adoptar la conformación compatible con la unión del NAD^+ (Figura 39B). El impedimento estérico que produce la Leu (208) sobre la flexibilidad conformacional del Glu, sugiere que los residuos de comparable o mayor volumen en esta posición de enzimas NAD^+ -dependientes que presentan el Glu179 son responsables de la especificidad por el nucleótido y que las enzimas que presentan un residuo pequeño en esta posición y no presentan un residuo de Glu o Asp en la posición 40, son ALDHs con el potencial de tener especificidad dual. Esta hipótesis, es apoyada por datos bioquímicos de que aquellas enzimas que presentan la combinación de residuos compatibles (40,179 y 208) con la unión del NADP^+ (Mori et al., 2001; Cobesi et al., 1999; Inagaki et al., 2007;) y con aquellas enzimas que presentan al Glu179 y a un residuo voluminoso en la posición 208 y que son enzimas NAD^+ -dependientes (Feldman y Weiner, 1972; Valenzuela-Soto et al, 1993; Gruez et al., 2004).

El potencial electrostático superficial del subsitio de unión de la parte de la adenina y de la parte del pirofosfato (Figura 40) es aún más positivo que el potencial calculado para la PaBADH . La diferencia de este potencial podría dar cuenta de las diferencias de afinidad por los nucleótidos que existen entre la PaBADH y la SoBADH. En especial la hélice α_G presenta una carga residual positiva en su extremo amino-terminal que atrae al fosfato α del dinucleótido y un residuo de lisina, Lys-242, situado en el centro de la hélice que interacciona con el anillo de purina (Figura 40). En la PaBADH la Lys equivalente no se encuentra a distancia de interacción con el nucleótido.

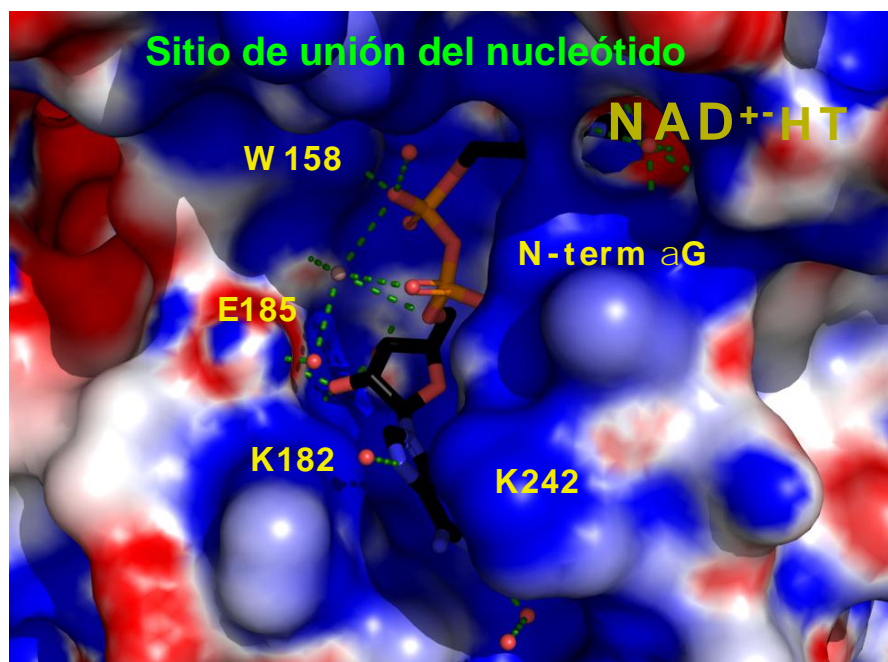


Figura 40. Potencial electrostático de la superficie del sitio de unión del nucleótido en la SoBADH. Los potenciales se calcularon con APBS usando el servidor(<http://kryptonite.nbc.net/pdb2pqr/>). La figura se hizo usando PyMol (<http://www.pymol.org>).

VIII.4. determinantes estructurales de la especificidad por la betaína aldehído en las BADHs

VIII.4.1 Identificación de los determinantes potencialmente involucrados en el reconocimiento de la BAL

Con el fin de profundizar en el entendimiento de las bases estructurales de la unión de los ω -aminoaldehídos en las BADHs resolvimos la estructura tridimensional de la de la enzima de espinaca (SpBADH). Los determinantes estructurales de la especificidad por el aldehído recientemente se publicaron en Díaz-Sánchez et al. (2012; Anexo 4), por lo que en esta sección sólo se describen brevemente. En la estructura tridimensional se observó que la Tyr160, el Trp167, el Trp285 y el Trp456 se encuentran en una disposición apropiada para realizar interacciones catión- π con el grupo trimetilamonio (TMA) de la BAL (Figura 41).

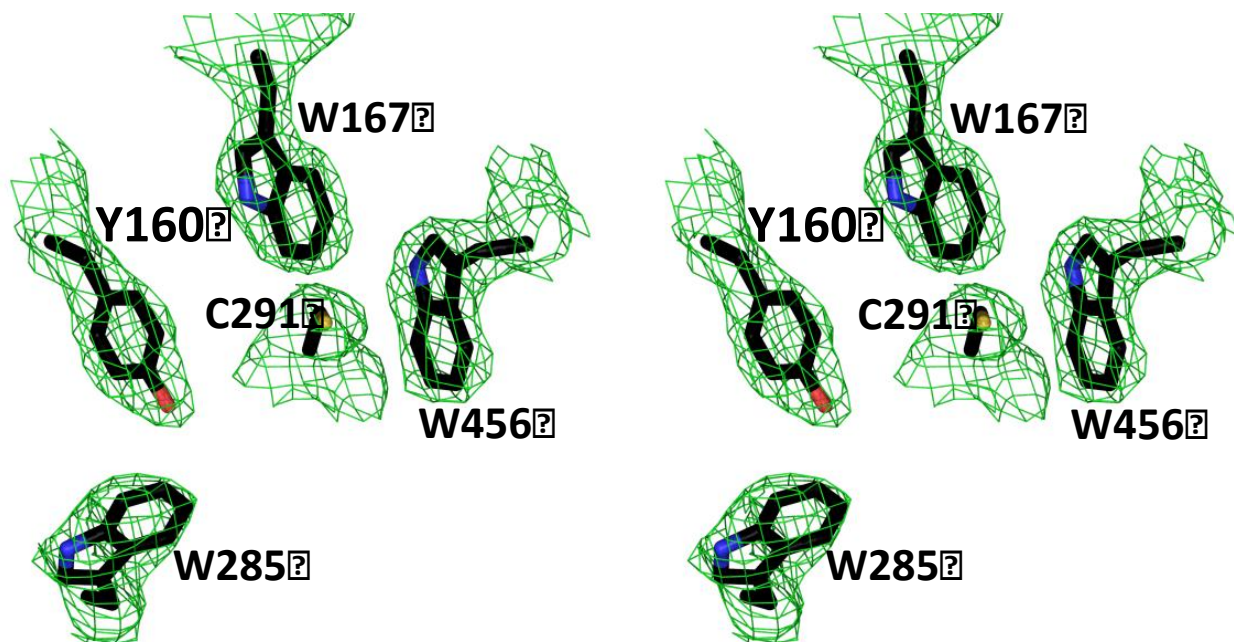


Figura 41. Vista en estéreo de los residuos aromáticos involucrados en la unión de BAL en la SoBADH. Se muestra el mapa 2Fo-Fc a 1 sigma de los residuos que forman la caja de aromáticos en el sitio potencial de la unión del aldehído. La figura se hizo con Pymol (<http://www.Pymol.org>).

Esta caja de aromáticos es muy similar estructuralmente hablando a lo que se observa en los sitios de reconocimiento de ligandos con grupos TMA con la BAL y la GB en algunas proteínas (Figura 42).

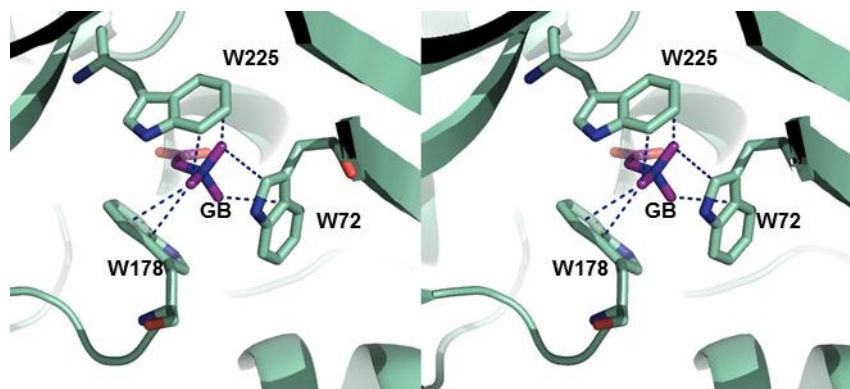


Figura 42. Vista en estéreo de los residuos aromáticos involucrados en la unión de GB en la proteína del transporte de GB. (código pdb) La figura se hizo con Pymol (<http://www.Pymol.org>).

El mapa de densidad electrónica del cristal (2Fo-Fc) de la SoBADH muestra claramente que los cuatro residuos aromáticos se encuentran formando una caja en el sitio activo. Cómo no es fácil obtener cristales de las ALDHs en complejo con el aldehído (Muñoz-Clares et al., 2011; anexo 1) no pudimos verificar por cristalografía que el grupo TMA de los sustratos de la SoBADH se unen en la caja de aromáticos, por lo que como primer paso para evaluar si esta caja participa en el reconocimiento del sustrato aldehído, realizamos modelaje de la unión de la BAL por medio de *docking* rígido como se describe en Díaz-Sánchez et al. (2012). Un modelo lo construimos usando como molde a los del intermediario tioéster construidos en la PaBADH (Figura 17) (Muñoz-Clares et al., 2011; Anexo 1) y al intermediario tioéster encontrado en la SmGAPN (PDB 3eds) y otro modelo del complejo, lo obtuvimos por medio de docking flexible usando el programa (Patchdock; <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>). En ambos modelos el grupo TMA de la BAL se encuentra rodeado de los cuatro residuos aromáticos a distancias de un intervalo de 3.2 a 4.2 Å, consistente con su participación en el reconocimiento de la BAL (Figura 43).

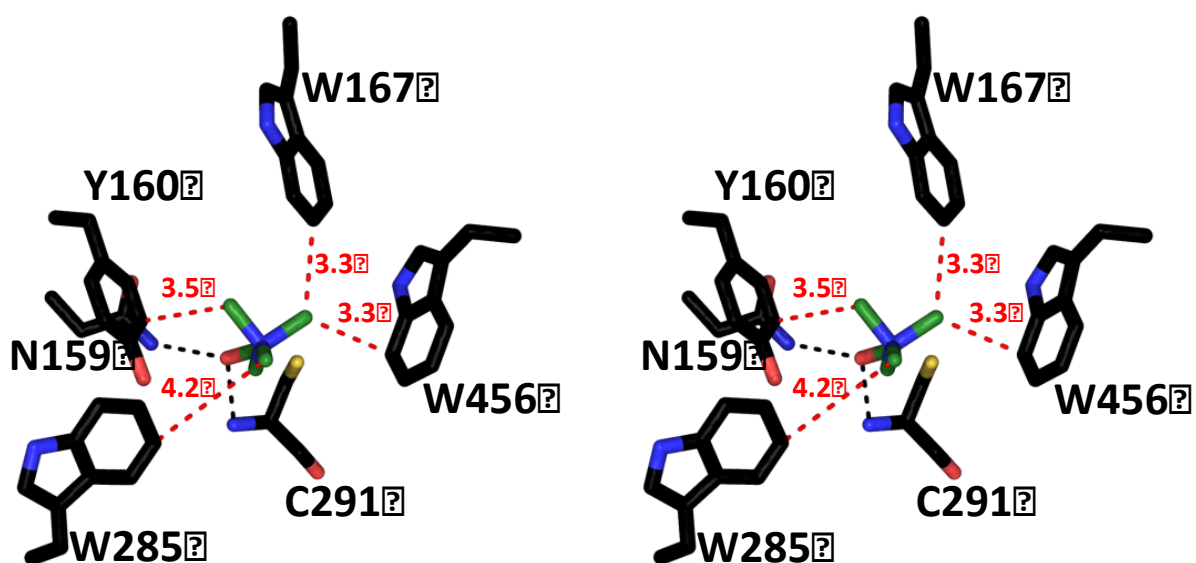


Figura 43. Vista en estéreo de los modelos de la molécula de BAL simulada en el sitio activo de la SoBADH. Se muestran la posición favorable del grupo trimetilamonio cuando el oxígeno del carbonilo se mantiene dentro del agujero del oxianión y el carbono carbonílico es trigonal. La figura se hizo con Pymol (<http://www.Pymol.org>).

En las ALDHs el sustrato aldehído entra por un túnel con forma irregular que se estrecha en la vecindad de la Cys catalítica (Figura 44). El potencial electrostático de la superficie de este túnel es claramente negativo, este potencial es aportado principalmente por residuos de Glu y Asp y los cuatro residuos aromáticos mencionados (Figura 44 y 45). Los electrones de los residuos aromáticos contribuyen a la unión del grupo TMA de la BAL por medio de interacciones π .

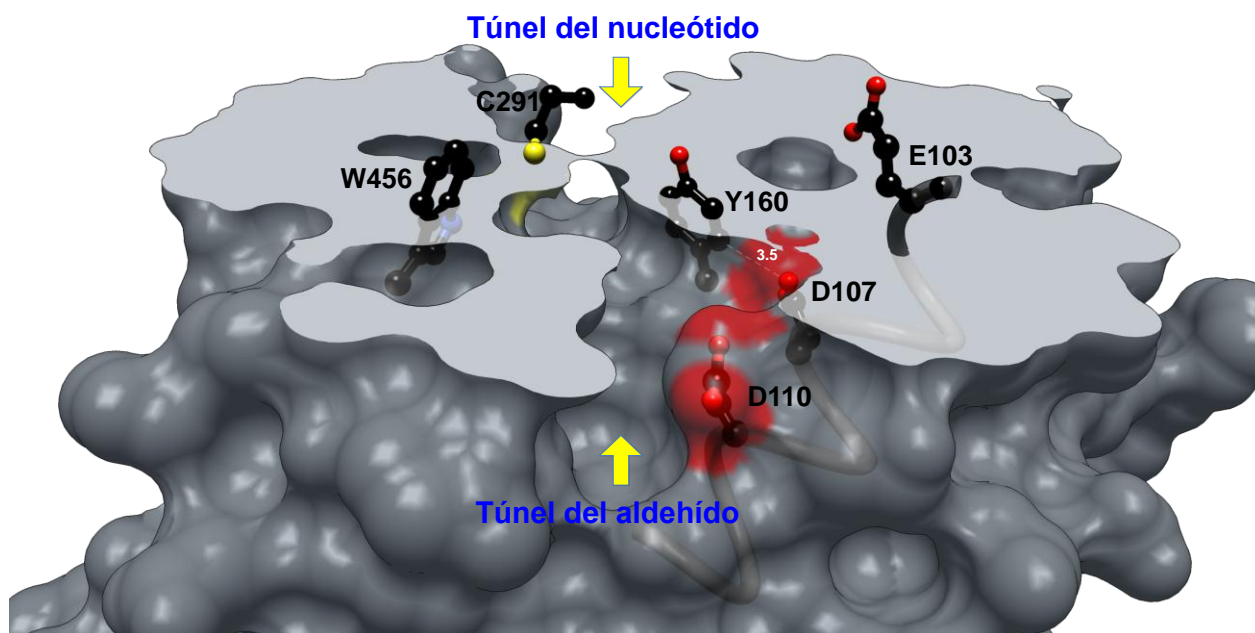


Figura 44. Sección de un monómero de la SoBADH mostrando el túnel del aldehído y la posición de algunos residuos relevantes. El Asp110 se encuentra en la superficie del comienzo del túnel, el carboxilo de la cadena lateral del Asp107 se encuentra a 3.5 Å de la cara positiva de la Tyr160. El Glu103 que era un residuo considerado como potencialmente crítico en el reconocimiento de los ω -aminoaldehídos. La figura se hizo con UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

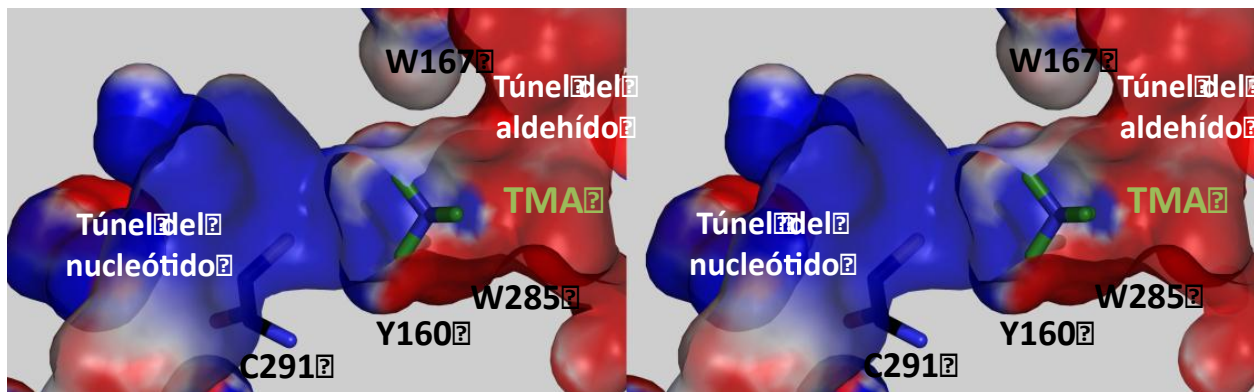


Figura 45. Sección del sitio activo de la SoBADH en donde se muestran los potenciales de superficie electrostática (210 kT/e, rojo; 10 kT/e, azul) de la entrada del túnel del aldeído y del nucleótido. La figura se hizo con UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

VIII.4.1 Papel de los residuos que forman la caja de los aromáticos en el sitio activo de la SoBADH

Para confirmar la participación de la Tyr160, del Trp167, Trp285 y Trp456 en el reconocimiento y la unión de BAL, cambiamos cada uno de estos residuos por alanina y medimos sus parámetros cinéticos por medio de métodos de estado estacionario (Figura 46 y Tabla 2 del anexo 4). Las enzimas mutantes presentaron un aumento significativo en la $K_m(\text{BA})$ y una disminución en la $V_{\max}/K_m(\text{BA})$, particularmente la mutante Y160A.

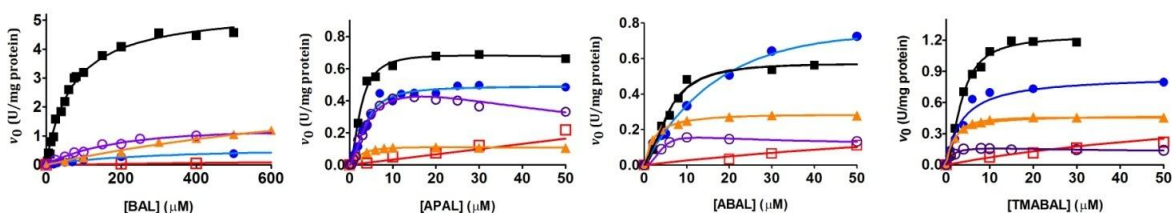


Figura 46. Curvas de saturación por ω -aminoaldehídos de la SoBADH. Silvestre (cuadrados negros) y las mutantes Y160A (cuadrados rojos), W167A (círculos azules), W285A (triángulos anaranjados), y W456A (círculos morados) con BAL, APAL, ABAL, y TMABAL como sustratos. Los ensayos se realizaron a pH 8.0 y con NAD fijo de 0.2 mM. Los puntos muestran los valores experimentales determinados, y las líneas que atraviesan estos puntos son las

calculadas del mejor ajuste de los datos por regresión no lineal a $v = V_{\max}[S](1 + \beta[S]/K_{IS})/\{K_m + [S](1 + [S]/K_{IS})\}$. Otros detalles experimentales se describen en Díaz-Sánchez et al. (2012)

La Tyr160 y el Trp456, los cuales están estrictamente conservados en las ALDHs 10 de plantas, determinan el espacio disponible para la unión del grupo voluminoso, el trimetilamonio de la BA. Las estructuras tridimensionales de las ALDHs 10 de plantas indican que el espacio se encuentra reducido en las ALDHs 10 que carecen de actividad BADH debido a que un residuo de isoleucina empuja al residuo Trp456 hacia la dirección de la Tyr160. En las ALDHs 10 que presentan actividad BADH, una alanina, Ala 441 en la SpBADH, o una cisteína en la posición equivalente a la Ile permiten el espacio adecuado para la unión de la BA (Figura 47). Consistentemente con lo anterior, la mutación de A441I produjo una disminución de la $V_{\max}/K_m(BA)$ de 200 veces mientras que la mutación A44AC no afectó significativamente este parámetro cinético (Figura 48 y 49, Tabla 3 del Anexo 4). La actividad con otros ω -aminoaldehídos no se vio afectada en las mutantes de la Ala, indicando que un residuo más grande en la segunda esfera de interacción del sustrato aldehído es responsable de la discriminación de la BA en las enzimas ALDDH10 de plantas.

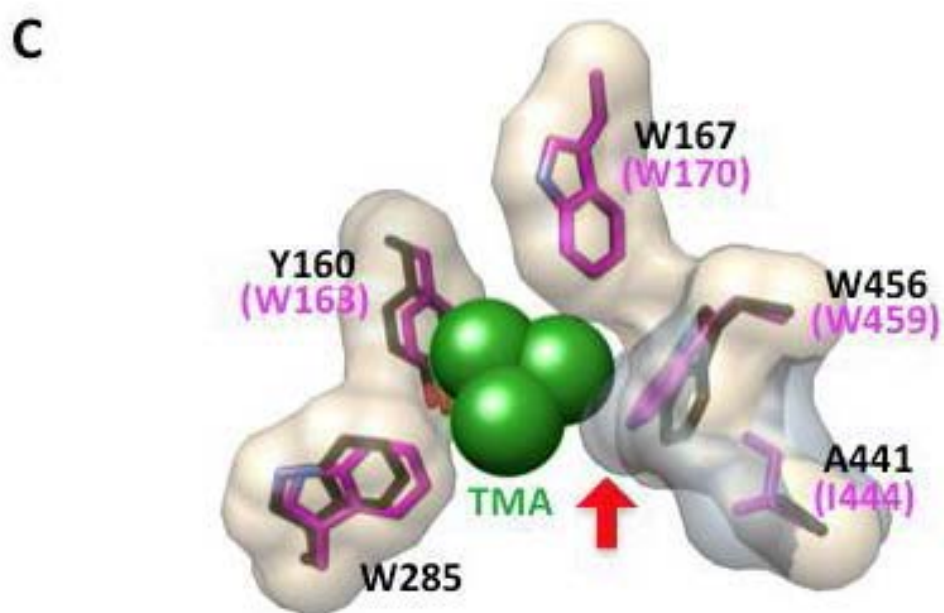
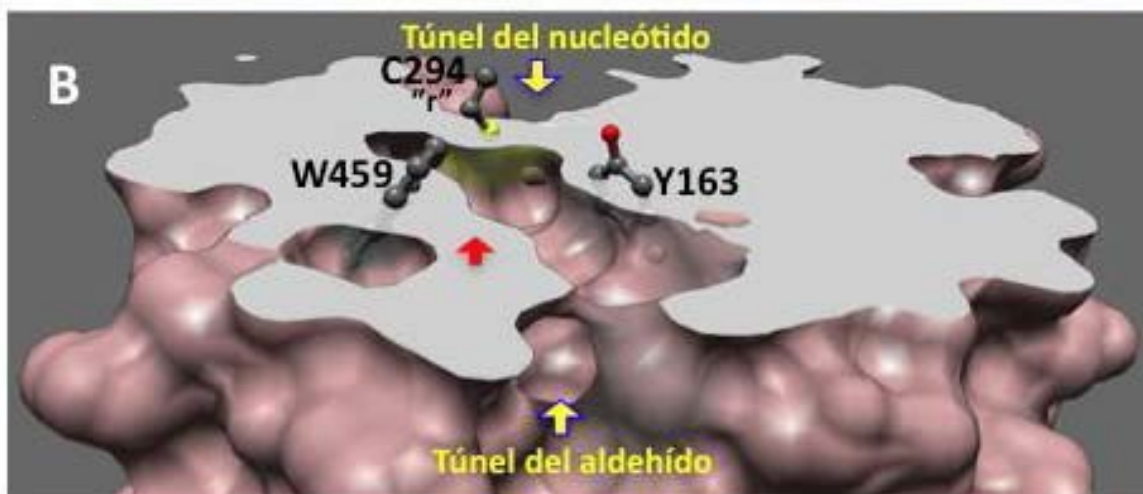


Figura 47. Sección de un monómero de la SoBADH mostrando el espacio donde se une el grupo TMA de la BAL. (A) En la SoBADH (pdb 4a0m) y en (B) en la AMADH-2 (pdb 3iwj), una ALDH10 que no usa BAL. La figura se hizo con UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

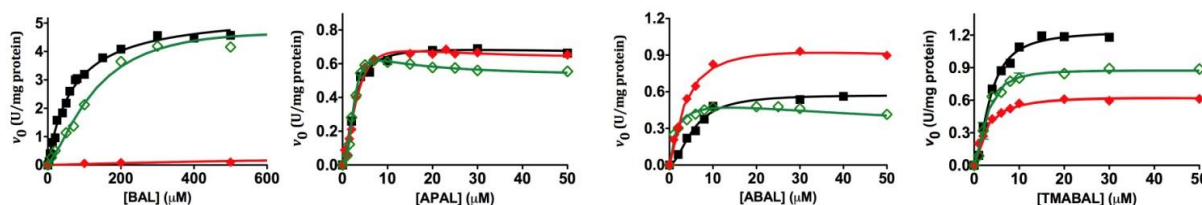


Figura 48. Curvas de saturación por ω -aminoaldehídos de la SoBADH. Silvestre (cuadrados negros) y las mutantes A441I (puntos rojos) y A441C (puntos verdes). Los ensayos se realizaron a pH 8.0 y con con NAD fijo de 0.2 mM. Los puntos muestran los valores experimentales determinados, y las líneas que atraviesan estos puntos son las calculadas del mejor ajuste de los datos por regresión no lineal a $v = V_{\max}[S](1 + \beta[S]/K_{IS})/\{K_m + [S](1 + [S]/K_{IS})\}$. Otros detalles experimentales se describen en Díaz-Sánchez et al. (2012)

Figura 49. Cambios en la especificidad por BAL de las mutantes de la Ala441 con respecto a la de la enzima silvestre. Mutante A441I (Barras rojas) y A441C (barras verdes). Medida por el cociente de las constantes de especificidad (k_{cat}/K_m)

IX. CONCLUSIONES

Aunque actualmente se conocen detalles estructurales y mecánicos de la reacción catalizada por las ALDHs hidrolíticas quedan por resolver muchos huecos en la acción enzimática de esta superfamilia de enzimas. En este trabajo de investigación logramos profundizar en el conocimiento del mecanismo de reacción, de las relaciones estructura-función y de la relevancia fisiológica de las betaína aldehído deshidrogenasas de *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) y de *Spinacia oleracea* (SoBADH). Estas contribuciones se pueden clasificar en tres aspectos:

(1) Papel de los nucleótidos de piridina reducidos en el mecanismo de la reacción catalizada y en la regulación de la actividad enzimática de la PaBADH

La revisión de todas las estructuras tridimensionales disponibles de las ALDHs en el PDB nos permitió sistematizar la información estructural en el contexto del papel de la dinámica del sitio activo de este grupo importante de enzimas. También encontramos que la dinámica conformacional del nucleótido reducido unido en el sitio activo de las ALDHs puede tener un significado mecánico muy importante en el paso de desacilación, no sólo en el caso de las enzimas que estudiamos en esta tesis, sino que los hallazgos pueden ser extensivos a las reacciones catalizadas por la mayoría de las ALDHs.

La detección del aducto covalente entre la PaBADH y el NADPH en el cristal nos permitió sugerir una participación de los nucleótidos reducidos en la estimulación del paso de desacilación, logrando proponer una explicación mecánica de la liberación ordenada de los productos y un posible mecanismo del control de la actividad de la PaBADH en la bacteria. La formación del aducto se da porque la coenzima reducida adopta en el sitio activo una conformación que no había sido antes observada en ninguna ALDH, la conformación *Hyd1*. En la

estructura cristalográfica del complejo PaBADH-NADPH, el grupo carboxamida de la nicotinamida del nucleótido reducido forma un puente de hidrógeno con el agua hidrolítica, lo que debe ayudar a la disminución del pK_a de esta molécula y así facilitar que pueda ceder un protón al glutámico catalítico y realizar el ataque nucleofílico que conducirá a la liberación del producto ácido de la reacción. Este importante papel, no conocido previamente, que proponemos juega el NAD(P)H en la reacción justifica y explica el mecanismo cinético conocido de las ALDHs, en el que el nucleótido reducido es el último producto que se libera a pesar de ser el primer producto que se forma. Cálculos teóricos del valor de pK_a del grupo carboxilo del Glu catalítico nos indicaron que éste está protonado a pH fisiológico, por lo que debe perder el protón antes de recibir el del agua catalítica. Proponemos que es el enlace peptídico al cual está unido por puente de hidrógeno el que recibe de forma transitoria el protón del Glu catalítico. En conjunto, nuestras observaciones explican por vez primera cómo puede llevarse a cabo la activación de la molécula de agua requerida en el paso de hidrólisis en las ALDHs, a pesar de lo difícil que es que un grupo carboxilo de $pK_a \sim 4.0$, el del glutámico catalítico, reciba un protón de una molécula de agua de $pK_a \sim 16.0$. La red de puentes de hidrógeno formada en el sitio activo, en la que interviene el nucleótido reducido, es la razón de la perturbación de estos valores de pK_a de manera que la transferencia del protón pueda llevarse a cabo eficientemente. Por tanto, proponemos que el NAD(P)H juega un papel crítico, no conocido previamente, en la catálisis de las ALDHs.

Con respecto al aducto de la enzima con NAD(P)H en disolución. Los datos cinéticos hasta ahora obtenidos son consistentes con un mecanismo de formación del aducto reversible y que involucra a la formación de un intermediario no covalente proteína-nucleótido. Este mecanismo es consistente con el mecanismo químico de formación y descomposición del aducto propuesto. La

formación de aductos NAD(P)H-Cys286 pudiera constituir un mecanismo por el cual la actividad de la PaBADH pueda ser transitoriamente disminuida si es más alta que la velocidad de las reacciones que utilizan el NAD(P)H, permitiendo la regeneración eficiente del NAD(P)⁺. Considerando la naturaleza reversible de la formación de los aductos NAD(P)H-Cys, la actividad de la PaBADH puede recuperarse cuando las concentraciones de NAD(P)H desciendan y las concentraciones de NAD(P)⁺ aumenten.

Nuestros modelos del intermediario tioéster y los cálculos teóricos, junto con el papel propuesto de la carboxiamida del nucleótido reducido en el mecanismo de las ALDHs apoyan la noción de que los cambios en las propiedades químicas de residuos o sustratos de la reacción, en este caso el Glu catalítico y la molécula de agua hidrolítica, pueden ser alcanzados en el ambiente del sitio activo de las enzimas por medio de cambios conformacionales, en este caso del Glu catalítico y del nucleótido reducido. Todavía existen numerosas preguntas con respecto al mecanismo de acción enzimática de las ALDHs, particularmente porque parece haber cierta variabilidad en los detalles mecanísticos entre las distintas enzimas. Estudio de dinámica molecular, simulaciones y experimentos de resonancia magnética nuclear serán de gran ayuda no solo para entender la información cristalográfica disponible sino para comprender de una forma más precisa el mecanismo enzimático de las ALDHs

(2) Características estructurales que determinan la especificidad dual de la enzima por el NAD⁺ y NADP⁺ de la PaBADH

Las estructuras tridimensionales de las ALDHs 10 de plantas indican que el espacio se encuentra reducido en las ALDHs 10 que carecen de actividad BADH debido a que un residuo de isoleucina empuja al residuo Trp456 hacia la dirección de la Tyr160. En las ALDHs 10 que

presentan actividad BADH, una alanina, Ala441 en la SpBADH, o una cisteína en la posición equivalente a la Ile permiten el espacio adecuado para la unión de la BA.

(3) los determinantes estructurales de la especificidad por la betaína aldehído (BAL) en la SoBADH. El estudio de estas dos enzimas, la PaBADH y la SoBADH, pertenecientes a distintas familias de las ALDHs, pero que catalizan la oxidación del mismo sustrato aldehído, nos ofreció una excelente oportunidad de ampliar el conocimiento de la acción enzimática de las ALDHs y de entender cómo pequeñas diferencias estructurales entre dos proteínas homólogas las lleva a desempeñar diferentes funciones fisiológicas.

El análisis de las estructuras cristalográficas así como los resultados de docking y de mutagénesis sitio-dirigida indican que la especificidad dual de la PaBADH por la coenzima se debe a que el E179 puede adoptar al menos dos conformaciones, una compatible con la unión del NADP⁺ y la otra con la del NAD⁺.

La especificidad dual por la coenzima en la PaBADH y probablemente en las ALDHs es determinada por las posiciones 179, 208 y 40. Para que un Glu en la posición equivalente a la 179 adopte la conformación compatible con la unión del NADP⁺ se requiere que exista un residuo pequeño en la posición equivalente a la 208. Además, esta conformación es favorecida por la presencia de un residuo cargado positivamente, como la Arg, en la posición equivalente a la 40.

El análisis de las estructuras cristalográficas así como los resultados de mutagénesis sitio-dirigida sugieren que la interacción polar entre el pirofosfato y el OG de la T233 es importante para la unión tanto del NAD⁺ como del NADP⁺ y probablemente para que éstos adquieran la conformación productiva de transferencia del hidruro. Por el contrario los resultados de la

mutación del W152 sugieren diferencias entre los dos nucleótidos oxidados en lo que respecta a su dinámica conformacional cuando se unen a la PaBADH.

X. REFERENCIAS

Arakawa T, Timasheff SN (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* 47: 411–414.

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

J. Bains, M.J. Boulanger, (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.

Baker NE, Moses K, Nakahara D, Ellis MC, Carthew RW, Rubin GM (1992) Mutations on the second chromosome affecting the *Drosophila* eye. *J. Neurogenet.* 8: 85-100.

Bostian KA, Betts GF (1978) Kinetics and reaction mechanism of potassium-activated aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 173: 787–798.

Bradbury LMT, Fitzgerald TL, Henry RJ, Jin Q, Waters DLE (2005) The gene for fragrance in rice. *Plant Biotech J* 3: 363-370-

Bubner P, Klimacek M, Nidetzky B (2008) Structure-guided engineering of the coenzyme specificity of *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase to enable efficient utilization of NAD(H) and NADP(H). *FEBS Lett.* 582:233–237.

Burnet M, Lafontaine PJ, Hanson AD (1995) Assay, purification, and partial characterization of choline monooxygenase from spinach. *Plant Physiol* **108**: 581-588

Byers, Meighen EA (1984) *Vibrio harveyi* aldehyde dehydrogenase. Partial reversal of aldehyde oxidation and its possible role in the reduction of fatty acids for the bioluminescence reaction. *JBC* 264: 7109.

Brauner F, Šebela M, Snégaroff J, Peč P, Meunier J-C (2003) Pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase: primary structure and active site residues. *Plant Physiol Biochem* **41**: 1-10

Clermont S, Corbier C, Mely Y, Gerard D, A. Wonacott A, G. Branlant G (1993) Determinants of Coenzyme Specificity in Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase: Role of the Acidic Residue in the Fingerprint Region of the Nucleotide Binding Fold. *Biochemistry* 32:10178-10184.

Cobessi D, Tête-Favier F, Marchal S, Azza S, Branlant G, Aubry A (1999) Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.* 290:161-73.

Corbier C, Clermont S, Billard P, Skarzynski T, Branlant C, Wonacott A, Branlant G (1990) Probing the coenzyme specificity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases by site-directed mutagenesis. *Biochemistry.* 29:7101-7106.

Courtenay ES, Capp MW, Anderson CF, Record Jr MT (2000) Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants *in vivo* and for the interpretation of “osmotic stress” experiments *in vitro*. *Biochemistry* **39**: 4455-4471.

Desplats C, Beyly A, Cuine S, Bernard L, Cournac L, Peltier G (2007) Modification of substrate specificity in single point mutants of *Agrobacterium tumefaciens* type II NADH dehydrogenase. *FEBS Letters* 581:4017–4022.

K. D'Ambrosio, A. Pailot, F. Talfournier, C. Didierjean, E. Benedetti, A. Aubry, G.

Branlant, C. Corbier, (2006) The first crystal structure of a thioacylenzyme intermediate in the ALDH family: new coenzyme conformation and relevance to catalysis, *Biochemistry* 45 2978–2986.

L. Di Constanzo, G.A. Gomez, D.W. (2007) Christianson, Crystal structure of lactaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli* and inferences regarding substrate and cofactor specificity, *J. Mol. Biol.* 366 481-493.

D'Souza-Ault MR, Smith LT, Smith GM (1993) Roles of N-acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl Environ. Microbiol.* 59: 473-478.

Diab F, Bernard T, Bazire A, Haras D, Blanco C, 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.

Eklund H, Horjales E, Brändén CI (1987) Comparison of computer modelling and X-ray results of the binding of a pyrazole derivative to liver alcohol dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 197: 685-694.

Endo S, Sanai M, Horie K, Matsunaga T, Ishikura S, Tajima K, El-Kabbani O, Hara A (2007) Characterization of rat and mouse NAD⁺-dependent 3 α /17 β /20 α -hydroxysteroid dehydrogenases and identification of substrate specificity determinants by site-directed mutagenesis. *Arch. of Biochem. Biophys.* 467:76–86.

Eppink MH, Bunthol C, Schreuder HA, van Berkel WJ. (1999) Phe161 and Arg166 variants of p-hydroxybenzoate hydroxylase. Implications for NADPH recognition and structural stability. *FEBS Lett.* 443:251-255.

- Eppink MH, Overkamp KM, Schreuder HA, Van Berkel WJ** (1999) Switch of coenzyme specificity of p-hydroxybenzoate hydroxylase. *J. Mol. Biol.* 292:87-96.
- Falkenberg P Strom AR** (1990) Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1034:253-259.
- Feldman RI, Weiner H**, (1972) Horse liver aldehyde dehydrogenase. II. Kinetics and mechanistic implications of the dehydrogenase and esterase activity. *J. Biol. Chem.* 247:267-272.
- Figuroa-Soto, C. G. and Valenzuela-Soto, E. M.** (2000) Kinetic study of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 596–603.
- Fitzgerald TL, Waters DLE, Henry RJ** (2009) Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. *Plant Biol* **11**: 119-130
- Fujiwara T, Horia 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 Plantarum* **134**: 22-30
- Glasner ME, Gerlt JA, Babbitt PC** (2006) Evolution of enzyme superfamilies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10:492-497.
- González-Segura L, Rudiño-Piñera E, Muñoz-Clares RA, Horjales E** (2009) The crystal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* provides new insight into the reaction mechanism and shows a novel binding mode of the 2'-phosphate of NADP⁺, and a novel cation-binding site. *J. Mol. Biol.* 385:542-557.
- Grabowska D, Chelstowska A** (2003) The ALD6 gene product is indispensable for providing NADPH in yeast cells lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *J. Biol. Chem.* 278:13984-13988.
- A. Gruez, V. Roig-Zamboni, S. Grisel, A Salomoni, C. Valencia, V. Campanacci, M. Tegoni, C. Cambillau**, (2004) Crystal structure and kinetics identify *Escherichia coli* YdcW gene product as a medium-chain aldehyde dehydrogenase, *J. Mol. Biol.* 343 29–41.

Hammen PK, Allali-Hassani A, Hallenga K, Hurley TD, Weiner H (2002) *Biochemistry*. **41**, 7156-68 (2002).

Hanson AD, May AM, Grumet R, Bode J, Jamieson GC, Rhodes D (1985) Betaine synthesis in chenopods: Localization in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 3678-3682

Hempel J, Wang BC (1997) The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold, *Nat. Struct. Biol.* **4**:317–326.

Ho KK, Weiner H (2005) Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the aldB gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**: 1067-1073.

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

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

Inagaki E, Oshima N, Sakamoto K, Babayeba ND, Kato H, Yokoyama S, Tahirov TH (2007) New insights into the binding mode of coenzymes: structure of *Thermus thermophilus* Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase complexed with NADP⁺, *Acta Crystallogr. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63**:2917-2929.

Johansson K, El-Ahmad M, Ramaswamy S, Hjelmqvist L, Jörnvall H, Eklund H (1998) Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci.* **87**:2106-2117.

John , Crennell SJ, Hough DW, Danson MJ, Taylor GL (1994) The crystal structure of glucose dehydrogenase from *Thermoplasma acidophilum*. *Structure* **2**: 385-393.

Julián-Sánchez A, Riveros-Rosasa H, Martínez-Castilla LP, Velasco-García R, Muñoz-Clares RA (2006) Phylogenetic and structural Relationships of the Betaine Aldehyde

Dehydrogenases. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*. Vol. 13. Weiner, H. (ed). Indianapolis, USA: Elsevier.

Jung JH, Lee SB (2006) Identification and characterization of *Thermoplasma acidophilum* glyceraldehyde dehydrogenase: a new class of NADP⁺-specific aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* 397:131-138.

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

Lessie TG, Phibbs PV Jr. (1984) Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annu. Rev. Microbiol.* 38:359-88.

Liu ZJ, Sun YJ, Rose J, Chung YJ, Hsiao CD, Chang WR, Kuo I, Perozich J, Lindahl R,

Livingstone JR, Maruo T, Yoshida I, Tarui Y, Hirooka K, Yamamoto Y, Tsutui N,

Hirasawa E (2003) Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*. *J Plant Res* 116: 133-140

Lunzer M, Miller SP, Felsheim R, Dean AM (2005) The biochemical architecture of an ancient adaptive landscape. *Science* 310:499-501.

Ma JF, Hager PW, Howell ML, Phibbs PV, Hassett DJ (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.

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

Moore SA, Baker HM, Blythe TJ, Kitson KE, Kitson TM, Baker EN (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 S, Heldin C -H, Claesson-Welsh L (1992) Ligand-induced polyubiquitination of the platelet-derived growth factor β -receptor. *J. Biol. Chem.* 267:6429–6434.

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

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

Muñoz-Clares RA, González-Segura L, Díaz-Sánchez AG (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.

Nakamura T, Yokota S, Muramoto Y, Tsutsui K, Oguri Y, Fukui K, Takabe T (1997) Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant J* **11**: 1115-1120

Nawasawa HT, Kawabata Y, Tani Y, Ogata K (1975) Choline dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* *Agr. Biol. Chem.* 39:1513-1514.

Nawasawa T, Kawabata Y, Tani Y, Ogata K (1976) Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* *Agr. Biol. Chem.* 40:1743-1749.

Oishi H, Ebina M (2005) Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *J Plant Physiol* **162**: 1077-1086

Pailot A, D'Ambrosio K, Corbier C, Talfournier F, Branlant G (2006) Invariant Thr244 is essential for the efficient acylation step of the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochem. J.* 400:521-530.

Perozich J, Kuo I, Wang BC, Boesch JS, Lindahl R, Hempel J (2000) Shifting the NAD/NADP preference in class 3 aldehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 267, 6197–6203.

S.J. Perez-Miller, T.D. Hurley, (2003) Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase, *Biochemistry* 42 7100–7109.

Pesin SR, Candia OA (1982) Acetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22:651-659.

Pire C, Esclapez J, Díaz S, Pérez-Pomares F, Ferrer J, Bonete MJ (2009) Alteration of coenzyme specificity in halophilic NAD(P)⁺ glucose dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *J. Mol. Catal. B-Enzymatic* 59:261-265.

E. Pohl, N. Brunner, M. Wilmanns, R. Hensel, (2002) The crystal structure of the allosteric nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeum *Thermoproteus tenax*, *J. Biol. Chem.* 277 19938-19945.

Rathinasabapathi B, Burnet M, Russell BL, Gage DA, Liao P-C, Nye GJ, Scott P, Golbeck JH, Hanson AD (1997) Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3454-3458

Rossman MG, Dino M, Olsen KW (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature* 250:194-199.

Sage AE, Vasil AI, Vasil ML (1997) Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* 23:43-56.

Šebela, M., Brauner, F., Radová, A., Jacobsen, S., Havliš, J., Galuszka, P. and Peč, P. (2000) Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **1480**: 329-341

Smith LT, Pocard JA, Bernard T, Le Rudulier D (1988) Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 170:3142-3149.

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

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.

Trossat C, Rathinasabapathi B, Hanson AD (1997) Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde and [omega]-aminoaldehydes. *Plant Physiol* **113**: 1457-1461

Tylichová, D. Kopečný, S. Moréra, P. Briozzo, R. Lenobel, J. Snégaroff, M. Šebela, (2010) Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes, *J. Mol. Biol.* 870-872.

Valenzuela-Soto EM, Muñoz-Clares R A (1993) Betaine-aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an Iso Ordered Bi Bi Steady State mechanism. *J. Biol. Chem.* 268:23818-23823. Erratum: (1994), *Ibid*, 269:4692.

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

Vasiliou V, Bairoch A, Tipton KF, Nebert DW (1999) Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* 9:421-434.

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

Velasco-García R, González-Segura L, Muñoz-Clares RA (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.

Wang, H. Weiner, (1995) Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis, *Biochemistry* 34 237–243.

Watanabe S, Saleh AA, Pack SP, Annaluru N, Kodaki T, Makino K (2007) Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase. *Journal of Biotechnology* 130:316–319.

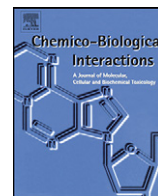
Weretilnyk E, Hanson A (1989) Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, *in vitro* translation of the mRNA, and regulation by salinity.

Wright JR, Clements JA (1987) Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136:426-444.

Wymore, T., Deerfield, D. W. and Hempel, J. (2007) Mechanistic implications of the cysteine-nicotinamide adduct in aldehyde dehydrogenase based on quantum mechanical/molecular mechanical simulations. *Biochemistry* **46**, 9495-506

Zeng Q, Du H, Zhai Z, Lin X, Lin Y (2008) Mutational research on the role of lysine 21 in the *Pichia stipitis* xylose reductase. *Chin. J. Biotech.* 24:1108-1111.

Zhu G, Golding GB, Dean AM (2005) The selective cause of an ancient adaptation. *Science* 307, 1279-1282.



Crystallographic evidence for active-site dynamics in the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. Implications for the deacylation step of the catalyzed reaction[☆]

Rosario A. Muñoz-Clares^{*}, Lilian González-Segura, Ángel G. Díaz-Sánchez

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

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 30 December 2010

Keywords:

Conformational flexibility
Oxyanion hole
Carboxamide hole
Carboxyl hole
Hydrolytic water
Theoretical pK_as
Peptide bond protonation

ABSTRACT

The overall chemical mechanism of the reaction catalyzed by the hydrolytic aldehyde dehydrogenases (ALDHs) involves three main steps: (1) nucleophilic attack of the thiol group of the catalytic cysteine on the carbonyl carbon of the aldehyde substrate; (2) hydride transfer from the tetrahedral thiohemiacetal intermediate to the pyridine ring of NAD(P)⁺; and (3) hydrolysis of the resulting thioester intermediate (deacylation). Crystal structures of different ALDHs from several organisms—determined in the absence and presence of bound NAD(P)⁺, NAD(P)H, aldehydes, or acid products—showed specific details at the atomic level about the catalytic residues involved in each of the catalytic steps. These structures also showed the conformational flexibility of the nicotinamide half of the cofactor, and of the catalytic cysteinyl and glutamyl residues, the latter being the general base that activates the hydrolytic water molecule in the deacylation step. The architecture of the ALDH active site allows for this conformational flexibility, which, undoubtedly, is crucial for catalysis in these enzymes. Focusing in the deacylation step of the ALDH-catalyzed reaction, here we review and systematize the crystallographic evidence of the structural features responsible for the conformational flexibility of the catalytic glutamyl residue, and for the positioning of the hydrolytic water molecule inside the ALDH active site. Based on the analysis of the available crystallographic data and of energy-minimized models of the thioester reaction intermediate, as well as on the results of theoretical calculations of the pK_a of the carboxyl group of the catalytic glutamic acid in its three different conformations, we discuss the role that the conformational flexibility of this residue plays in the activation of the hydrolytic water. We also propose a critical participation in the water activation process of the peptide bond to which the catalytic glutamic acid in the intermediate conformation is hydrogen bonded.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The hydrolytic aldehyde dehydrogenases (ALDHs) catalyze the irreversible NAD(P)⁺-dependent oxidation of aldehydes to their corresponding acids using covalent and general base catalysis. The overall chemical mechanism of the ALDH-catalyzed reaction involves three main steps (Scheme 1) [1]: (1) the nucleophilic

attack of the catalytic cysteine, Cys302¹ on the carbonyl carbon of the aldehyde, which forms a tetrahedral hemithioacetal intermediate covalently bound to the enzyme; (2) the hydride transfer from the tetrahedral hemithioacetal to the pyridine ring of NAD(P)⁺ (oxidation), which produces a thioester intermediate; and (3) the nucleophilic attack of a water molecule on the thioester (deacylation), which produces a second tetrahedral intermediate and results in the release of the acid product of the reaction. It is well accepted that Glu268 is the general base that activate the hydrolytic water [2–5]. Residues Cys302, Glu268 and Asn169—the latter being part of the oxyanion hole involved in polarization of the carbonyl group of the aldehyde substrate and stabilization of the reaction intermediates covalently bound to the enzyme [6,7]—are strictly conserved among the ALDH proteins with dehydrogenase activity.

Crystal structures of different ALDHs from several organisms have been determined in the absence and presence of bound NAD(P)⁺, NAD(P)H, aldehydes, or acid products, and specific details

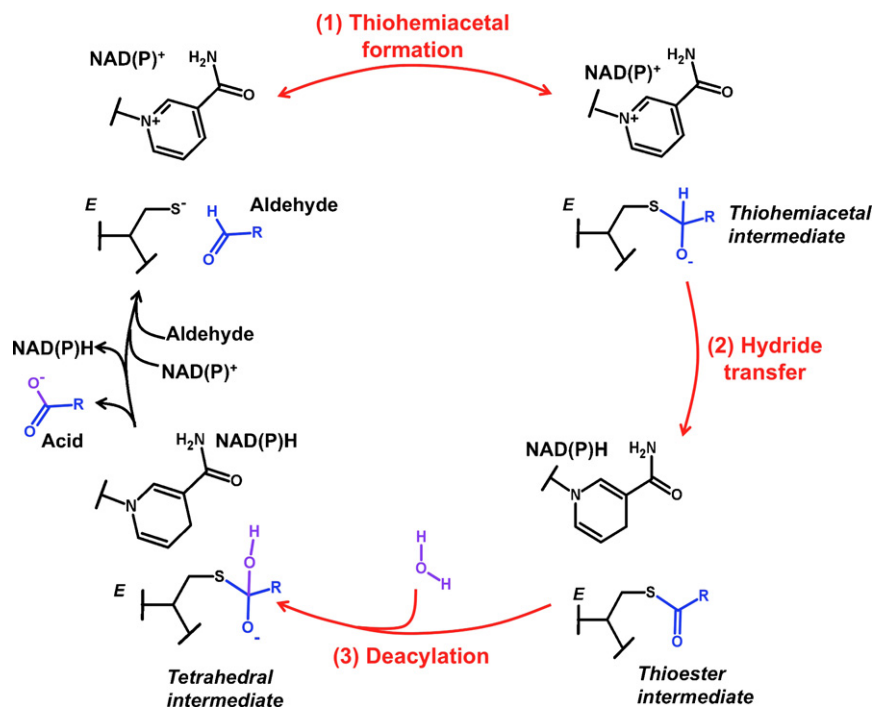
Abbreviations: ALDH, aldehyde dehydrogenase; FDH, 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase; BnALDH, ALDH from *Bartonella henselae*; PaBADH, betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*; PDB, Protein Data Bank; SmGAPN, non-phosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*; SaBADH, betaine aldehyde dehydrogenase from *Staphylococcus aureus*; TtP5CDh, Δ¹-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*; Wat, water.

[☆] This article is dedicated by the authors to Dr. Henry Weiner, who made extensive and seminal contributions to the knowledge of aldehyde dehydrogenases, and had a major impact on our scientific careers as the organizer of the Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism Meeting.

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

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

¹ Unless indicated, numbers of the residues correspond to those of ALDH2.



Scheme 1. Minimal chemical mechanism of the dehydrogenase reaction catalyzed by the hydrolytic ALDHs.

at atomic level about the residues involved in each of the steps of the catalytic mechanism have been obtained. It was soon realized that the ALDH proteins do not undergo major conformational changes upon binding of the cofactors [6], but that there is conformational flexibility of the nicotinamide half of the cofactor [8,9], the catalytic Cys302 [10–14], the catalytic Glu268 [12–16], and the peptide bond between Leu269 and Gly270 [13,14]. Undoubtedly, this dynamic component is crucial for the catalysis of ALDH enzymes. The oxidized cofactors, NAD(P)⁺, productively bind in the conformation

that allows the oxidation of the substrate (the “hydride transfer” conformation) [6,9–11,13,14,17–19], whereas the reduced cofactors, NAD(P)H, bind in different conformations that allow the deacylation step (the “hydrolysis” conformations) [9,13,20–22]. Cys302 has been found in two conformations (Fig. 1): one far from the carbonyl carbon of the bound aldehyde [10,12–15,23,24], which we called the “resting” conformation [15], and another close to this carbon in the correct position to perform the nucleophilic attack [6,12–14,17,21,23], which we called the “attacking” conformation

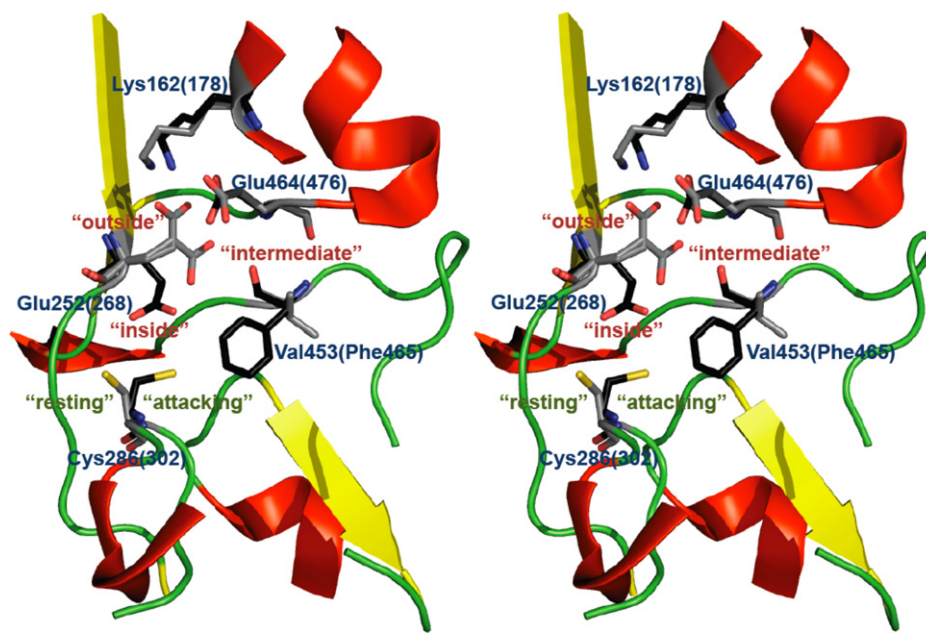


Fig. 1. Stereoview of the ALDH active sites showing the distinct conformations of the catalytic Cys (resting and attacking) and catalytic Glu (inside, intermediate and outside) residues. The coordinates of PaBADH in complex with NADP⁺ (2WME) were used in this figure. Numbers of the residues correspond to PaBADH and those within parenthesis to ALDH2. The attacking conformation of the catalytic Cys302, the inside conformation of Glu268, and the side-chain of Phe476 are those in the crystal structure of ALDH2 in complex with NADH (1O02). Side-chain atoms of active site residues are shown as sticks and color coded (PaBADH carbon grey, ALDH2 carbon black, nitrogen blue, sulfur yellow, and oxygen red). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

[15]. Glu268 has been observed in three stable conformations (Fig. 1) that we named: “inside” [9,12–14,16,21,23], “intermediate” [6,8,9,14–17,18,19,25,26], and “outside” [15]. The inside conformation is sterically incompatible with the bound oxidized cofactor; it has been proposed that in this conformation Glu268 can activate Cys302 for the nucleophilic attack, since the carboxyl group is close to the thiol [8,12,14]. The intermediate conformation is sterically compatible with the oxidized cofactor; it is thought to be the one suited for the activation of the hydrolytic water molecule [6,14,15]. In the outside conformation, Glu268 releases the proton that has previously taken, from either the catalytic Cys or the hydrolytic water, through a proton relay mechanism involving Glu476 and Lys178 [15]. Whereas it appears that the inside and intermediate conformations of Glu268 could exist in every ALDH, the outside conformation could exist at least in those enzymes that have Lys178, which is present in about 80% of the known sequences.

Based on the analysis of the available crystallographic data and of energy-minimized models of the thioester reaction intermediate, as well as on the results of theoretical calculations of the pK_a of the carboxyl group of the catalytic Glu in its three different conformations, here we discuss the role that the conformational flexibility of Glu268 plays in the deacylation step of the ALDH-catalyzed reaction. We also propose a critical participation in the water activation process of the peptide bond to which the catalytic Glu in the intermediate conformation is hydrogen bonded.

2. Methods

The structures of the intermediate thioester of glycine betaine or of glutamate were modeled into the active site of the PaBADH crystal structure (Protein Data Bank accession code 2WME²) or of the TtP5CDh crystal structure (1UZB), respectively, using the 3-phosphoglycerate thioester of the SmGAPN structure (2ESD) as template. Energy minimizations were performed using the Swiss PDB Viewer module for GROMOS 96 force field potential [27]. The convergence criterion was a value of 0.05 kJ/mol for the averaged derivative. Theoretical calculations of pK_a values of side-chain groups were carried out using the program PROPKA [28,29] and the crystal coordinates of two ALDH2 structures (1002, 1000), betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) (2WME), or Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* (TtP5CDh) (1UZB). When there was no available crystal structure of any of these enzymes with the desired conformation of the catalytic Glu268, the conformation was modeled *in silico* and then energy-minimized before performing the pK_a calculations. Figures were generated using PyMOL [30].

3. Results and discussion

3.1. Binding regions relevant for active-site dynamics in ALDHs

One interesting aspect of the ALDHs active-site architectures is that there are three binding regions or “holes”—formed by hydrogen-bond donor or acceptor protein atoms—that participate in the stabilization of the aldehyde substrate or cofactors, of reaction intermediates, or of particular conformations of the catalytic residues. In this way, these regions play critical roles in catalysis and active site-dynamics.

First, there is the “oxyanion hole” formed by two hydrogen-donor nitrogen atoms: that of the main-chain NH group of the catalytic Cys and that of the side-chain NH₂ of the essential Asn169 (Fig. 2A) [6]. In the free enzyme, the oxyanion hole is occupied by

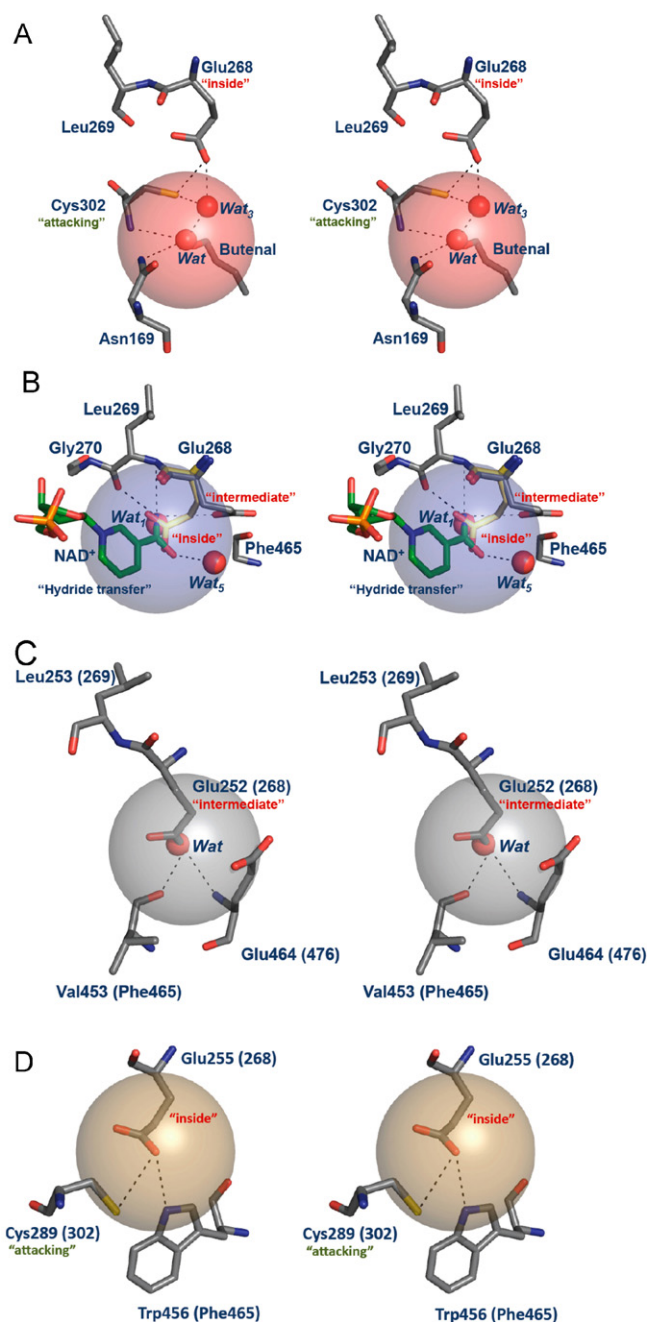


Fig. 2. Stereoviews of binding regions, depicted as colored spheres of 2.5 Å of radius, in the active site of ALDHs. (A) Oxyanion hole. The atoms of active site residues are those in the ALDH2 structure 1002; the butenal molecule is that in the ALDH2 structure 1001; the water in the oxyanion hole is that in the ALDH2 1004; and Wat3 is the water molecule in the TtP5CDh 1UZB. (B) Carboxamide hole. The atoms of active site residues are those in the ALDH2 1001, with the exception of the side-chain of Glu268 in the inside conformation which is that in the ALDH2 1002; the nicotinamide half of the NAD⁺ molecule in the hydride transfer conformation is that in the ALDH2 1004; Wat1 and Wat5 are those in the ALDH2 structures 1001 and 1004, respectively. (C) Intermediate-carboxyl hole. The crystal coordinates of PaBADH in complex with NADP⁺ (2WME) were used in this figure, with the exception of the water molecule that is the one in the ALDH2 crystal 1002. The numbers of the residues in ALDH2 are given within parenthesis. (D) Inside-carboxyl hole. The crystal coordinates of BADH from *Staphylococcus aureus* (SaBADH) in complex with NADH (3FG0) were used. The numbers of the residues in ALDH2 are given within parenthesis. Atoms are shown as sticks and color coded (carbon grey, nitrogen blue, sulfur yellow, and oxygen red). Hydrogen bonds are shown as dashed black lines. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

² Only the PDB accession-code numbers will be given hereafter.

either a water molecule [13] or the hydroxyl group of a molecule from the crystallization medium [15]. The proposed role of the oxyanion hole is the stabilization of the oxyanion or hydroxyl oxygen of the thiohemiacetal intermediate of the reaction [6], but during the catalytic cycle it is also consecutively occupied by the oxygen atoms of the aldehyde substrate [9,23], of the thioester [20], of the second tetrahedral intermediate, and of the acid product [13]. The oxyanion hole, therefore, is also involved in the binding and precise positioning of the aldehyde substrate for the nucleophilic attack. The ALDHs differ in this respect from the serine proteases, in which the oxyanion hole plays a critical role in stabilization of the tetrahedral intermediate while it is not so important for binding of the substrate [31]. Moreover, the oxyanion hole also plays a role in the deacylation step because the carbonyl oxygen of the thioester intermediate remains bound inside the hole forcing the carbonyl carbon to undergo a significant movement with respect to its position in the hemithioacetal intermediate when this carbon changes from tetrahedral to trigonal. An energy-minimized model² of the thioester intermediate with NADP⁺ bound in the hydride transfer conformation (not shown) indicates that the clash of the thioester carbonyl carbon with the pyridine ring triggers the displacement of the cofactor towards the hydrolysis conformation, thus allowing for the entering of the hydrolytic water molecule into the active site. Also, in the apo-form of the enzyme, this hole may contribute to the stabilization of the inside conformation of the catalytic Glu268, whose OE1 is hydrogen bonded to the water in the oxyanion hole through an intervening water molecule (which we call *Wat3*, see below). It was proposed that *Wat3* is the nucleophile in the deacylation step in the (TtP5CDh) [13].

Second, there is the region, which we name the “carboxamide hole”, where the carboxamide group of NAD(P)⁺ binds (Fig. 2B). This region contributes to the correct binding of the oxidized nicotinamide for hydride transfer. It is formed by protein atoms that form hydrogen bonds with the carboxamide NH₂: the main-chain carbonyl oxygen and NH of Leu269 and the main-chain carbonyl oxygen and OE1 of Glu268 in the intermediate conformation. All of these interactions are possible, but not all of them can be formed simultaneously because a NH₂ group cannot be the donor in three hydrogen bonds. The main-chain NH of Gly270 forms part of the carboxamide hole when there is a flip of the peptide bond between Leu269 and Gly270; the carboxamide nitrogen is then hydrogen bonded to the NH of Gly270 rather than to the carbonyl oxygen of Leu269. The carboxamide hole also contributes to the stabilization of the inside conformation of the catalytic Glu, whose OE1 occupies the position of the carboxamide O7N of NAD(P)⁺ in apo or apo-like crystals—i.e., in those in which the nicotinamide moiety is out of the region of the active site where the catalytic residues are—or in holo crystals in which the nicotinamide of the reduced cofactor is in a hydrolysis conformation (for instance see 1O02, 1O05, 1NZW, 1NZZ, 1WNB, 3FG0). Obviously, the catalytic Glu cannot adopt the inside conformation when NAD(P)⁺ is bound. In several ALDH crystals it can be observed that the O7N of NAD(P)⁺ or the OE1 of Glu268 in the inside conformation accept a hydrogen bond from an ordered water molecule which has been proposed as the nucleophilic water (*Wat5*, see below). In other ALDH structures—either apo or holo in complex with NAD(P)H—that have the catalytic Glu in the intermediate conformation, a water molecule (which we call *Wat1*, see below) occupies the position of the O7N of NAD(P)⁺ in the carboxamide hole. *Wat1* is also thought to be involved in the hydrolysis of the thioester intermediate in certain ALDHs [6,19] because it is donating a hydrogen bond to the OE1 of Glu268. In this way, the carboxamide hole directly or indirectly participates in the binding of both the inside and intermediate conformations of the catalytic Glu, as well as in the binding of presumed hydrolytic water molecules.

Third, there are two regions, which we name as “carboxyl holes”, where the OE2 of the catalytic Glu in the intermediate or inside con-

formation binds (Fig. 2C and D). The “intermediate carboxyl hole” is formed by the main-chain carbonyl oxygen of Phe465, which accepts a hydrogen bond from the OE2 of a protonated Glu268, and by the main-chain NH of Glu476, which donates a hydrogen bond. As in the case of the other mentioned binding regions, a water molecule can be in the position of the OE2 when Glu268 is not in the intermediate conformation. The “inside carboxyl hole” is formed by the SH group of the catalytic Cys in the attacking conformation and, in some ALDHs, by the side-chain NE2 of a His or the side-chain NE1 of a Trp, which are the residues equivalent to Phe465 in these enzymes. Both groups donate a hydrogen bond to the OE2 of Glu268 in the inside conformation.

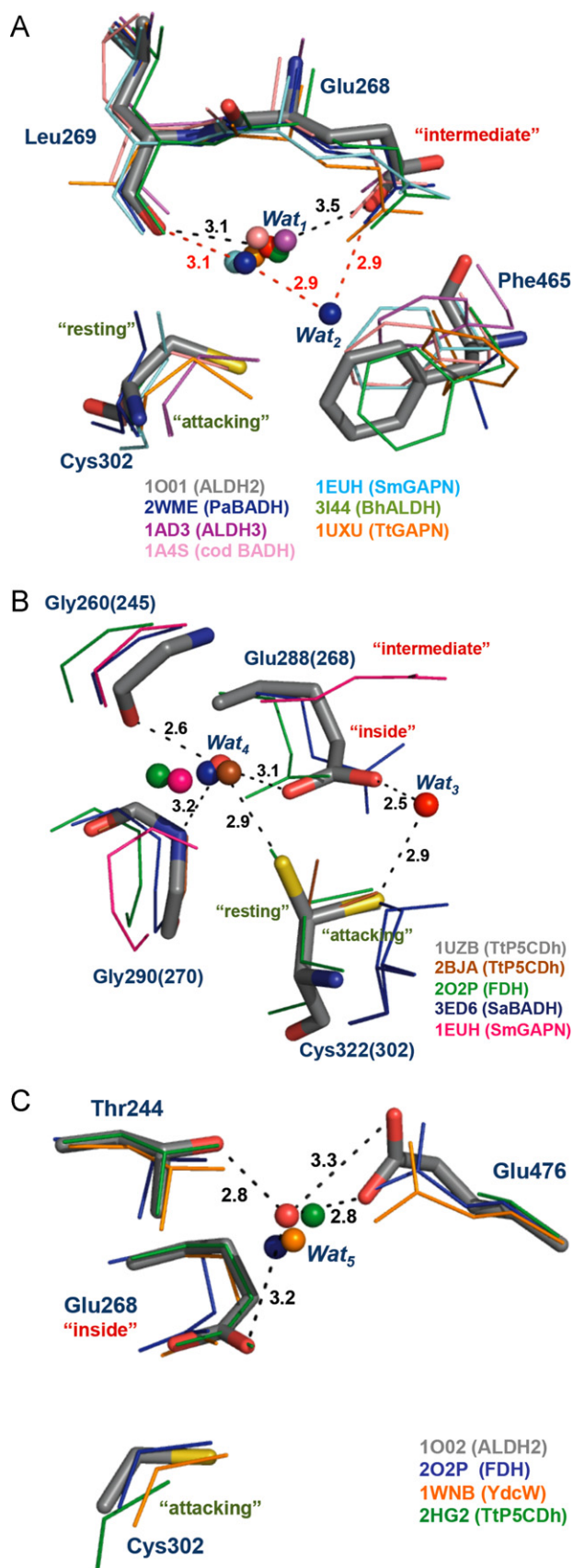
3.2. Role of the active-site dynamics on the deacylation step in ALDHs

The deacylation step of the ALDHs-catalyzed reaction firstly requires the conformational flexibility of the cofactor because the binding of the oxidized nicotinamide in the hydride transfer conformation excludes water from the active site of the ALDH enzymes, a situation that appears to facilitate hydride transfer in dehydrogenases/reductases [32]. After the oxidation step, the movement of the reduced nicotinamide from the hydride transfer position to any of the observed hydrolysis positions permits the entering of the hydrolytic water into the active site. The conformational changes that Glu268 may experience during the catalytic cycle plays also an important role in the deacylation step because it can interact with different water molecules depending on the conformation adopted by this residue. Below we describe and discuss the possible different hydrolytic water molecules and their interactions with the catalytic Glu in distinct ALDHs.

3.2.1. The hydrolytic water molecule in ALDHs

The water molecule that performs the hydrolysis of the thioester intermediate has to fulfill at least two requirements: (i) to be appropriately positioned with respect to the electrophilic carbonyl carbon of the thioester intermediate on which it performs the nucleophilic attack and (ii) to be the donor in a hydrogen bond with the catalytic Glu to which it transfers the proton so to become activated. In the active site of apo- or holo-NAD(P)H crystals of different ALDH enzymes, up to five ordered water molecules—which we will hereafter call *Wat1*, *Wat2*, etc.—(Fig. 3 and Table 1) have been proposed as the hydrolytic one [6,9,13–15,19]. Since it is possible that different water molecules are involved in the deacylation step depending on the ALDH enzyme, we here examine the feasibility of their hydrolytic role by constructing energy-minimized models of the thioester intermediate inside the active site of PaBADH—in which three of these water molecules were observed—and of TtP5CDh—in which the two others were found. Using these models, we estimated the steric compatibility and position of the five putative water molecules with respect to the thioester—by measuring both their distance and angle of attack³ to the carbonyl carbon—, as well as their distances to each of the conformations of the general base, the catalytic Glu268. Two of these water molecules, *Wat1* and *Wat2* can be in the ALDH active site only when the catalytic Glu is in the intermediate conformation; two others, *Wat3* and *Wat4*, when this residue has the inside conformation, whereas *Wat5* is sterically compatible with both conformations.

³ For each water molecule we estimated two angles: the one formed between the water and the C=O group in the σ plane (Wat–C–O) and the dihedral angle formed between the plane defined by the water oxygen and the carbonyl carbon and the π plane of the C=O group, which contains the Bürgi–Dunitz trajectory of an attacking nucleophile (Nu⁻). For the nucleophilic attack, the first angle should have a value of 107° and the second of 0°.

**Table 1**

Estimated distances and angles of the putative hydrolytic water molecules to the general base, Glu268, and to the carbonyl carbon of the thioester intermediate in ALDH crystals.

| Water | Distance (Å) to | | Angle (°) | |
|-------------------|-------------------------|------------------------------|------------------|-----------------------|
| | Glu268 OE1 ^a | Carbonyl carbon ^b | Wat–C–O | Dihedral ^c |
| Wat1 ^d | 2.6–4.2 | 3.5–5.6 | 110 ^e | 79 ^e |
| Wat2 ^d | 2.8 | 4.2 | 145 ^e | 4 ^e |
| Wat3 ^f | 2.5 | 2.3 | 103 ^g | 72 ^g |
| Wat4 ^d | 7.2 | 6.2 | – | – |
| Wat4 ^f | 3.1–3.6 | 5.3–6.7 | 62 ^g | 132 ^g |
| Wat5 ^d | 3.9–6.3 | 5.7–8.1 | 81 ^e | 134 ^e |
| Wat5 ^f | 2.5–4.8 | 5.9–7.8 | 93 ^g | 139 ^g |

^a Estimated using those available ALDH crystal structures that show any of these ordered water molecules (see Fig. 3 for the PDB accession codes of some of the structures used). When appropriate, the range of the measured distances is given.

^b Estimated by structurally aligning each ALDH crystal structure used with that of the SmGAPN (2ESD), which has a thioester intermediate in the active site.

^c Dihedral angle formed between the plane defined by the water oxygen and the carbonyl carbon and the π plane of the C=O group, which contains the Bürgi–Dunitz trajectory of an attacking nucleophile (Nu^-).

^d Glu268 is in the intermediate conformation.

^e Values estimated for the thioester intermediate model of PaBADH.

^f Glu268 is in the inside conformation.

^g Values estimated for the thioester intermediate model of TtP5CDh.

A survey of the ALDH crystal structures deposited in the PDB shows that *Wat1* (Fig. 3A) is present in many of them because it occupies the "carboxamide hole" when not occupied by NAD(P)⁺ or the catalytic Glu, i.e., when this residue is not in the inside conformation. *Wat1* donates a hydrogen bond to the carbonyl carbon of Leu269 and to the OE1 of the catalytic Glu in the intermediate conformation. Because of the latter interaction *Wat1* has been proposed as the nucleophilic water in some ALDHs [6,9,19]. Our energy-minimized model indicates that it is also close enough to the thioester carbonyl carbon but does not have the proper angle of attack. Bürgi et al. [33] established that the trajectory in the C=O π plane at which a nucleophile (Nu^-) approaches the carbon of the carbonyl group is not perpendicular to the σ plane of the carbon but at an angle ($\text{Nu}-\text{C}-\text{O}$) of 107° [33,34] (Fig. 4). *Wat1* has an angle $\text{Wat}-\text{C}-\text{O}$ of 110° but the plane defined by the water oxygen and the carbonyl carbon is displaced from the C=O π plane by a dihedral angle of 79° (Table 1 and Fig. 4A).

Wat2 has been so far observed only in the apo-like crystal of PaBADH in complex with NADP⁺ [15] where it is hydrogen bonded to *Wat1* (Fig. 3A). It was suggested that *Wat2* is the nucleophile in this enzyme since it is the one donating a hydrogen bond to the catalytic Glu in the intermediate conformation [15]. Our energy-minimized model of the thioester intermediate in the PaBADH active site indicates that *Wat2* is close to the carbonyl carbon and only 4° outside the π plane of the carbonyl group, but its $\text{Wat}-\text{C}-\text{O}$

Fig. 3. Positions and interactions of putative nucleophilic water molecules found in the active site of ALDHs. (A) *Wat1* observed in crystals of apo or apo-like ALDHs when Glu268 is in the intermediate conformation and Cys302 in the attacking or resting conformation. Only the PaBADH crystal 2WME has *Wat2* and Val in the position equivalent to Phe465. (B) *Wat3* and *Wat4*. Only the apo-TtP5CDh crystal 1UZH has *Wat3*. These crystal structures have the flip of the peptide bond between Leu269 and Gly270, with the exception of the non-phosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans* (SmGAPN) (1EUH). The numbers of the residues in ALDH2 are given within parenthesis. (C) *Wat5* as observed in ALDH crystals with Glu268 in the inside conformation. Protein atoms are shown as lines in the same color of their corresponding water molecules (depicted as spheres) and PDB accession codes. ALDH2 atoms (in panel A and C) and TtP5CDh atoms (in panel B) are shown as sticks, with carbon grey, oxygen red and sulfur yellow. Hydrogen bonds are shown with black dashed lines. Red dashed lines in panel A show the hydrogen bonds observed in the PaBADH crystal. Distances are in angstroms. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

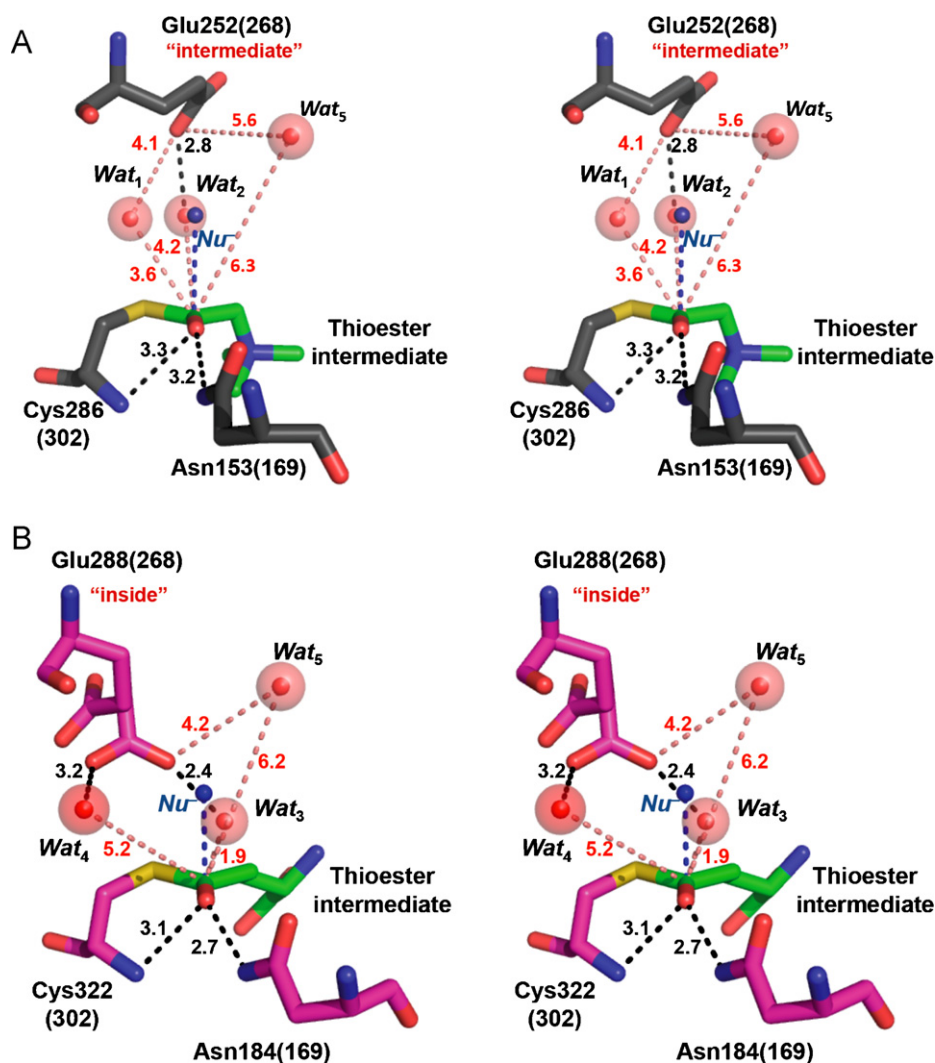


Fig. 4. Stereoviews showing the position of the putative hydrolytic water molecules in relation to the energy-minimized models of the thioester intermediate in the active site of PaBADH (2WME) (A) or of TtP5CDh (1UZH) (B). Distances of *Wat*₁, *Wat*₂ and *Wat*₅ to the glycine betaine thioester intermediate (A) or of *Wat*₃, *Wat*₄ and *Wat*₅ to the glutamate thioester intermediate (B) are given in angstroms and depicted as red dashed lines. Hydrogen bonds are depicted as black dashed lines. The Bürgi–Dunitz trajectory followed by a hypothetical attacking nucleophile (Nu⁻, blue ball) is depicted as a blue dashed line. *Wat*₁ and *Wat*₂ are not sterically compatible with the inside conformation of the catalytic Glu. *Wat*₃ and *Wat*₄ are not sterically compatible with the intermediate conformation of the catalytic Glu. *Wat*₅ is in TtP5CDh in a different position relative to the thioester carbonyl group than in PaBADH because of a displacement of the main-chain in the region wherein this water binds in the TtP5CDh crystal. Models of the thioester intermediates were built using as template the thioester intermediate in the SmGAPN (2ESD). Atoms are shown as sticks with nitrogen blue, sulfur yellow, and oxygen red. Carbon atoms are dark grey for PaBADH, magenta for TtP5CDh, and green for the thioester intermediate. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

angle is 145° instead of the 107° required by the Bürgi–Dunitz trajectory (Table 1 and Fig. 4A). Also, it is not clear whether *Wat*₂ could be the nucleophilic water in other ALDHs with a bulky residue in the position equivalent to Val453 of PaBADH, which is so far the only ALDH of known three-dimensional structure with a small side-chain residue at this position. In ALDH2 this residue is a Phe (Phe465). Multiple sequence alignments indicate that Phe is the most frequently found residue at this position in the known ALDH sequences (in ≈80% of them), followed by Trp (in ≈12%), Val (in ≈6%, all of them BADHs from γ -proteobacteria), and His (in ≈1%). The side chain of Phe, Trp or His may sterically hinder a water molecule in the position of *Wat*₂.

In a crystal structure of the apo-form of the TtP5CDh was found another ordered water molecule [13], *Wat*₃, which was proposed to be the hydrolytic molecule in this enzyme. It is donating one hydrogen bond to the OE2 of the catalytic Glu in the inside conformation, and another one to the SG of the catalytic Cys in the attacking con-

formation. It is also hydrogen-bonded to a water molecule that occupies the oxyanion hole (Fig. 2A). *Wat*₃ cannot be in the active site simultaneously with the oxidized cofactor, but it can be when the reduced cofactor is in any of the hydrolysis conformations. It could, therefore, participate in deacylation, although it has not been so far observed in any holoenzyme crystal with NAD(P)H bound. In the energy-minimized model of the thioester intermediate in the active site of the apo-form of TtP5CDh, *Wat*₃ has a Wat–C–O angle is of 103° but it is 72° from the π plane and too close to the carbonyl carbon and oxygen atoms (Table 1 and Fig. 4B). But since there is enough room for this water, or the hydroxide ion to move once formed, *Wat*₃ could be compatible with the thioester and yield a hydroxide ion that can perform the nucleophilic attack.

A fourth ordered water molecule, *Wat*₄, was first observed in the apo-form of the 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (FDH) [14] and suggested to be the one involved in the deacylation step in this enzyme. *Wat*₄ is hydrogen bonded to the main-chain car-

bonyl oxygen of Gly245 and the SG of the catalytic cysteine in the resting conformation, and in those crystals in which there is a flip of the peptide bond between Leu269 and Gly270, *Wat4* also forms a hydrogen bond with the main-chain NH of Gly270. But only in three of the five crystal structures in which this water can be observed is it hydrogen bonded to the OE1 of the catalytic Glu in the inside conformation (Fig. 3B). *Wat4* is in a position similar to that of the carboxamide N7N of the reduced NADH in the hydrolysis conformation observed in ALDH2 and other ALDHs. It would not be in the active site, therefore, during the deacylation step if the reduced nicotinamide adopts this conformation; it could be only if the reduced nicotinamide is out of the active site. Also, *Wat4* is too far away from the carbonyl carbon of the thioester intermediate and has a very poor angle of attack (Table 1 and Fig. 4B). After being deprotonated, the hydroxide ion would have to experience a considerable displacement in the active site to attain the thermodynamically favorable Bürgi–Dunitz trajectory.

Finally, another ordered water molecule, *Wat5*, has also been suggested to be the nucleophilic one [6,9]. *Wat5* is present in most ALDH crystal structures—both apo and holo—since it is the only one among the five putative hydrolytic waters that is in a position sterically compatible with both the oxidized and reduced nicotinamide. It forms a good hydrogen bond with the OG1 of Thr244, most often bridging this residue with Glu476 (Fig. 3B). *Wat5* is not hydrogen-bonded to the OE1 of the catalytic Glu in the intermediate conformation but it does donate a hydrogen bond to the OE2 when the catalytic Glu is in the inside conformation (Fig. 3B). Even in this case, however, *Wat5* does not appear to be correctly positioned for the nucleophilic attack, since is more distant from the carbonyl carbon of the thioester intermediate than *Wat1*, *Wat2* or *Wat3* (Table 1 and Fig. 4B) and has a poorer angle of attack (Fig. 4A and B). Rather, *Wat5* may play a structural role, contributing to the correct positioning of the oxidized pyridine ring of NAD(P)⁺ by binding to both the O7N of the carboxamide group (Fig. 2B) and to the OG1 of the highly conserved Thr244 (Fig. 3B), which has been proved to be critical for the binding and orientation of the oxidized cofactor and, therefore, for hydride transfer [35,36]. *Wat5* also contributes to the stabilization of the inside conformation of the catalytic Glu.

The energy-minimized models suggest that any of the five putative hydrolytic water molecules, or rather the hydroxide ions resulting from their deprotonation, must move inside the active site in order to attain the proper attack position. This movement could be triggered by electrostatic attraction between the hydroxide ion and the polarized carbonyl carbon of the thioester intermediate that has an increased partial positive charge due to the interactions of the carbonyl oxygen in the oxyanion hole. For *Wat1* and *Wat2* the movement would be facilitated when their hydrogen bonds with the carboxyl group of the catalytic Glu are broken after formation of the hydroxide ion, because the protonated Glu moves to the outside position to release the proton taken from the water. The hydrogen bond that *Wat1* forms with the carbonyl carbon of Leu269 would also be broken because of electrostatic repulsion with the hydroxide ion, thus permitting the movement of the ion. In fact, in this movement *Wat1* could adopt a position similar to that of *Wat2* and thus follow a similar trajectory. In the case of *Wat3* the catalytic Glu probably does not move to the outside conformation because the enzyme in which it has been observed, TtP5CDh, does not have the Lys residue (Lys178) that stabilizes this conformation. In this enzyme, the protonated catalytic Glu in the inside conformation can release the proton to a water channel to which it is connected [13]; once deprotonated, the electrostatic repulsion of its carboxylate group with the hydroxide ion would push the latter in the direction of the thioester carbonyl carbon, which will electrostatically attract the ion, as in the case of *Wat1* and *Wat2*. But *Wat4* and *Wat5*, which of the five water molecules are the farthest from the carbonyl carbon, likely would stay in the position observed in the

crystal structures even if they transferred a proton to the catalytic Glu. *Wat5* would stay because of the strong hydrogen bond it forms with Thr244 and because its movement would be obstructed by *Wat1* or *Wat2*—depending on the ALDH considered—if the catalytic Glu is in the intermediate conformation, or by *Wat3* if this residue is in the inside conformation. The latter also applies for *Wat4*.

In conclusion our analysis so far suggests that of the five putative hydrolytic water molecules, the more likely ones to be involved are *Wat1*, *Wat2* and *Wat3*, depending on the ALDH considered.

3.2.2. Activation of the hydrolytic water in ALDHs

Enzyme-catalyzed hydrolytic reactions require a general base to accept a proton from the hydrolytic water molecule, so that a more efficient nucleophile, the hydroxide ion, is formed at physiological pH. For an efficient proton transfer between two groups or molecules, the pK_a of the donor and acceptor should be comparable. In the deacylation step of the ALDH catalyzed reactions, this implies that the pK_a of the side-chain carboxyl group of the catalytic Glu268 must be significantly higher than its typical value of ~4, while that of the hydrolytic water must be significantly lower than its normal value of 15.74. The mechanism by which these perturbations could be achieved in the active site of the ALDH enzymes is poorly understood.

Regarding Glu268 in the intermediate conformation, the proximity of its side-chain carboxyl group to that of Glu476—which is deprotonated and has a negative charge because of its interaction with the side-chain amino group of Lys178—must produce an upward shift in the pK_a of the carboxyl group of Glu268. Supporting this reasoning, the crystallographic evidence of the hydrogen bond between the OE2 of Glu268 and the carbonyl oxygen of Phe465 indicates that Glu268 in the intermediate position is protonated even at pH 7.5, which is the highest pH value at which crystals have been obtained. The proximity of the partial negative charge of the carbonyl oxygen of Phe465 may also contribute to a rise in the pK_a of Glu268. Theoretical pK_a values for the carboxyl groups of Glu268 and Glu476 and for the amino group of Lys178 in PaBADH and ALDH2 (Table 2) are in agreement with our proposal. Other factors, such as the hydrophobic environment, also contribute to the increase of the Glu268-carboxyl group pK_a, which was estimated to be ~9 in the intermediate conformation present in PaBADH. This increased value will facilitate the abstraction of the proton from either *Wat1* or *Wat2*. The theoretical pK_a of this carboxyl group was considerable lower in TtP5CDh than in the two other ALDHs, which is consistent with the absence of a charged residue equivalent to Glu476 in the tTP5CDh enzyme.

The crystallographic evidence indicates that Glu268 in the inside conformation—in which it can be hydrogen bonded to *Wat3*, *Wat4*, and *Wat5*—may be deprotonated at the pH at which the crystals were grown, since it does not form any hydrogen bond in which the carboxyl group needs to be the hydrogen donor. Accordingly, the program PROPKA estimated pK_a values of 8.0–9.0 for its carboxyl group in the ALDH2 and PaBADH enzymes, significantly lower than those estimated for the catalytic Glu in the intermediate conformation in the same enzymes (Table 2). These pK_a values are still higher than that of a typical glutamate carboxyl group, mainly due to the hydrophobic environment, but close to that of a typical Cys thiol group. This would make unnecessary a decrease in the pK_a of the latter residue for its activation, i.e., for the transfer of its proton to the catalytic Glu. On the other hand, a pK_a ~8.0 would make more difficult for the carboxyl group to abstract a proton from the hydrolytic water than when Glu268 is in the intermediate position. In the TtP5CDh this pK_a was even lower, ~6.0. The data given in Table 2 are those obtained when the catalytic Cys is in the attacking conformation, but similar values were obtained with this residue in the resting conformation (data not shown). Based on the results of these theoretical calculations, it appears that the intermediate

Table 2
Theoretical pK_a values^a of Glu268 and neighbor ionizable residues.

| Glu268 conformation | pK_a | | |
|--------------------------------|--------|--------|--------|
| | Glu268 | Glu476 | Lys178 |
| PaBADH | | | |
| Inside ^b | 8.02 | 4.52 | 8.28 |
| Intermediate | 9.08 | 4.67 | 8.56 |
| Outside | 2.58 | 5.15 | 8.12 |
| ALDH2 | | | |
| Inside | 7.62 | 4.52 | 9.29 |
| Intermediate | 10.68 | 3.10 | 9.55 |
| Outside ^b | 3.13 | 4.83 | 8.64 |
| TtP5CDh | | | |
| Inside | 6.08 | – | – |
| Intermediate ^b | 7.25 | – | – |
| PaBADH–thioester ^c | | | |
| Inside ^b | 4.50 | 4.46 | 8.34 |
| Intermediate | 9.11 | 4.67 | 8.59 |
| TtP5CDh–thioester ^c | | | |
| Inside | 6.80 | – | – |
| Intermediate ^b | 7.34 | – | – |

^a Estimated using the program PROPKA [30,31] and the crystal coordinates of PaBADH (2WME), ALDH2 (1002 and 1000), and TtP5CDh (1UZB).

^b Estimated in energy-minimized models constructed using the corresponding crystal coordinates but changing the conformation of their Glu268 to the one not observed so far in these enzymes.

^c Estimated in energy-minimized models of the thioester intermediate constructed using as template the mentioned crystal coordinates of the enzymes and those of the thioester intermediate in the SmGAPN (2ESD), but using a glycine betaine molecule (for PaBADH) or a glutamate molecule (for TtP5CDh) instead of the 3-phosphoglycerate in the SmGAPN structure.

conformation of the catalytic Glu would be the one more suited for the activation of the water molecule in the deacylation step, while the inside conformation would be more suited for the activation of the catalytic Cys in the thiohemiacetal formation step. Moreover, when the possible effects of the covalent bound thioester intermediate of the reaction on the acidity of the catalytic Glu are taken into account—by doing the theoretical calculations with the energy-minimized thioester models—we obtained qualitatively different results depending on the ALDH enzyme. Whereas in the PaBADH there was a large increase in the acidity of the carboxyl group of Glu268 in the inside conformation with respect to the free enzyme, in the TtP5CDh there was a decrease, although small (Table 2). In PaBADH the decreased pK_a would make it even more difficult for the catalytic Glu to be the general base in the deacylation step if it were in the inside conformation. On the contrary, in TtP5CDh the predicted higher pK_a would facilitate this role, although the extent of the increase seems to be too low for an efficient deprotonation of the hydrolytic water molecule. The differences between the two enzymes are mostly due to the nature of their acid products: glycine betaine, which has a positively charged quaternary nitrogen, in the case of PaBADH, and glutamate, which has negatively charged carboxylate groups, in the case of TtP5CDh. Additional factors, not considered in our analysis, may be also involved in perturbing the pK_a s of either the catalytic Glu or of the hydrolytic water molecule in these ALDH enzymes.

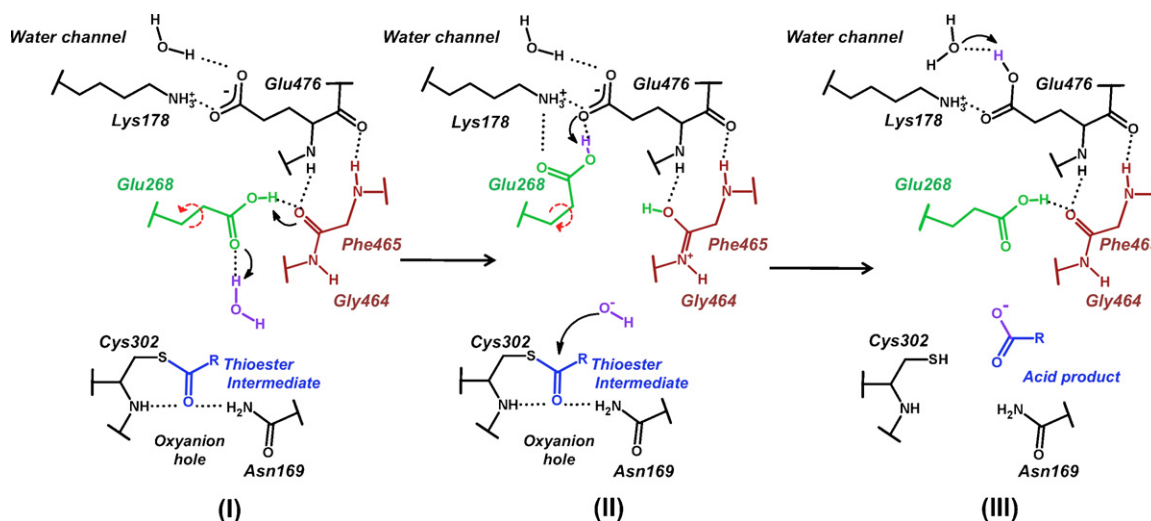
For the reaction to continue, once the catalytic Glu is protonated it has to lose its proton, which in certain ALDHs occurs when this residue moves to the outside conformation [15]. It is interesting that the calculated pK_a value of the carboxyl group of Glu268 in this conformation is lower than calculated when Glu268 is in the inside or intermediate conformations, and even lower than the typical value of this group, whereas that of Glu476 is higher (Table 2). The low pK_a of Glu268 is most likely due to the inductive effect of the amino group of Lys178, with which Glu268 interacts when in the outside conformation, and of the hydroxyl group of Thr228, which

donates a hydrogen bond to the carboxyl group of Glu268. The difference in pK_a between the two carboxyl groups is consistent with a rapid and efficient transfer of the proton from Glu268 to Glu476, which in turn will transfer the proton to the water system that connects the latter residue with the protein surface, as proposed [15]. Deprotonation of the two carboxyl groups has two effects: (1) the movement of Glu268 back to the intermediate position because of the electrostatic repulsion between the two carboxylate groups, and (2) the concomitant increase in the pK_a of Glu268.

The question arises, how can the protonated Glu268 in the intermediate conformation accept a proton from the hydrolytic water? Clearly, the protonated catalytic Glu must lose its proton before taking the proton from the water, but how could this be achieved? It would require another ionizable group of similar or higher pK_a in its proximity. Our proposal is that this group is the carbonyl of the peptide bond between Gly466 and Phe465, which makes a strong hydrogen bond with the OE2 of Glu268 in any apo- or holo-ALDH crystal that has the catalytic Glu in the intermediate conformation. In these structures, the peptide carbonyl group is involved in another hydrogen bond, the one it is accepting from the main chain NH of Glu476 [15]. Probably because of the hydrogen bond between Phe465 and Glu476, the carbonyl of the 465–466 peptide bond has a residual negative charge higher than that in a typical resonant peptide bond. This may give rise to a strong hydrogen bond between the carbonyl oxygen of the peptide bond and the carboxyl OE2 of Glu268 so that the hydrogen may be, at least transiently, on the carbonyl oxygen and a deprotonated Glu268 can accept the proton from the hydrolytic water (Scheme 2). After being again protonated, Glu268 could no longer form the hydrogen bond with the protonated carbonyl oxygen of the peptide bond that stabilized the intermediate conformation; on the contrary this conformation would be sterically destabilized by the proximity of the two hydrogen atoms, and Glu268 could freely rotate from the intermediate position to the outside position observed in the PaBADH-NADP⁺ crystal [15].

Protonation of the amide oxygen of the peptide bond giving rise to an imidic acid that can be involved in proton transfer is well known [37,38]. When the carbonyl oxygen is protonated, a charged intermediate $RC(OH)=NHR'$ is formed. In this intermediate the positive charge is shifted towards the amide nitrogen, whose pK_a decreases from 18 to ~8.0. If solvent exposed or located near a proton-accepting group—which may be another peptide bond participating in a chain of $NH\cdots O=C$ bonds in α helix or β sheets—the nitrogen of this intermediate loses a proton and forms the imidic acid $RC(OH)=NR'$, which is the enol form of the peptide bond and readily tautomerizes to the more stable keto form $R(CO)-NHR'$. In this manner, the peptide bond can be part of an “imidic acid mechanism” of a proton-relay process [39]. In the case of the ALDHs of known crystal structure, the amide nitrogen of the 465–466 peptide bond is not near any other proton-accepting group, with the exception of a water molecule observed in many structures (for instance see 1AD3, 1KY8, 1001, 1UXQ, 1WNB, 2HG2, 2O2P, 3IWJ, 1A4S, 3ED6, 3B4W, 2W8N, 3K9D, 3K2W, 3IWK, 3IJ4, 2WME, 2W0X). But this water is not directly or indirectly connected to a water channel. Therefore, the protonated peptide bond would remain protonated until the deprotonated Glu268 carboxyl group comes back from the outside position and forms again the hydrogen bond with the carbonyl carbon of Phe466. This hydrogen bond, whichever the donor, is important for stabilizing the intermediate conformation of the catalytic glutamic acid.

In some ALDHs, Glu268 in the outside conformation could directly transfer the proton to the water channel. In any case, both carboxyl groups will repel each other once deprotonated, triggering the movement of Glu268 either to the inside or to the intermediate conformation. The catalytic Glu of the P5CDh enzymes most likely does not adopt the outside conformation



Scheme 2. Proposed mechanism for the deacylation step in ALDHs. (I) A protonated Glu268 in the intermediate conformation is hydrogen bonded to both the hydrolytic water molecule and to the carbonyl oxygen of the 465–466 peptide bond. The proton involved in the latter bond moves to the carbonyl oxygen forming an imidic acid, and Glu268 takes the proton from the water. (II) The hydroxide ion makes the nucleophilic attack on the carbonyl carbon of the enzyme covalently bound thioester. Glu268 moves away from the imidic peptide bond to the outside conformation. In this conformation Glu268 interacts with Lys178 and Glu476, to which it transfers the proton. (III) The acid product of the reaction is formed. A deprotonated Glu268 returns to the intermediate conformation where it is again protonated by the imidic form of the peptide bond.

because they do not have a residue equivalent to Lys178; in these enzymes the release of the proton from the carboxyl group in the inside conformation directly to a water channel has been proposed [13].

As mentioned above, for an efficient proton transfer the ordered hydrolytic water must be much more acidic than a typical water molecule in bulk water. The active site environment and the interactions that the hydrolytic water makes, particularly the hydrogen bond that it donates to the catalytic Glu, should significantly decrease its pK_a . But this interaction may not decrease the water pK_a as much as the approximately six pH-units necessary to match the pK_a of the carboxyl group. If the hydrolytic water accepts a hydrogen bond, its deprotonation at physiological pH would be facilitated because this interaction would first polarize the neutral water and second stabilize the hydroxide anion. A maximum deacylation rate could then be achieved. It remains to be determined which group, if any, could be donating such hydrogen bond to *Wat1*, *Wat2* and *Wat3*.

4. Concluding remarks

Our energy-minimized models and theoretical calculations support the notion that big changes in the chemical properties of a group, the carboxyl group of Glu268 in this case, could be achieved in the active site environment of enzymes during the catalytic cycle through conformational flexibility. There are still important unanswered questions regarding the chemical mechanism of the ALDHs, particularly because it appears that there is considerable variability in mechanistic details among them. Molecular dynamics simulations using those crystal structures that show differences in the conformation of catalytic residues and of the cofactor will be of great help not only in the interpretation of the “static” crystallographic data, but also in a more comprehensive explanation of the ALDHs chemical mechanism by revealing unsuspected dynamic properties with mechanistic implications.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT grants 59654 and 101986) and UNAM (PAPIIT grant IN204708). A.G.D.-S. is the recipient of a CONACYT scholarship.

References

- [1] R.I. Feldman, H. Weiner, Horse liver aldehyde dehydrogenase. II. Kinetics and mechanistic implications of the dehydrogenase and esterase activity, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 267–272.
- [2] X. Wang, H. Weiner, Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis, *Biochemistry* 34 (1995) 237–243.
- [3] M. Vedadi, R. Sztitter, L. Smillie, E. Meighen, Involvement of cysteine 289 in the catalytic activity of an NADP(+)-specific fatty aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*, *Biochemistry* 34 (1995) 16725–16732.
- [4] S. Marchal, S. Rahuel-Clermont, G. Branlant, Role of glutamate-268 in the catalytic mechanism of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *Biochemistry* 39 (2000) 3327–3335.
- [5] S. Marchal, D. Cobessi, S. Rahuel-Clermont, F. Tête-Favier, A. Aubry, G. Branlant, Chemical mechanism and substrate binding sites of NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *Chem. Biol. Interact.* 130–132 (2001) 15–28.
- [6] C.G. Steinmetz, P. Xie, H. Weiner, T.D. Hurley, Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion, *Structure* 5 (1997) 701–711.
- [7] R.A. Muñoz-Clares, A.G. Díaz-Sánchez, L. González-Segura, C. Montiel, Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: mechanistic and regulatory implications, *Arch. Biochem. Biophys.* 493 (2010) 71–81.
- [8] S.A. Moore, H.M. Baker, T.J. Blythe, K.E. Kitson, T.M. Kitson, E.N. Baker, Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases, *Structure* 6 (1998) 1541–1551.
- [9] S.J. Perez-Miller, T.D. Hurley, Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase, *Biochemistry* 42 (2003) 7100–7109.
- [10] B. Ahvazi, R. Coulombe, M. Delarge, M. Vedadi, L. Zhang, E. Meighen, A. Vrielink, Crystal structure of the NADP⁺-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity, *Biochem. J.* 349 (2000) 853–861.
- [11] D. Cobessi, F. Tête-Favier, S. Marchal, S. Azza, G. Branlant, A. Aubry, Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *J. Mol. Biol.* 290 (1999) 161–173.
- [12] A. Gruez, V. Roig-Zamboni, S. Grisel, A. Salomoni, C. Valencia, V. Campanacci, M. Tegoni, C. Cambillau, Crystal structure and kinetics identify *Escherichia coli* YdcW gene product as a medium-chain aldehyde dehydrogenase, *J. Mol. Biol.* 343 (2004) 29–41.

- [13] E. Inagaki, N. Ohshima, H. Takahashi, C. Kuroishi, S. Yokoyama, T.H. Tahirov, Crystal structure of *Thermus thermophilus* Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, *J. Mol. Biol.* 362 (2006) 490–501.
- [14] Y. Tsybovsky, H. Donato, N.I. Krupenko, C. Davies, S.A. Krupenko, Crystal structures of the carboxyl terminal domain of rat 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase: implications for the catalytic mechanism of aldehyde dehydrogenases, *Biochemistry* 46 (2007) 2917–2929.
- [15] 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.
- [16] M. Tylichová, D. Kopečný, S. Moréřa, P. Briozzo, R. Lenobel, J. Snégaroff, M. Šebela, Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes, *J. Mol. Biol.* (2010) 870–872.
- [17] K. Johansson, M. El-Ahmad, S. Ramaswamy, L. Hjelmqvist, H. Jörnvall, H. Eklund, Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution, *Protein Sci.* 87 (1998) 2106–2117.
- [18] E. Pohl, N. Brunner, M. Wilmanns, R. Hensel, The crystal structure of the allosteric nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeum *Thermoproteus tenax*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19938–19945.
- [19] E. Lorentzen, R. Hensel, T. Knura, H. Ahmed, E. Pohl, Structural basis of allosteric regulation and substrate specificity of the non-phosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*, *J. Mol. Biol.* 341 (2004) 815–828.
- [20] K. D'Ambrosio, A. Pailot, F. Talfournier, C. Didierjean, E. Benedetti, A. Aubry, G. Branlant, C. Corbier, The first crystal structure of a thioacylzyme intermediate in the ALDH family: new coenzyme conformation and relevance to catalysis, *Biochemistry* 45 (2006) 2978–2986.
- [21] L. Di Constanzo, G.A. Gomez, D.W. Christianson, Crystal structure of lactaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli* and inferences regarding substrate and cofactor specificity, *J. Mol. Biol.* 366 (2007) 481–493.
- [22] J. Bains, M.J. Boulanger, Structural and biochemical characterization of a novel aldehyde dehydrogenase encoded by the benzoate oxidation pathway in *Burkholderia xenovorans* LB400, *J. Mol. Biol.* 379 (2008) 597–608.
- [23] D. Cobessi, F. Tête-Favier, S. Marchal, G. Branlant, A. Aubry, Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *J. Mol. Biol.* 300 (2000) 141–152.
- [24] E. Inagaki, N. Ohshima, K. Sakamoto, N.D. Babayeba, H. Kato, S. Yokoyama, T.H. Tahirov, New insights into the binding mode of coenzymes: structure of *Thermus thermophilus* Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase complexed with NADP⁺, *Acta Crystallogr. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* 63 (2007) 2917–2929.
- [25] Z.J. Liu, Y.J. Sun, J. Rose, Y.J. Chung, C.D. Hsiao, W.R. Chang, I. Kuo, J. Perozich, R. Lindahl, J. Hempel, B.C. Wang, The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold, *Nat. Struct. Biol.* 4 (1997) 317–326.
- [26] H.N. Larson, J. Zhou, Z. Chen, J.S. Stamler, H. Weiner, T.D. Hurley, Structural and functional consequences of coenzyme binding to the inactive Asian variant of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. Roles of residues 475 and 487, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12940–12950.
- [27] N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18 (1997) 2714–2723.
- [28] H. Li, A.D. Robertson, J.H. Jensen, Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK_a values, *Proteins* 61 (2005) 704–721.
- [29] D.C. Bas, D.M. Rogers, J.H. Jensen, Very fast prediction and rationalization of pK_a values for protein–ligand complexes, *Proteins* 73 (2008) 765–783.
- [30] W.L. DeLano, The PyMOL molecular graphics system on world wide web (2002) <http://www.pymol.org/>.
- [31] B. Asboth, L. Polgar, Transition-state stabilization at the oxyanion binding sites of serine and thiol proteinases: hydrolyses of thiono and oxygen esters, *Biochemistry* 22 (1983) 117–122.
- [32] H. Eklund, C.I. Branden, Crystal structure coenzyme conformation and protein interactions, in: D. Dolphin, O. Avramovic, R. Poulson (Eds.), *Pyridine Nucleotide Coenzymes Part A*, vol. 2, Wiley-Interscience, New York, 1987, pp. 51–99.
- [33] H.B. Bürgi, J.D. Dunitz, E. Shefter, Geometrical reaction coordinates. II. Nucleophilic addition to a carbonyl group, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 5065–5067.
- [34] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, New York, 2001, pp. 135–150.
- [35] A. Pailot, K. D'Ambrosio, C. Corbier, F. Talfournier, G. Branlant, Invariant Thr244 is essential for the efficient acylation step of the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *Biochem. J.* 400 (2006) 521–530.
- [36] K.H. Kwok, T.D. Hurley, H. Weiner, Selective alteration of the rate-limiting step in cytosolic aldehyde dehydrogenase through random mutagenesis, *Biochemistry* 45 (2006) 9445–9453.
- [37] C.L. Perrin, Proton exchange in amides: surprises from simple systems, *Acc. Chem. Res.* 22 (1989) 268–275.
- [38] M.A. Eriksson, T. Härd, L. Nilsson, On the pH dependence of amide proton exchange rates in proteins, *Biophys. J.* 69 (1995) 329–339.
- [39] T. Tsukihara, K. Shimokata, Y. Katamaya, H. Shimada, K. Muramoto, H. Aoyama, M. Mochizuki, K. Shinzawa-Itoh, E. Yamashita, M. Yao, Y. Ishimura, S. Yoshikawa, The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 15304–15309.



Review

Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: Mechanistic and regulatory implications

Rosario A. Muñoz-Clares*, Ángel G. Díaz-Sánchez, Lilian González-Segura, Carmina Montiel

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2009

and in revised form 5 September 2009

Available online 18 September 2009

Keywords:

BADH

Kinetic mechanism

NAD(P)H uncompetitive inhibition

Iso-mechanism

NAD(P)H-induced enzyme inactivation

Monovalent cations

Catalytic residues conformation

NAD(P)⁺ binding mode

NAD(P)H catalytic role

Cysteine–nicotinamide adducts

ABSTRACT

The betaine aldehyde dehydrogenases (BADH; EC 1.2.1.8) are so-called because they catalyze the irreversible NAD(P)⁺-dependent oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine, which may function as (i) a very efficient osmoprotectant accumulated by both prokaryotic and eukaryotic organisms to cope with osmotic stress, (ii) a metabolic intermediate in the catabolism of choline in some bacteria such as the pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, or (iii) a methyl donor for methionine synthesis. BADH enzymes can also use as substrates aminoaldehydes and other quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds, thereby participating in polyamine catabolism and in the synthesis of γ -aminobutyrate, carnitine, and 3-dimethylsulfoniopropionate. This review deals with what is known about the kinetics and structural properties of these enzymes, stressing those properties that have only been found in them and not in other aldehyde dehydrogenases, and discussing their mechanistic and regulatory implications.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The betaine aldehyde dehydrogenases (betaine aldehyde: NAD(P)⁺ oxidoreductase, EC 1.2.1.8; BADH) belong to the non-phosphorylating aldehyde dehydrogenase (ALDH)¹ superfamily. BADHs are so named because of their ability to efficiently catalyze the irreversible NAD(P)⁺-dependent oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine (Fig. 1A). Glycine betaine can function as (i) the most effective osmoprotectant [1] accumulated by both prokaryotic and eukaryotic organisms to cope with osmotic stress [2–4], (ii) a methyl donor for methionine synthesis [5], and (iii) a metabolic intermediate in the catabolism of choline and choline precursors in some bacteria, such as the pathogen *Pseudomonas aeruginosa* [6]. It is now recognized that proteins with BADH activity are heteroge-

neous in their phylogenetic relationships, number of subunits, substrate specificities, coenzyme preferences, and biochemical roles.

BADHs belong to three separate families: ALDH9, which include animal, bacterial and fungal enzymes, ALDH10, which include plant and fungal proteins, and ALDH23 formed by firmicutes and actinobacterial enzymes [7]. There are several other ALDH families formed by aminoaldehydes dehydrogenases whose members also have BADH activity [8,9]. Animal [10] and bacterial [11,12] ALDH9 are tetrameric, while plant ALDH10 [13,14] and firmicutes enzymes [15] are dimeric.

Although the structural determinants for aldehyde specificity of the BADH enzymes are not yet understood, it is known that, in addition to betaine aldehyde, BADHs can accept other quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds as substrates, as well as several aminoaldehydes (Fig. 1B). This led to their classification as distinct enzymes by the Enzyme Commission (EC). Mammalian BADH (EC 1.2.1.8) was found to be the same enzyme as the E3 aldehyde dehydrogenase isoenzyme (EC 1.2.1.5) [16], the γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.19) [16,17], and the 4-N-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.47) [8]. Therefore, in addition to those biochemical functions associated with the synthesis of glycine betaine mentioned above, BADHs are thought to be involved in polyamine catabolism [16–19], in the synthesis of the inhibitory neurotransmitter γ -aminobutyrate (GABA) [20], and in the synthesis of carnitine [8]. Plant

* Corresponding author. Fax: +52 5556225329.

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

¹ Abbreviations used: ALDH, aldehyde dehydrogenase; BADH, betaine aldehyde dehydrogenase; chBADH, chloroplastic BADH; PaBADH, betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*; SaBADH, betaine aldehyde dehydrogenase from *Staphylococcus aureus*; FDH, 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase; GABA, γ -aminobutyric acid; SmGAPN, non-phosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*; TtGAPN, non-phosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Thermoplasma tenax*; QM-MM, quantum mechanics–molecular mechanics; TtP5CDH, Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*.

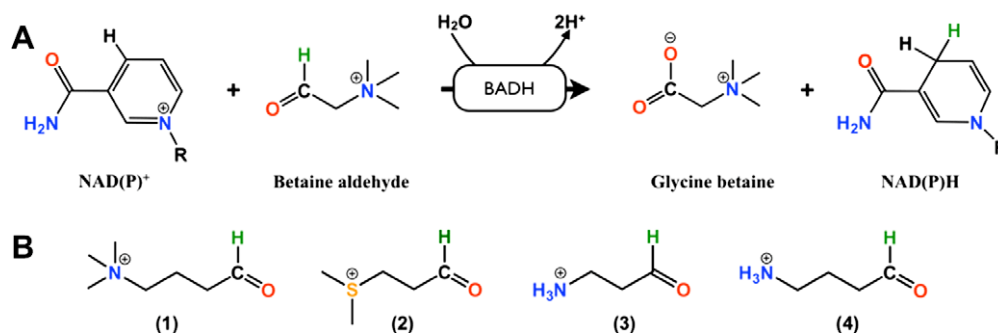


Fig. 1. Reaction catalyzed by BADH enzymes and known substrates. (1) 4-*N*-trimethylaminobutyraldehyde; (2) 3-dimethylsulfoniopropionaldehyde; (3) 3-aminopropionaldehyde; (4) γ -aminobutyraldehyde.

BADHs are also involved in the synthesis of the osmoprotectant 3-dimethylsulfoniopropionate [21,22].

The bacterial BADH enzymes that participate in choline catabolism are some of the few ALDHs than can use NAD^+ and NADP^+ with similar efficiency [23,24]. These BADHs have an amphibolic role, providing both NADH for ATP synthesis through the oxidative phosphorylation and NADPH for anabolism and defense against oxidative stress [24]. The rest of the BADH enzymes prefer NAD^+ to NADP^+ , as most ALDHs do.

This review deals with what is known about the kinetics and structural properties of BADH enzymes, stressing those that so far have been found only in them and not in other aldehyde dehydrogenases, and discussing their mechanistic and regulatory implications. For more information about the physiological relevance of these enzymes the reader is encouraged to consult two recent reviews [25,26].

Kinetic properties

The kinetics of the BADHs studied up to now appear to be more complex than those of other ALDH enzymes, and the interpretation of its several oddities had to await until the elucidation of the structures of the BADH from *P. aeruginosa* (PaBADH) in complex with NADP^+ [27] and NADPH [2wox, unpublished], as described below.

Kinetic mechanism

In the few BADHs whose kinetics have been studied to some extent, three different kinetic mechanisms have been reported: ping-pong for bacterial and fungal enzymes [11,15,28]; iso bi-bi ordered steady-state—with NAD^+ being the first substrate to add to the enzyme and NADH the last product to be released—for plant [29,30] and porcine kidney enzymes [31], and bi-bi random steady-state—with a much preferred route in which the nucleotide adds first to the enzyme—for *P. aeruginosa* BADH (PaBADH) [24]. Given the chemical mechanism of the aldehyde dehydrogenases (see below), it is difficult to explain the finding of ping-pong mechanisms in some BADHs. Since this kinetic mechanism was proposed on the basis of the family of parallel lines in reciprocal plots obtained in initial velocity studies in the absence of products, and in sequential mechanisms apparent parallel lines can be obtained if K_{ia} is much smaller than K_a , it is likely that for these enzymes the mechanism is indeed sequential, as it is in the other three BADHs and in other ALDHs [32–36].

The iso-mechanisms proposed for the BADH enzymes are exceptional because no other ALDH has been reported to exhibit this type of mechanism. Iso-mechanisms were predicted to arise when there is a rate-limiting isomerization step of free enzyme after the release of the last product and before the binding of the

first substrate [37]. This product behaves, therefore, as a noncompetitive (mixed) inhibitor against the first substrate, instead of being competitive as it should be if the free enzyme isomerization does not occur. Indeed, the observed noncompetitive inhibition of NADH against NAD^+ was interpreted as evidence of the isomerization of the free enzyme after NADH release, so that NAD^+ and NADH bind to different enzyme forms (Fig. 2) [29–31]. These BADH enzymes and the flavin-dependent nitroalkane oxidase [38] are the only examples known in which an iso-mechanism has been proposed on the basis of product inhibition. Other iso-mechanisms have been mostly detected by studying solvent isotope effects, because the isomerization of the free enzyme involves a protonation step [39,40]. A change of the protonation state of the catalytic cysteine in the free enzyme was proposed to take place in the chloroplastic BADH (chBADH) [29], but the expected dependence on pH of the uncompetitive component of the NADH inhibition was not found in later studies [Mújica-Jiménez, Muñoz-Clares, unpublished results]. Therefore the nature of the isomerization step remained unknown. NADH , but not NADPH , is also a noncompetitive inhibitor against NAD^+ in the PaBADH catalyzed reaction. No other ALDH has been reported to exhibit noncompetitive inhibition of the reduced nucleotide against the oxidized one, with the exception of ALDH3 where it was explained on account of a low affinity of NADH for the enzyme [41]. Contrasting with the noncompetitive inhibition of NADH against NAD^+ , AMP behaves as a competitive inhibitor [29,31], which suggests that the uncompetitive component arises from the nicotinamide moiety of NADH .

Substrate inhibition

Complete substrate inhibition by high concentrations of NAD^+ was found in chBADH and PaBADH [24,42,43]. This inhibition has

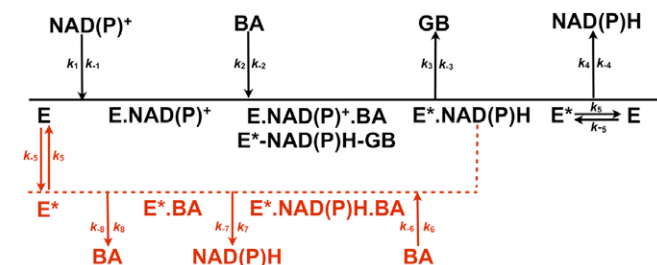


Fig. 2. Kinetic mechanism proposed for chBADH. At low aldehyde substrate concentrations the initial velocity data obtained in the absence and presence of NADH and dead-end inhibitors were consistent with the iso bi-bi steady-state mechanism [29] depicted with solid black lines. E^* here denotes the enzyme conformation that binds NAD(P)H but not NAD(P)^+ . For this mechanism to be observed in initial velocity studies, the isomerization step has to be rate limiting; i.e., k_5 has to be the lowest first-order rate constant. At high aldehyde concentrations the kinetics are consistent with the establishment of a slower route of product release—i.e., k_7 is slower than k_4 [45]—depicted with broken red lines.

been so far reported only for one other ALDH, a γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase [35]. The mechanism by which the first substrate in a bi-bi ordered mechanism produces complete substrate inhibition is not straightforward because it cannot arise from the establishment of a slower alternative route of reaction, which could only be established by the second substrate and would produce partial substrate inhibition. The simplest explanation would be the formation in the active site of an abortive E.NAD₂ ternary complex, which would prevent binding of the aldehyde. Although this is consistent with the observation of noncompetitive inhibition of the NADP⁺ against betaine aldehyde in PaBADH [24] and with increased concentrations of betaine aldehyde decreasing the inhibition by NAD⁺ in chBADH [42], the known ALDH crystal structures show that this ternary complex cannot be formed either in the active site or by binding of the second, inhibitory NAD(P)⁺ molecule in any other region of the protein. The complete inhibition of the enzymes by NAD(P)⁺ was therefore mechanistically not explained.

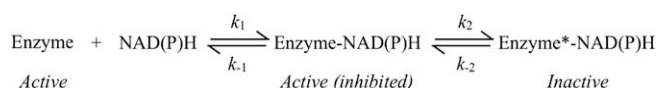
Several BADHs are also inhibited by high concentrations of betaine aldehyde [11,14,15,44]. The inhibition is partial and non-competitive against NAD(P)⁺. The degree of inhibition by betaine aldehyde increased as the concentration of NAD(P)H in assay medium does. These inhibition kinetics are consistent with betaine aldehyde forming a ternary E.NAD(P)H.betaine aldehyde complex from which the reduced nucleotide can be released, so that a second, slower route of NAD(P)H release is established (Fig. 2) [44,45].

Enzyme inactivation by nucleotides

The PaBADH and chBADH reactions stopped much before completion [Díaz-Sánchez, Montiel, Muñoz-Clares, unpublished results]. Indeed under certain conditions only 10% of the substrate is consumed (Fig. 3A). This is not due to the reaching of equilibrium, given the irreversibility of the ALDHs catalyzed reactions. Accordingly, the reaction cannot be re-started by adding fresh aldehyde or nucleotide to the assay medium. The enzyme, however, is not irreversibly inactivated because it resumes its catalytic activity if the NAD(P)H produced in the reaction is removed. These results indicate that the enzyme changes during the reaction to a

form that either is highly susceptible to NAD(P)H inhibition, or that it is inactive for another reason. In any case, NAD(P)⁺ is unable to displace NAD(P)H from the active site, even at very high concentrations, which is in agreement with the uncompetitive component of the inhibition of the reduced nucleotide against the oxidized one found in initial velocity studies.

Furthermore, the pre-incubation of PaBADH or of chBADH with NAD(P)H results in a progressive loss of both the dehydrogenase and the esterase activities (Fig. 3B) [Mújica-Jiménez, Díaz-Sánchez, Montiel, Muñoz-Clares, unpublished results]. The extent and the rate of inactivation depends on NAD(P)H concentration in a hyperbolic manner, which is consistent with a reversible mechanism of inactivation where the rapid binding of the nucleotide is followed by a slower unimolecular change—conformational or chemical—that leads to the inactive enzyme.



A full recovery of activity of the pre-incubated enzyme was observed after removal of NAD(P)H by dilution, indicating the reversibility of the inactivation. The inactive enzymes, however, did not recover any activity if assayed at the same NAD(P)H concentration at which they were pre-incubated or if left in the presence of an excess of NAD(P)⁺ for an extended period of time (up to 24 h). Once again, this indicates that NAD(P)⁺ is unable to counteract the inhibitory effects of NAD(P)H on these enzymes.

In chemical modification studies of PaBADH, chBADH and porcine kidney BADH it was found that pre-incubation with either NAD(P)⁺ or NAD(P)H resulted in a significantly decreased reactivity of the essential thiolate [46–48]. These findings suggest that binding of the nucleotides induced slow changes in the enzymes, which result in either an increase in the thiol pK_a and/or in a decrease in its accessibility to the solvent. It is likely that these changes correspond to the nucleotide-induced inactivation of the BADHs. Interestingly, opposite changes—increased reactivity of the catalytic cysteine and a decreased pK_a of this residue—after incubation with NAD(P)⁺ or NAD(P)H were observed in the non-phosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans* (SmGAPN) [49], indicating important differences in the environment of the catalytic cysteine between this enzyme and the BADHs. In SmGAPN, the effects of NAD(P)⁺ can be partially explained by stabilization of the thiolate form by the positive charge of the nicotinamide ring, but structural changes induced by both the oxidized and reduced nucleotides are likely to be the major contributors to the observed effects.

The conformational changes suggested by these studies presumably only involve the catalytic cysteine and/or of a few other active site residues. Since the determination of one of the first ALDH crystal structures it was known that there are no large conformational differences between the apo and holo forms of the enzyme [50]. This was confirmed with several other ALDHs structures, including those of cod liver BADH [10] and PaBADH [27, and pdb 2wox].

Chemical mechanism

As every known ALDH, BADH enzymes use covalent catalysis to irreversibly oxidize their aldehyde substrates to the corresponding acid with the concomitant reduction of NAD(P)⁺. Some ALDHs also exhibit a non-physiological esterase activity towards 4-nitrophenyl esters [32,51]. Both activities, dehydrogenase and esterase, take place at the same active site [32]. Among the BADHs, the esterase reaction has been investigated only in the bovine liver enzyme [52], where it was not detected, and in PaBADH, which

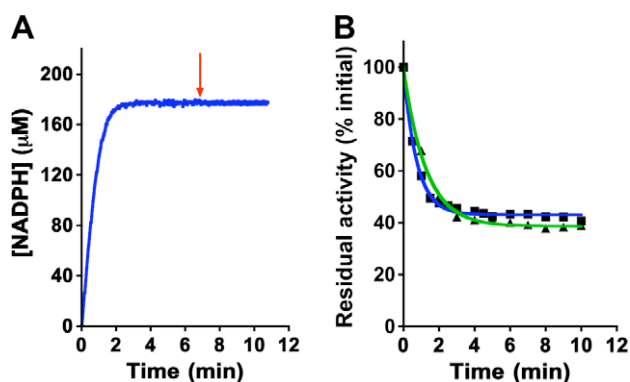


Fig. 3. PaBADH inactivation by NAD(P)H under catalytic and non-catalytic conditions. (A) Time-course of the NADP⁺-dependent dehydrogenase reaction performed at pH 8.0 with 2 mM NADP⁺ and 2 mM betaine aldehyde in the assay medium. The production of NADPH stopped when only $\approx 10\%$ of the substrate has been consumed. No enzyme activity was recovered after addition of fresh NADP⁺ and betaine aldehyde to the assay medium, to make a final concentration of 4 mM for each substrate, at the time marked by the arrow. (B) Pre-incubation with 175 μ M NAD(P)H produced a loss of the dehydrogenase (blue line, solid squares) and esterase (green line, solid circles) activities, following pseudo-first order kinetics. The activity data were fitted to a single exponential decay equation; the lines are the theoretical resulting from the fit. The estimated rate constants of enzyme inactivation are 1.3 and 0.8 s⁻¹ for the dehydrogenase and esterase reactions, respectively.

exhibits a significant esterase activity [Díaz-Sánchez, Muñoz-Clares, unpublished results].

The ALDH reaction mechanism was proposed [32] and later proved [53] to be analogous to that of the phosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [54], involving intermediates covalently bound to the enzyme as a result of the nucleophilic addition of the substrate to the catalytic cysteine (Fig. 4). This acylation step changes the carbonyl carbon from trigonal to tetrahedral thus facilitating either the transfer of the hydride from the aldehyde to NAD(P)⁺, or the heterolytic breakage of the C–O single bond in the

ester, steps both that would be otherwise difficult to achieve given that the carbon of the carbonyl group is deficient in electrons. The resulting oxyanion, or its protonated form, is stabilized in the “oxyanion hole” by hydrogen bond formation with the side-chain amide nitrogen of a strictly conserved asparagine residue (N169 in ALDH2) and the NH-group of the polypeptide main chain of the catalytic cysteine (C302 in ALDH2) [10,50,55]. In the dehydrogenase reaction, the hemithioacetal is oxidized to a thioester by transfer of the hydride to the C-4 position of the nicotinamide ring of NAD(P)⁺ (Fig. 4A), whereas in the esterase reaction the hemithioacetal

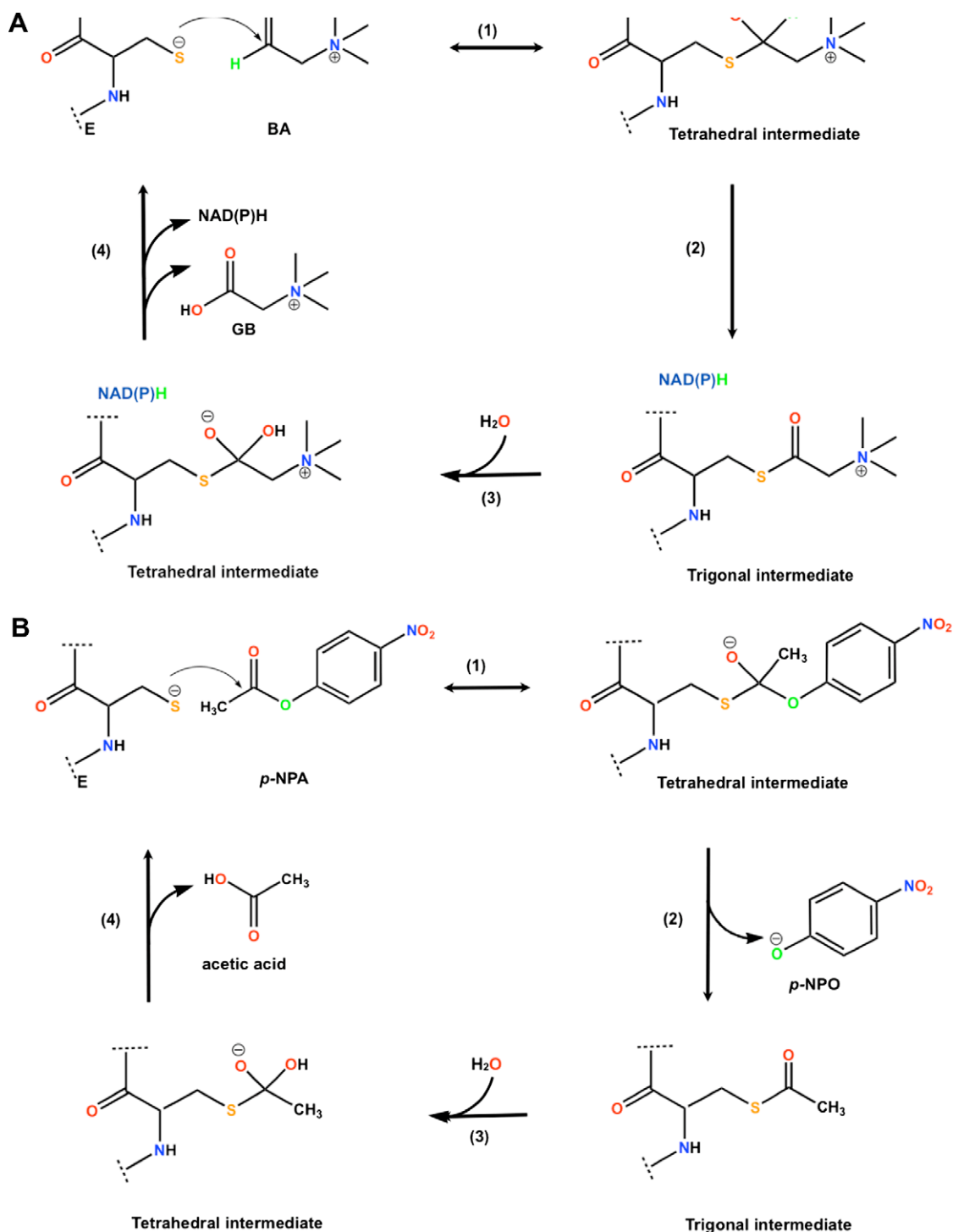


Fig. 4. Minimal scheme for the chemical mechanism of the dehydrogenase (A) and esterase (B) reactions. (A) The reaction steps are: acylation (1); hydride transfer (2); deacylation (3); release of products (4). (B) The reaction steps are: acylation (1); rupture of the ester bond (2); deacylation (3); release of the acid product (4).

collapses to a thioester and an alcohol, which is released (Fig. 4B). Then, a water molecule acting as a nucleophile breaks the thioester bond by means of the formation a second tetrahedral intermediate, which then collapses forming the acid product of both reactions and regenerating the free thiolate. Finally, the acid is released from the enzyme, followed by the reduced nucleotide in the case of the dehydrogenase reaction.

The chemical mechanism of the ALDHs thus involves two nucleophilic attacks, one occurring in the acylation step, carried out by the thiol group of the catalytic cysteine, and the other in the deacylation step, carried out by a water molecule. It is widely accepted that both nucleophiles require to be “activated”, i.e., deprotonated, for the enzyme to be active at physiological pH. By chemical modification studies carried out in ALDH2 [56], E268 was identified as the general base that takes the proton from both the thiol group of the cysteine and from the hydrolytic water molecule. In this and other ALDHs, this was later confirmed by mutagenesis studies [36,57–59] and crystallography [50,59,60]. However, whereas the participation of the glutamate equivalent to E268 in the deacylation step of every ALDH is well accepted, its participation in the acylation step appears to be not so general. Thus, E333 (E399 in ALDH2)—a conserved residue involved in the binding of the nicotinamide ribose [61,62]—was proposed to be the general base that activate the cysteine in ALDH3 [63], a proposal made on the basis of the crystal structure [61] and later supported by mutagenesis of this residue [64]. Crystallographic data obtained in SmGAPN indicate that in this enzyme the glutamate equivalent to E268 only participates in the deacylation step [65]. Moreover, in the latter enzyme [49] and in PaBADH [Mújica-Jiménez, Muñoz-Clares, unpublished results] the mutation of this glutamate equivalent to E268 did not affect the pK_a of the catalytic cysteine either in the apo or holo forms of these enzymes. The major factor contributing to the activation of the cysteine in these enzymes is still unknown. What it is clear from the ALDH crystal structures is that this factor is none of those so far found in other enzymes [66–68], since there is no positive charged residues in the proximity of the cysteine, nor is this residue placed near the N-terminus of an α -helix. It also remains to be explained which protein group or water molecule takes the proton released by the activated thiol in those ALDHs where it appears not to be taken by the catalytic glutamate. On the other hand, the mutation of the glutamate equivalent to E268 to an alanine produces a 150-times decrease of the PaBADH-activity and makes the deacylation step rate limiting [Díaz-Sánchez, Mújica-Jiménez, Muñoz-Clares, unpublished results], thus confirming the participation of the glutamate in the activation of the hydrolytic water molecule involved in the deacylation step of this enzyme, as previously found in other ALDHs [36,57,58].

Regarding the hydrolytic water molecule involved in the deacylation steps of ALDHs it has to fulfill three requirements (1) to be in the appropriate position to perform the nucleophilic attack on the carbonyl carbon of the thioester intermediate; (2) to be close to a group that could produce its activation—i.e., to decrease its pK_a so it can be deprotonated at a physiological pH value—; (3) to be at a hydrogen bonding distance of the catalytic glutamate, to which it transfers the proton. To date, there are only one crystal structure that show a water molecule fulfilling the three requirements, that of PaBADH in complex with NADPH, as will be described below.

Structure

The first BADH sequence was determined in 1990 [69] but to date the only BADH three-dimensional structures determined are those of the cod liver enzyme [10] with and without NAD⁺ [pdb entries 1bpw and 1a4s, respectively], those of PaBADH [27] in complex with NADP⁺ or with NADPH [pdb entries 2wme and 2wox,

respectively], and those of the apo and holo forms of BADH from *Staphylococcus aureus* (SaBADH, pdb entries 3ed6 and 3fg0, respectively). These enzymes have the protein fold characteristic of every ALDH regardless of their association state [50,61]. The subunit consists of three domains: the N-terminal coenzyme-binding domain, the catalytic domain, and the oligomerization domain (Fig. 5). The oligomerization domain is an extension of the coenzyme-binding domain, which explains the important effects that the coenzyme has on the maintenance of the quaternary structure of PaBADH [44].

The PaBADH structures showed two K⁺ ions binding sites per subunit (Fig. 5). One is located inside an intra-subunit cavity present in all known ALDH crystal structures [27]. This cation-binding site is the same as the one described for a Na⁺ ion in ALDH2 [70], where it was suggested that it contributes to the optimal active-site conformation for the binding of the nucleotide. This role, however, has not been experimentally confirmed as yet. The other cation-binding site—not described before but recently found in SaBADH and most likely present in most ALDHs—is located between monomers in a dimeric unit in a region involved in coenzyme binding and catalysis. The inter-subunit K⁺ ion is involved in a net of interactions that stabilize the dimer, which explains the effects of K⁺ ions on the activity and the stability of PaBADH [12,44,71]. Moderate concentrations of monovalent cations activate other BADHs [11,14–16] to different degrees, but in addition to PaBADH only the kidney and chloroplastic enzymes have been tested for stability in the absence of these cations. The dimeric chBADH is not dependent on these cations for maintaining its dimeric native structure, whereas the tetrameric porcine kidney BADH showed a tendency to dissociate in the absence of cations, but to a lesser degree than PaBADH does [12].

Catalytic cysteine and glutamate residues

In the known crystal structures of ALDHs, the catalytic cysteine adopts two main conformations (Fig. 6A and B), named the “attack-



Fig. 5. Three-dimensional structure of PaBADH. Three of the four monomers are depicted as cyan, blue and red ribbon diagrams. The fourth monomer is depicted as a cartoon diagram showing the catalytic domain in green, the coenzyme-binding domain in yellow, and the oligomerization domain in magenta. The intra-subunit K⁺ ions are depicted as purple balls, and the inter-subunit K⁺ ions are depicted as orange balls. The figure was generated with the crystal coordinates in the pdb entry 2wme [27] using PyMOL [The PyMOL Molecular Graphics at: <http://www.pymol.org>].

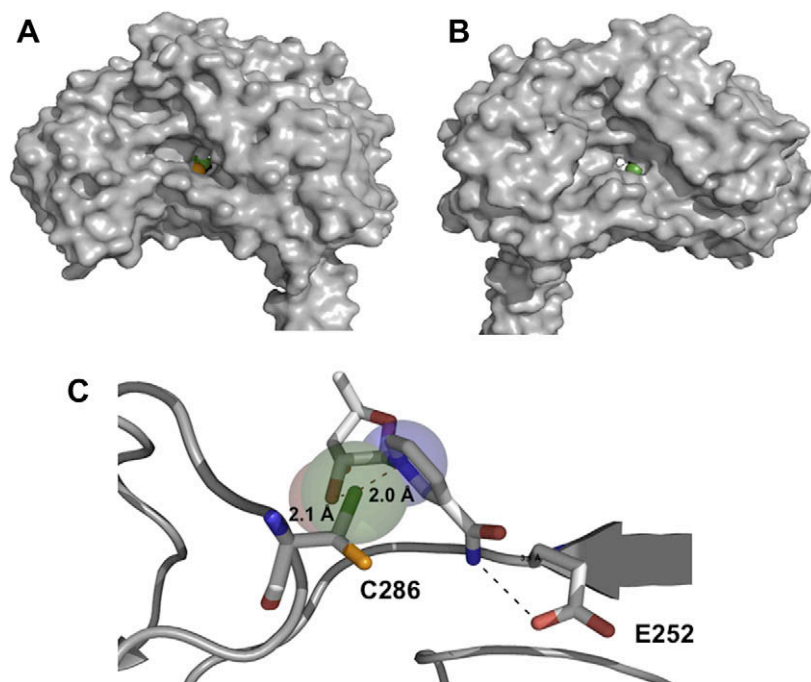


Fig. 6. Conformations of the catalytic cysteine in PaBADH. (A) Monomer depicted as surface showing the attacking (orange ball) and resting (green ball) conformations of the catalytic cysteine as viewed from the aldehyde entrance to the active site. (B) Monomer depicted as surface showing the resting conformation of the catalytic cysteine (green ball) as viewed from the nucleotide entrance to the active site. The resting conformation is the one accessible from the nucleotide entrance to the active site while the attacking conformation is that accessible from the aldehyde entrance. (C) Close-up of a region of the active site showing the steric clashes that would occur between the oxidized nicotinamide and the catalytic cysteine in the resting conformation. The red, blue and green semitransparent spheres represent the van der Waals surface of the nicotinamide ribose O2D, nicotinamide ring N1N, and the cysteine SG in the resting conformation, respectively. In the figure, the catalytic residues are from PaBADH (pdb entry 2wme) and the docked nicotinamide ribose and nicotinamide ring are from bovine ALDH2 (pdb entry 1a4z). The figure was generated using PyMOL [The PyMOL Molecular Graphics at: <http://www.pymol.org>].

ing” and “resting” conformations [27] because only the thiol group of the first is in the appropriate position to perform the nucleophilic attack on the aldehyde substrate [10,50,55,59,72–74] whereas it is not in the second conformation [27,55,59,72,73,75]. In the attacking conformation the thiol group should be optimally positioned to be reactive. An examination of the known ALDHs structures shows that in this conformation the sulfur is at hydrogen bond distances of the main chain NH groups of the catalytic cysteine itself and of the next residue in the sequence. These two interactions should significantly decrease the pK_a of the thiol group, as suggested [50], thus facilitating its deprotonation and the nucleophilic attack. Furthermore, in this conformation the thiolate form could be stabilized by the proximity of the positive charge of the oxidized nicotinamide [10,50]. This is because in the resting position the side chain of the catalytic cysteine clashes with the nicotinamide ring of $NAD(P)^+$ (Fig. 6C), which on binding therefore pushes the cysteine from the resting to the attacking position [55,73]. This is the reason why the cysteine is always in the attacking position in those holo structures which have the oxidized nicotinamide ring inside the active site, in the appropriate position for hydride transfer [70,76–78]. But the contrary is not always true; i.e., not every apo form has the cysteine in the resting position. For instance, the five apo structures of ALDH2 so far deposited in the Protein Data Bank have the cysteine in the attacking conformation [pdb entries 1ag8, 1o05, 1zum, 2ono, 2onn]. Moreover, other ALDH holo structures—which can be considered as apo-like structures because their oxidized or reduced nicotinamide ring is outside the active site—have the attacking conformation [76,61,60,79,70,72,80,74,59] notwithstanding that the nicotinamide is in a position where it would not clash with the cysteine side chain in the resting conformation [pdb entries 1eyy, 1ad3, 1bxs, 1cw3, 1o01, 1o02, 1nzz, 1wnb, 2onm, 2onp, 2imp, 2ilu]. In

these enzymes, the latter appears to be the more stable of the two conformations, even in the absence of the nucleotide. This is also true for cod liver BADH (pdb entry 1a4s). On the contrary, the $NADP^+$ and $NADPH$ holo structures of PaBADH show the cysteine mainly in the resting position. In the apo-like PaBADH- $NADP^+$ structure the oxidized nicotinamide is not seen in the crystal [27], but in the PaBADH- $NADPH$ structure [pdb entry 2wox] the reduced nicotinamide ring is well inside the active site in a position similar to that of the oxidized ring in other ALDHs that have the cysteine in the attacking conformation [pdb entries 1ez0, 1bpw, 1a4z, 2euh, 2ehq, 2o2q 2bhp]. In fact, in the crystal structure of the binary PaBADH- $NADPH$ complex the clash between the sulfur and the nicotinamide ring resulted in the formation of a covalent adduct (see below). It appears, therefore, that in some ALDHs one conformation of the catalytic cysteine is preferred to the other, while in other ALDHs there is not clear preference.

This preference or lack of preference may have mechanistic and regulatory consequences. It is likely that the transfer of the proton from the thiol to the catalytic glutamate, when in the inside position (see below), only takes place when the cysteine is in the attacking conformation. This is because the distance between the two groups interchanging the proton is smaller than when the cysteine is in the resting conformation, and because the thiol group will be activated, i.e., its pK_a is decreased, only when in the attacking position, as discussed above. This could explain why in the ALDHs in which the attacking appears to be the more stable of the two conformations of the catalytic cysteine, the catalytic glutamate does play a role in the acylation step [57–59], while in those enzymes in which the resting appears to be the more stable conformation of the catalytic cysteine, as in PaBADH, the glutamate does not play such role. Also, because the accessibility and reactivity of the thiol sulfur is not the same in the two conformations, enzyme

inactivation by chemical modification of this cysteine will be monophasic in those enzymes that have the cysteine predominantly in one conformation, whereas it will be biphasic in those enzymes that can have the two conformations if the rate of interconversion between these two conformations is slow compared to the rate of inactivation. PaBADH exhibits monophasic inactivation kinetics [46,81], which is consistent with its preference for the resting conformation, while chBADH has biphasic kinetics [47], which suggests that its cysteine exists in the two conformations. In the latter case, however, other explanations—such as the chemical modification of nonessential but solvent accessible cysteine residues, which may affect the reactivity of the catalytic residue—cannot be ruled out given the lack of structural data.

The catalytic glutamate equivalent to E268 of ALDH2 has been found in three main different stable conformations, named “inside”, “intermediate” and “outside” [27]. In the inside conformation—observed in apo or apo-like structures—its carboxylic group is pointing towards the catalytic cysteine [55,59,70,72–74], in some cases forming a weak hydrogen bond with the sulfur and thus potentially being capable of accepting the proton from the thiol group in the acylation step of the reaction. It has also been observed hydrogen bonded to a water molecule proposed to be the hydrolytic one [73]. In most of the crystals in which this conformation has been observed, it is stabilized by a hydrogen bond of the glutamate with the main chain nitrogen of the residue equivalent to G270 (ALDH2 numbering) [pdb entries 1nzw, 1wnb, 1wnd, 2hg2, 2imp, 2ilu, 2o2p, 2o2r, 1uzb, 2bja, 2bhq, 3ed6, 3fg0, which correspond to ALDH2, the YdcW aminoaldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*, lactaldehyde dehydrogenase, 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (FDH), Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* (TtP5CDH), and SaBADH]. This interaction is possible because in these crystals the peptide bond between the residue equivalent to L269 and G270 is rotated with respect to the one observed in those structures that do not have the glutamate in the inside position.

Because in the inside position the side chain of the glutamate would sterically interfere with the appropriate positioning of the nicotinamide ring of the nucleotide, the glutamate has to move to the intermediate conformation—which is the most frequent conformation found in ALDH crystals—on binding of NAD(P)⁺, presumably taking with it the proton abstracted from the cysteine. Indeed,

a survey of the ALDHs structures deposited in the PDB showed that the glutamate in the intermediate conformation is protonated even at pH 7.5, as indicated by the existence of a strong hydrogen bond between this glutamate and the oxygen of the main chain carbonyl group of a nearby residue [27]. This hydrogen bond is present in every ALDH crystal structure that has the glutamate in the intermediate position, including those of cod liver BADH and PaBADH (Fig. 7A). In this conformation the glutamate is at ≈ 7 Å from the catalytic cysteine, in an adequate position for its participation in the deacylation step by accepting a proton from the water molecule observed in some of these structures close to the carboxylic group [pdb entries 1ad3, 1a4s, 1o01, 2wme] and postulated to be the hydrolytic one [27,50].

Finally, in the outside conformation, observed in the PaBADH–NADP⁺ crystal [27], the carboxylic group of the glutamate is near the amino group of K162 (K178 in ALDH2), which is almost equidistant from E252 (E268 in ALDH2) and from the carboxylic group of the neighbor E464 (E476 in ALDH2) (Fig. 7B). Because of their position relative to the positive charge of K162, both glutamates should have the same pK_a and their protonation states can be interchanged, so that the proton initially in E252 ends in a water channel to which E464 is connected and that extend to the protein surface [27]. This proton relay system allows the release of the proton that E252 takes from the hydrolytic water. In this conformation the glutamate is also stabilized by a hydrogen bond with the side chain of T228 (T244 in ALDH2), a residue which has been proposed to participate in the correct positioning of the nicotinamide ring of NAD(P)⁺ for efficient hydride transfer [65,82,83]. Of the three conformations that the glutamate can adopt, the outside conformation should be the most transitory one because the rapid transfer of the proton to the water produces two negatively charged carboxylates that repel each other. This may be the reason, at least in part, why of all other ALDHs structures so far determined the outside conformation was only observed in those of a mutant ALDH2 [pdb entries 1zum and 2onp].

Nucleotide binding site

The coenzyme-binding domain of BADH enzymes, similarly to those of the other ALDHs [61], lacks the last $\alpha\beta$ unit of the typical Rossmann fold [84,67] described for alcohol dehydrogenases [85].

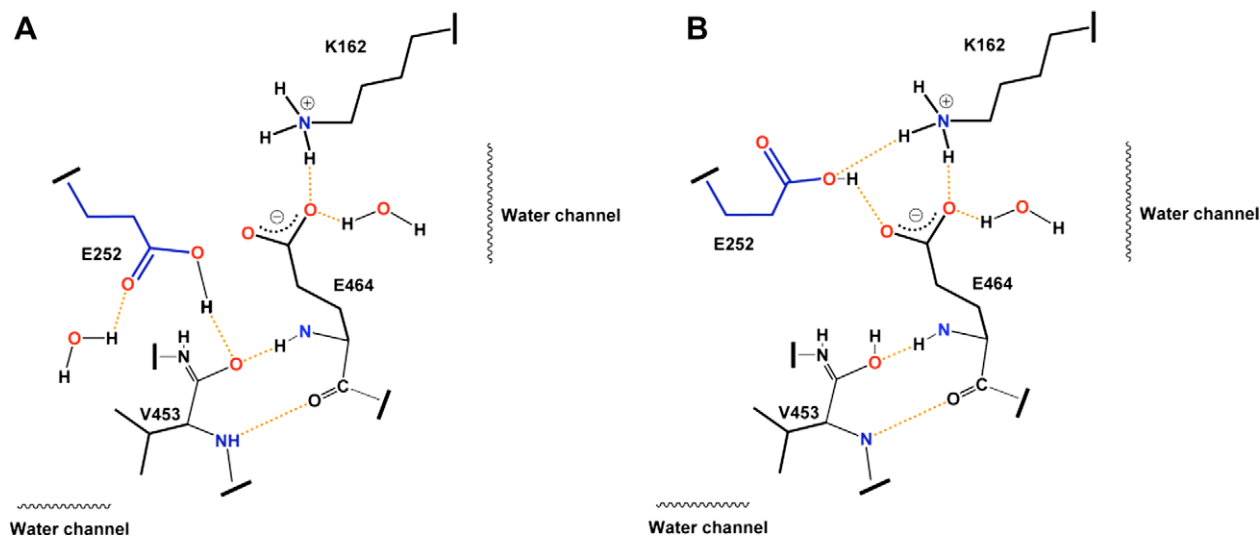


Fig. 7. Schematic representation of the two conformations of the catalytic glutamate observed in PaBADH. (A) In the intermediate conformation the OE1 of E252 (E268 in ALDH2) forms a hydrogen bond with the hydrolytic water molecule, and the OE2 with the main chain carbonyl of V453 (F465 in ALDH2). In this conformation the glutamate participates in the deacylation step accepting a proton from the hydrolytic water. (B) In the outside conformation the OE1 is forming hydrogen bonds with the side chain amino group of K162 (K178 in ALDH2) and with the OE2 of E464 (E476 in ALDH2) to which it transfers the proton taken from the water. In the outside conformation the catalytic glutamate participates in the proton relay mechanism [27].

The mode of binding of the adenosine moiety of the nucleotides, very conserved in ALDHs, mainly involves hydrogen bonds between some enzyme residues and the hydroxyl groups of the adenosine ribose [50,61,86]. Not so conserved is the mode of accommodating the 2'-phosphate group in those few ALDHs that bind NADP(H). In most of the pyridine nucleotide-dependent dehydrogenases that prefer NAD⁺ to NADP⁺ there is a negative charged amino acid residue—the glutamate equivalent to E195 of ALDH2 in the case of the ALDHs [10,50,60,61,72,74]—interacting with the adenosine ribose, while this residue is a non-charged one in NADP(H)-dependent dehydrogenases [87]. Accordingly, those ALDHs that bind NADP⁺ with higher affinity than NAD⁺ have a non-charged residue at a position equivalent to that of E195 [55,59,76,78,88] (Fig. 8A). But the NAD(P)⁺-dependent PaBADH instead of changing this glutamate keeps its carboxyl group away from the 2'-phosphate of the adenosine ribose by means of a strong ionic interaction with a nearby arginine residue [27] (Fig. 8B). This novel way of binding the 2'-phosphate group of NADP⁺—not described before for any pyridine dehydrogenase—provides the enzyme with a mechanism to switch between the NAD⁺-binding and the NADP⁺-binding conformations. The arginyl residue equivalent to R40 of PaBADH is only found in 0.4% of the known ALDH sequences [Martínez-Castilla, personal communication]. We predict that these are amphibolic enzymes able to use both NAD⁺ and NADP⁺ with similar catalytic efficiency, as does PaBADH. Indeed, this has been experimentally found in a sorbosone dehydrogenase [89]. A third solution to the binding of the 2'-phosphate of NADP⁺ was observed in the crystal structure of TtP5CDH, obtained at pH 5.5, where the glutamyl equivalent to E195 forms a hydrogen bond with the phosphate group of the nucleotide [75] (Fig. 8C). Clearly, either the carboxylic or the phosphate group had to be pro-

tonated. Finally, it is interesting that cod BADH, which is a NAD⁺-dependent enzyme, has a bulky proline residue in the position equivalent to E195 (Fig. 8D) [10]. Therefore it discriminates between NAD⁺ and NADP⁺ by means of steric rather than electrostatic repulsion. This solution has been apparently adopted by ≈7% of the ALDHs [Martínez-Castilla, personal communication].

The interactions between the ALDHs and the nicotinamide moiety of the nucleotide are fewer than between the enzyme and the adenine moiety. This results in high flexibility of this portion of the molecule [60,90], as to the point of the nicotinamide moiety not being observed in a number of crystal structures, including that of the binary PaBADH–NADP⁺ complex [27]. The movement of the nicotinamide ring in the active site of ALDHs was proposed to be necessary for the correct positioning of the catalytic residues and the hydrolytic water during the course of the reaction [50,60]. The nicotinamide moiety of the coenzyme is thought to adopt two positions, named the “hydride transfer” and the “hydrolysis” conformations [70] because of the catalytic step to which they have been associated. The first, which allows the efficient hydride transfer from the thiohemiacetal to the C4 of the nicotinamide ring, is adopted by NAD(P)⁺, while the second, in which the nicotinamide ring has moved away from the position it occupies in the hydride transfer conformation leaving room for the hydrolytic water molecule so that the deacylation step can take place, is adopted by NADH. But whereas the hydride transfer conformation is the same in every ALDH crystal with NAD(P)⁺ bound [10,50,59,70,73,75–78], the hydrolysis conformation of NAD(P)H is in fact an ensemble of conformations, ranging from one similar to the hydride transfer [78] to one in which the nicotinamide is totally out of the active site and no electronic density can be associated with it [59,73,76,78,80,91]. In-between these two limiting conformations

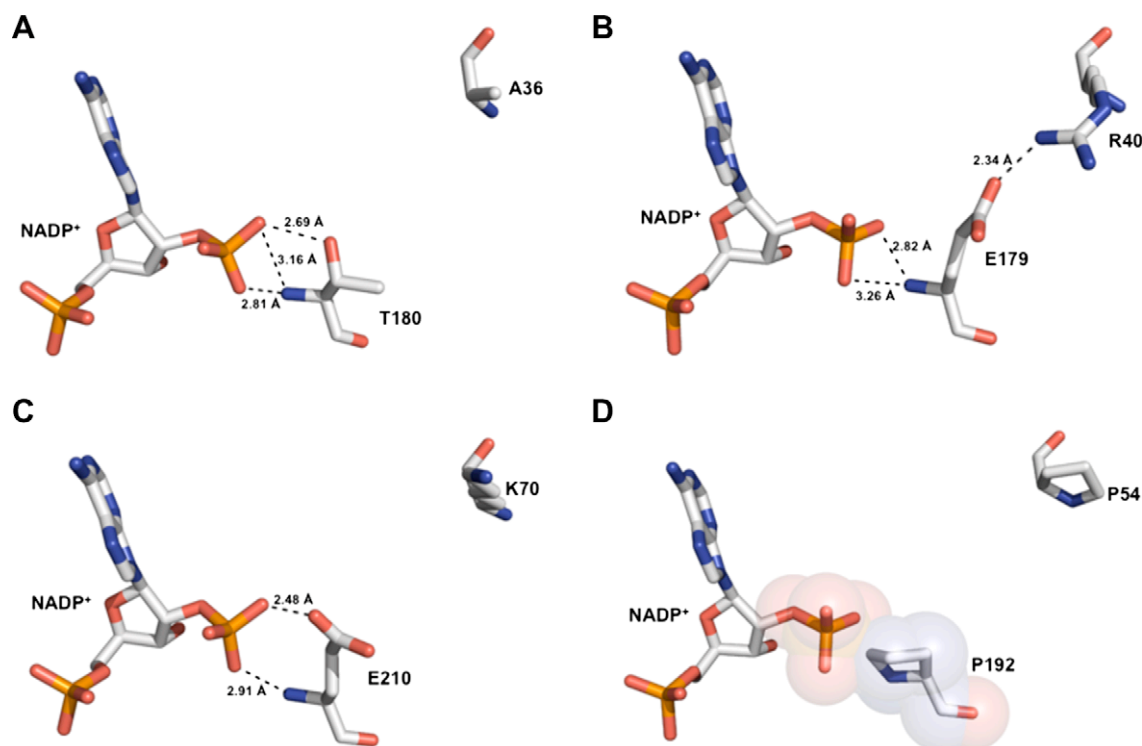


Fig. 8. Different modes of binding of NAD(P)⁺ by ALDH enzymes. (A) Binding of the 2'-phosphate group of NADP⁺ in the NADP⁺-dependent SmGANP (55, pdb entry 2euh), which has threonine in the position equivalent to E195 of ALDH2. (B) Binding of the 2'-phosphate group of NADP⁺ in the NAD(P)⁺-dependent PaBADH (27, pdb entry 2wme), which conserves the glutamate present in most of the NAD⁺-dependent ALDH enzymes but avoid electrostatic repulsion with the phosphate group by making an ionic bond to a nearby arginine residue. (C) Binding of the 2'-phosphate group of NADP⁺ in the TtP5CDH [75, pdb entry 2ehq]. The carboxylic group of the glutamate is making a hydrogen bond with the phosphate group. (D) Docking of NADP⁺ in the NAD⁺-dependent cod BADH (10, pdb entry 1pbw), which discriminates against NADP⁺ by steric repulsion of the phosphate group by a proline in the position equivalent to E195 of ALDH2, as depicted in the figure. The figure was generated using PyMOL [The PyMOL Molecular Graphics at: <http://www.pymol.org>].

the reduced nicotinamide has been found at different depths inside the active site depending on the enzyme studied [65, pdb entry 2qi1; 70, pdb entries 1o00, 1o02, 1nzw; 74, pdb entries 2imp, 2ilu; 88, pdb entry 2vro].

The nicotinamide moiety of NAD(P)⁺ in the hydride transfer conformation is stabilized by van der Waals interactions and by hydrogen bonds of its carboxamide nitrogen or oxygen with the carbonyl oxygen or the NH of the peptide bond between the residues equivalent to L269 and G270 in ALDH2. The carbamoyl nitrogen is also hydrogen bonded to the carboxyl group of the catalytic glutamate in the intermediate conformation. Part of these interactions will be weakened upon reduction, when the positive charge of the ring is lost and its geometry changes, thus facilitating the movement of the reduced nicotinamide, which we propose is most likely triggered by a steric clash with the carbonyl carbon, which moves in the direction of the ring when it changes from tetrahedral, in the thiohemiacetal intermediate, to trigonal, in the thioester intermediate. The heterogeneity of conformations adopted by the reduced nicotinamide suggests either that NAD(P)H plays no role whatsoever in the deacylation step, or that the so-called hydrolysis conformation is rather the transitory conformation adopted by the nucleotide in his way out, or in, of the active site. This proposal is in accordance with kinetic experiments that indicated that the nucleotides bind in two consecutive steps [92,93]. It seems reasonable that the real hydrolysis conformation is not stable, as corresponds to a reaction intermediate, because otherwise it would greatly slow down the reaction. These “exit” or “entry” conformations appear to be more stable, and therefore can be observed in the crystal structure. This stability agrees with NAD(P)H not being released from the enzyme as soon as it is formed after hydride transfer, and with the release of the reduced nucleotide being rate-limiting in some ALDHs [93,94]. We propose that the conformation recently observed in the PaBADH structure in complex with NADPH [pdb entry 2wox] is the most similar to the real hydrolysis conformation so far observed in an ALDH crystal. It could be observed in this crystal thanks to a number of lucky, although non-physiological, interactions that led to its stabilization, namely by the covalent adduct formed between the reduced nicotinamide and the catalytic cysteine (see below), and by the strong hydrogen bond made with a glycerol molecule, which in turn was stabilized in the active site for a number of interactions. Of mechanistic relevance is that this hydrolysis conformation indicates an active role of the reduced nucleotide in the deacylation step polarizing, and therefore activating, the hydrolytic water molecule. In this conformation, the reduced nicotinamide is been displaced by only one angstrom with respect to the oxidized one and its carbamoyl nitrogen is hydrogen-bonded to the primary hydroxyl of a glycerol, which mimics the hydrolytic water molecule. As this hydroxyl is also hydrogen bonded to the catalytic glutamate, this finding suggested a mechanism by which NADPH produces the decrease in the water pK_a required for the transfer of the proton to the glutamate. The reduced nucleotides in the other observed hydrolysis conformations are too far away from the putative hydrolytic water found in the same structures to activate them. And these ordered water molecules are not making any other interaction that could account for a decrease in their pK_a.

Cysteine–nicotinamide adducts

For the first time in any pyridine dehydrogenase, the PaBADH structure in complex with NADPH showed the C2 of the reduced nicotinamide ring forming a covalent adduct with the sulfur of the catalytic cysteine in the resting conformation [pdb entry 2wox] (Fig. 9). Adducts formed between the reduced nicotinamide and a hydroxide ion or an amide nitrogen were detected in liver alcohol dehydrogenase [95,96], but an adduct between the reduced

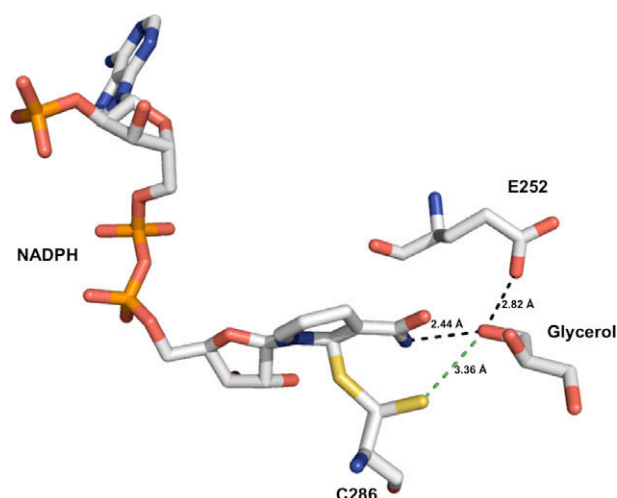


Fig. 9. NADPH–catalytic cysteine adduct of PaBADH. Stick representation of the region of the active site showing the C2 of the reduced nicotinamide ring forming a covalent adduct with the sulfur of the catalytic cysteine in the resting conformation. The figure was generated using the crystal coordinates of the NADPH–PaBADH complex [2wox, unpublished] with PyMOL [The PyMOL Molecular Graphics at: <http://www.pymol.org>].

nucleotide and a protein thiol had not been described before, not only in ALDHs but in any pyridine dehydrogenase, nor with a low molecular weight thiol. An adduct between the catalytic cysteine and the C4 of the nicotinamide moiety of NAD(P)⁺ was found in FDH [59] and predicted to form in ALDH₂ on the basis of QM–MM calculations [97]. On the basis of the spectroscopic signatures of the nicotinamide–thiol adducts, it was concluded that both PaBADH and chBADH can form adducts with both NAD(P)⁺ and NAD(P)H [Díaz-Sánchez, Montiel, Muñoz-Clares, unpublished results].

The catalytic cysteine in the attacking conformation cannot form adducts with the reduced nucleotides, because the sulfur is too far away from the C2 of the nicotinamide ring, which is the reactive carbon in NAD(P)H. Therefore, although the ability to form adducts with the oxidized nicotinamide maybe a general feature of ALDHs, those of them in which the cysteine appears to be exclusively in the attacking conformation—such as ALDH₂—would not form adducts with the reduced nicotinamide, which is consistent with the fact that none have been detected in spite of the considerable number of ALDH₂ structures so far determined. On the contrary, those enzymes that have their catalytic cysteine preferentially in the resting conformation—such as PaBADH—would readily form adduct with the reduced nucleotides. This property is most likely one of the reasons why a conformation of NADPH compatible with its possible role in the deacylation step could be observed in this enzyme.

Formation of cysteine–nucleotide adducts inactivates the enzyme, which accounts for the inactivation of PaBADH and chBADH by pre-incubation with the nucleotides [Díaz-Sánchez, Montiel, Muñoz-Clares, unpublished results]. But the adducts are fully reversible by removal of the nucleotides, or by adding the aldehyde substrate in the case of the NAD(P)⁺ adducts, as observed in FDH [59]. The catalytic cysteine–nucleotide adducts also explains the decreased reactivity of the cysteine observed in PaBADH when the modification reaction is performed in the presence of nucleotides [46], which may prevent its oxidation *in vivo* and therefore enzyme inactivation, as proposed [97].

The cysteine–NAD(P)H adducts can form under turnover conditions—although they are not intermediates in the catalytic cycle—if the catalytic cysteine goes to the resting conformation after the hydrolysis of the thioester and before the NAD(P)H exits the active

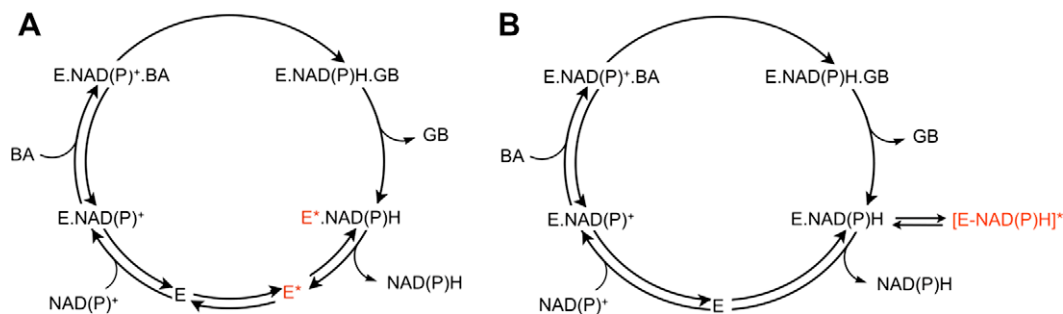


Fig. 10. Different mechanisms to explain the uncompetitive component of the noncompetitive NAD(P)H inhibition versus NAD(P)⁺. (A) Proposed iso-mechanism [29] requiring an isomerization step of the free enzyme. E* denotes the enzyme conformation that binds NAD(P)H but not NAD(P)⁺. (B) Proposed mechanism of enzyme inactivation by formation of NAD(P)H–catalytic cysteine adduct, which removes active enzyme from the normal catalytic cycle. [E-NAD(P)H]* denotes the inactive form of the enzyme with NAD(P)H bound. The latter mechanism also accounts for the progressive, reversible inactivation of the enzyme during the course of the reaction [Díaz-Sánchez, Muñoz-Clares, unpublished results].

site, so that there is the possibility that its sulfur encounters the nicotinamide ring and forms the inactive adduct. The enzyme will be therefore inactivated as the reaction progresses, and eventually the inactive adduct will account for the whole amount of enzyme present. This would account for the inactivation observed during the course of the reaction in PaBADH and chBADH [Díaz-Sánchez, Montiel, Muñoz-Clares, unpublished results]. Furthermore, formation of the inactive cysteine–NAD(P)H adducts during the course of the reaction maybe the cause of other kinetic peculiarities of the BADH enzymes, such as the uncompetitive component in the inhibition of the reduced against the oxidized nucleotide and the substrate inhibition by NAD(P)⁺. The decrease of V_{\max} caused by NAD(P)H rather than being the result of the binding of the reduced and oxidized nucleotides to different free enzyme forms, as predicted by the postulated iso-mechanism [29], could arise from the loss of active enzyme during catalysis because of the inactivating side reaction that leads to the adduct, as depicted in Fig. 10. If proved, this mechanism would constitute a novel way of adding an uncompetitive component to a competitive inhibition. Since it is known that uncompetitive inhibitors are more effective than competitive ones [98], this could be the way of increasing the effectiveness of the reduced nucleotides as inhibitors of the reaction catalyzed by BADHs. Therefore, the ability of certain BADHs, and probably other ALDHs, to form cysteine–nucleotide adducts may have important regulatory implications because it provides a safety valve by which the enzyme activity can be efficiently stopped if there is danger of depletion of the oxidized nucleotide. An irreversible reaction, as the one catalyzed by ALDH enzymes, could totally deplete the NAD(P)⁺ pool of the cell or of the cellular organelle where it takes place, or could alter the ratio NAD(P)⁺/NADPH with adverse consequences, unless there are efficient mechanisms to control them. This is particularly important in the case of BADH enzymes that produce the osmoprotectant glycine betaine—a compound that must reach very high concentrations to exert its protective effect—and of those enzymes participating in the catabolism of choline. If the reactions that re-oxidize the reduced nucleotides are slower than the rate of production of these nucleotides in the BADH reaction, and therefore the levels of the reduced nucleotides build-up, the transitory inhibition of the enzyme will give the necessary time for the recycling of the NAD(P)H formed.

Acknowledgments

The authors work reported here have been supported by Grants to R.A.M.C. from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT N9209, 37820, and 59654 Grants) and by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA

IN210198, IN221001, IN206505, and IN20478 Grants). We are also grateful to Dr. L.P. Martínez-Castilla, Faculty of Chemistry, UNAM, for his help with the phylogenetic studies and to C. Mújica-Jiménez for his skillful technical assistance.

References

- [1] E.S. Courtenay, M.W. Capp, C.F. Anderson, M.T. Record Jr., *Biochemistry* 39 (2000) 4455–4471.
- [2] L.N. Csonka, *Microbiol. Rev.* 53 (1989) 121–147.
- [3] A. Garcia-Perez, M.B. Burg, *Physiol. Rev.* 71 (1991) 1081–1115.
- [4] D. Rhodes, A.D. Hanson, *Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44 (1993) 357–384.
- [5] J.A. Muntz, *J. Biol. Chem.* 182 (1950) 489–499.
- [6] R. Velasco-García, M.A. Villalobos, M.A. Ramírez-Romero, C. Mújica-Jiménez, G. Iturriaga, R.A. Muñoz-Clares, *Arch. Microbiol.* 185 (2006) 14–22.
- [7] A. Julián-Sánchez, H. Riveros-Rosas, L.P. Martínez-Castilla, R. Velasco-García, R.A. Muñoz-Clares, in: H. Weiner, B. Plapp, R. Lindahl, E. Maser (Eds.), *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, vol. 13, Purdue University Press, West Lafayette, IN, 2007, pp. 64–76.
- [8] F.M. Vaz, S.W. Fouchier, R. Ofman, M. Sommer, R.J.A. Wanders, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 7390–7394.
- [9] N.N. Samsonova, S.V. Smirnov, A.E. Novikova, L.R. Ptitsyn, *FEBS Lett.* 579 (2005) 4107–4112.
- [10] K. Johansson, M. El-Ahmad, S. Ramaswamy, L. Hjelmqvist, H. Jörnvall, H. Eklund, *Protein Sci.* 87 (1998) 2106–2117.
- [11] P. Falkenberg, A.R. Strøm, *Biochem. Biophys. Acta* 1034 (1990) 253–259.
- [12] E.M. Valenzuela Soto, R. Velasco-García, C. Mújica-Jiménez, L. Gaviria-González, R.A. Muñoz-Clares, *Chem. Biol. Interact.* 143–144 (2003) 139–148.
- [13] E.A. Weretilnyk, A.D. Hanson, *Arch. Biochem. Biophys.* 271 (1989) 56–63.
- [14] E.M. Valenzuela-Soto, R.A. Muñoz-Clares, *J. Plant Physiol.* 143 (1994) 145–152.
- [15] J. Boch, G. Nau-Wagner, S. Kneip, F. Bremer, *Arch. Microbiol.* 168 (1997) 282–289.
- [16] M.K. Chern, R. Pietruszko, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213 (1995) 561–568.
- [17] S.W. Lin, J. Chen, L.C. Hsu, C.-L. Hsieh, A. Yoshida, *Genomics* 34 (1996) 376–380.
- [18] R. Pietruszko, A. Kikonyogo, M.K. Chern, G. Izaguirre, *Adv. Exp. Med. Biol.* 414 (1997) 243–252.
- [19] J.R. Livingstone, T. Maruo, I. Yoshida, Y. Tarui, K. Hirooka, Y. Yamamoto, N. Tsutui, E. Hirasawa, *J. Plant Res.* 116 (2003) 133–140.
- [20] W. Ambroziak, R. Pietruszko, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 13011–13018.
- [21] M. Vojtěchová, A.D. Hanson, R.A. Muñoz-Clares, *Arch. Biochem. Biophys.* 337 (1997) 81–88.
- [22] C. Trossat, B. Rathinasabapathi, A.D. Hanson, *Plant Physiol.* 113 (1997) 1457–1461.
- [23] N. Mori, N. Yoshida, Y. Kitamoto, *J. Ferment. Bioeng.* 73 (1992) 352–356.
- [24] R. Velasco-García, L. González-Segura, R.A. Muñoz-Clares, *Biochem. J.* 352 (2000) 675–683.
- [25] R.A. Muñoz-Clares, E.M. Valenzuela-Soto, in: E. García-Hernández, A. Fernández-Velasco (Eds.), *Advances in Protein Physical Chemistry*, Transworld Research Network, Kerala, India, 2008, pp. 279–302.
- [26] T.L. Fitzgerald, D.L.E. Waters, R.J. Henry, *Plant Biol.* 11 (2009) 119–130.
- [27] L. González-Segura, E. Rudiño-Piñera, R.A. Muñoz-Clares, E. Horjales, *J. Mol. Biol.* 385 (2009) 542–557.
- [28] N. Mori, B. Kawakami, K. Hyakutome, Y. Tani, H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* 44 (1980) 3015–3016.
- [29] E.M. Valenzuela-Soto, R.A. Muñoz-Clares, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 23818–23823 (Erratum: *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 4692).
- [30] J.E. Lee, Y.D. Cho, *Korean Biochem. J.* 26 (1993) 1–7.
- [31] C.G. Figueroa-Soto, E.M. Valenzuela-Soto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269 (2000) 596–603.

- [32] R.I. Feldman, H. Weiner, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 267–272.
- [33] R.C. Vallari, R. Pietruszko, *Arch. Biochem. Biophys.* 212 (1981) 9–19.
- [34] A.J. Rivett, K.F. Tipton, *Eur. J. Biochem.* 117 (1981) 187–193.
- [35] C. Forte-McRobbie, R. Pietruszko, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 2154–2163.
- [36] S. Marchal, S. Rahuel-Clermont, G. Branlant, *Biochemistry* 39 (2000) 3327–3335.
- [37] W.W. Cleland, *Biochim. Biophys. Acta* 67 (1963) 104–137.
- [38] G. Gadda, P.F. Fitzpatrick, *Biochemistry* 39 (2000) 1400–1405.
- [39] L.M. Fisher, W.J. Albery, J.R. Knowles, *Biochemistry* 25 (1986) 2529–2537.
- [40] D.B. Northrop, K.L. Rebbholz, *Arch. Biochem. Biophys.* 342 (1997) 317–321.
- [41] J. Perozich, I. Kuo, B.C. Wang, J.S. Boesch, R. Lindahl, J. Hempel, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 6197–6203.
- [42] R.A. Muñoz-Clares, M. Vojtěchová, C. Mújica-Jiménez, R. Rodríguez-Sotres, *Adv. Exp. Med. Biol.* 414 (1996) 261–268.
- [43] R.A. Muñoz-Clares, C. Mújica-Jiménez, *Chem. Biol. Interact.* 130–132 (2001) 1–3.
- [44] R. Velasco-García, C. Mújica-Jiménez, G. Mendoza-Hernández, R.A. Muñoz-Clares, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 1292–1300.
- [45] M. Vojtěchová, R. Rodríguez-Sotres, E.M. Valenzuela-Soto, R.A. Muñoz-Clares, *Biochim. Biophys. Acta* 1341 (1997) 49–57.
- [46] L. González-Segura, R. Velasco-García, R.A. Muñoz-Clares, *Biochem. J.* 361 (2002) 577–585.
- [47] R.A. Muñoz-Clares, L. González-Segura, C. Mújica-Jiménez, L. Contreras-Díaz, *Chem. Biol. Interact.* 143–144 (2003) 129–137.
- [48] H.G. Ayala-Castro, E.M. Valenzuela-Soto, C.G. Figueroa-Soto, R.A. Muñoz-Clares, *Arch. Biochem. Biophys.* 468 (2007) 167–173.
- [49] S. Marchal, G. Branlant, *Biochemistry* 38 (1999) 12950–12958.
- [50] C.G. Steinmetz, P. Xie, H. Weiner, T.D. Hurley, *Structure* 5 (1997) 701–711.
- [51] R.S. Sidhu, A.H. Blair, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 7894–7898.
- [52] J.D. Hulse, L.M. Henderson, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 1146–1151.
- [53] J. Farres, X. Wang, K. Takahashi, S.J. Cunningham, T.T.Y. Wang, H. Weiner, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 13854–13860.
- [54] E. Racker, J. Krinsky, *J. Biol. Chem.* 198 (1952) 731–743.
- [55] D. Cobessi, F. Tête-Favier, S. Marchal, G. Branlant, A. Aubry, *J. Mol. Biol.* 300 (2000) 141–152.
- [56] D.P. Abriola, A.D. MacKerell Jr., R. Pietruszko, *Biochem. J.* 266 (1990) 179–187.
- [57] X. Wang, H. Weiner, *Biochemistry* 34 (1995) 237–243.
- [58] M. Vedadi, E. Meighen, *Eur. J. Biochem.* 246 (1997) 698–704.
- [59] Y. Tsybovsky, H. Donato, N.I. Krupenko, C. Davis, S.A. Krupenko, *Biochemistry* 46 (2007) 2917–2929.
- [60] S.A. Moore, H.M. Baker, T.J. Blythe, K.E. Kitson, T.M. Kitson, E.N. Baker, *Structure* 6 (1998) 1541–1551.
- [61] Z.J. Liu, Y.J. Sun, J. Rose, C.D. Hsiao, W.R. Chang, I. Kuo, J. Perozich, R. Lindahl, J. Hempel, B.C. Wang, *Nat. Struct. Biol.* 4 (1997) 317–326.
- [62] S. Sheikh, L. Ni, T.D. Hurley, H. Weiner, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 18817–18822.
- [63] J. Hempel, J. Perozich, T. Chapman, J. Rose, J.S. Boesch, Z.J. Lui, R. Lindahl, B.C. Wang, *Adv. Exp. Med. Biol.* 436 (1999) 53–59.
- [64] C.J. Mann, H. Weiner, *Protein Sci.* 8 (1999) 1922–1929.
- [65] K. D'Ambrosio, A. Pailot, F. Talfounier, C. Didierjean, E. Benedetti, A. Aubry, G. Branlant, C. Corbier, *Biochemistry* 45 (2006) 2978–2986.
- [66] L. Polgár, *Biochem. Biophys. Acta* 321 (1973) 639–642.
- [67] T. Kortemme, T.E. Creighton, *J. Mol. Biol.* 253 (1995) 799–812.
- [68] S.W. Griffiths, J. King, C.L. Cooney, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25486–25492.
- [69] E.A. Weretilnyk, A.D. Hanson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 2745–2749.
- [70] S.J. Perez-Miller, T.D. Hurley, *Biochemistry* 42 (2003) 7100–7109.
- [71] G. Garza-Ramos, E. Carrillo-Nava, M. Costas, C. Mújica-Jiménez, R. Velasco-García, R.A. Muñoz-Clares, in: H. Weiner, E. Maser, R. Lindahl, B. Plapp (Eds.), *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, vol. 13, Purdue University Press, West Lafayette, IN, 2007, pp. 83–90.
- [72] A. Gruez, V. Roig-Zamboni, S. Grisel, A. Salomoni, C. Valencia, V. Campanacci, M. Tegoni, C. Cambillau, *J. Mol. Biol.* 343 (2004) 29–41.
- [73] E. Inagaki, N. Ohshima, H. Takahashi, C. Kuroishi, S. Yokoyama, T.H. Tahirou, *J. Mol. Biol.* 362 (2006) 490–501.
- [74] L. Di Constanzo, G.A. Gomez, D.W. Christianson, *J. Mol. Biol.* 366 (2007) 481–493.
- [75] E. Inagaki, N. Ohshima, K. Sakamoto, N.D. Babayeba, H. Kato, S. Yokoyama, T.H. Tahirou, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Crystallogr. Commun.* 63 (2007) 2917–2929.
- [76] B. Ahvazi, R. Coulombe, M. Delarge, M. Vedadi, L. Zhang, E. Meighen, A. Vrieling, *Biochem. J.* 349 (2000) 853–861.
- [77] E. Pohl, N. Brunner, M. Wilmanns, R. Hensel, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19938–19945.
- [78] E. Lorentzen, R. Hensel, T. Knura, H. Ahmed, E. Pohl, *J. Mol. Biol.* 341 (2004) 815–828.
- [79] L. Ni, J. Zhou, T.D. Hurley, H. Weiner, *Protein Sci.* 8 (1999) 2784–2790.
- [80] H.N. Larson, J. Zhou, Z. Chen, J.S. Stamler, H. Weiner, T.D. Hurley, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12940–12950.
- [81] R. Velasco-García, V.M. Chacón-Aguilar, D. Hervert-Hernández, R.A. Muñoz-Clares, *Chem. Biol. Interact.* 143–144 (2003) 149–158.
- [82] K.H. Kwok, T.D. Hurley, H. Weiner, *Biochemistry* 45 (2006) 9445–9453.
- [83] A. Pailot, K. D'Ambrosio, C. Corbier, F. Talfounier, G. Branlant, *Biochem. J.* 400 (2006) 521–530.
- [84] M.G. Rossmann, D. Moras, K.W. Olsen, *Nature* 250 (1974) 194–199.
- [85] H. Eklund, J.-P. Samama, T.A. Jones, *Biochemistry* 23 (1984) 5982–5996.
- [86] J. Perozich, I. Kuo, R. Lindahl, J. Hempel, *Chem. Biol. Interact.* 130 (2001) 115–124.
- [87] C. Bränden, J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland, New York, 1991.
- [88] J. Bains, M.J. Boulanger, *J. Mol. Biol.* 379 (2008) 597–608.
- [89] T. Hoshino, T. Sugisawa, A. Fujiwara, *Agric. Biol. Chem.* 55 (1991) 6665–6670.
- [90] P.K. Hammen, A. Allali-Hassani, K. Hallenga, T.D. Hurley, H. Weiner, *Biochemistry* 41 (2002) 7156–7168.
- [91] A.L. Lamb, M.E. Newcomer, *Biochemistry* 38 (1999) 6003–6011.
- [92] G.J. Hart, F.M. Dickinson, *Biochem. J.* 211 (1983) 363–371.
- [93] L.F. Blackwell, R.L. Motion, A.K.H. MacGibbon, M.J. Hardman, P.D. Buckley, *Biochem. J.* 242 (1987) 803–808.
- [94] J.S. Rodríguez-Zavala, A. Allali-Hassani, H. Weiner, *Protein Sci.* 15 (2006) 1387–1396.
- [95] R. Meijers, R.J. Morris, H.W. Adolph, A. Merli, V.S. Lamzin, E.S. Cedergren-Zeppezaer, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 9316–9321.
- [96] R. Meijers, H.W. Adolph, Z. Dauter, K.S. Wilson, V.S. Lamzin, E.S. Cedergren-Zeppezaer, *Biochemistry* 46 (2007) 5446–5454.
- [97] T. Wymore, D.W. Deefield II, J. Hempel, *Biochemistry* 46 (2007) 9495–9506.
- [98] A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, third ed., Portland Press Ltd., London, UK, 2004.

Novel NADPH–cysteine covalent adduct found in the active site of an aldehyde dehydrogenase

Ángel G. DÍAZ-SÁNCHEZ*, Lilian GONZÁLEZ-SEGURA*, Enrique RUDIÑO-PIÑERA†, Alfonso LIRA-ROCHA‡, Alfredo TORRES-LARIOS§ and Rosario A. MUÑOZ-CLARES*¹

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D. F., CP 04510, México, †Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, CP 62250, México, ‡Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D. F., CP 04510, México, and §Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70-243, México D. F., CP 04510, México

PaBADH (*Pseudomonas aeruginosa* betaine aldehyde dehydrogenase) catalyses the irreversible NAD(P)⁺-dependent oxidation of betaine aldehyde to its corresponding acid, the osmoprotector glycine betaine. This reaction is involved in the catabolism of choline and in the response of this important pathogen to the osmotic and oxidative stresses prevalent in infection sites. The crystal structure of PaBADH in complex with NADPH showed a novel covalent adduct between the C2N of the pyridine ring and the sulfur atom of the catalytic cysteine residue, Cys²⁸⁶. This kind of adduct has not been reported previously either for a cysteine residue or for a low-molecular-mass thiol. The Michael addition of the cysteine thiolate in the ‘resting’ conformation to the double bond of the α,β -unsaturated nicotinamide is facilitated by the particular conformation of NADPH in the

active site of PaBADH (also observed in the crystal structure of the Cys286Ala mutant) and by an ordered water molecule hydrogen bonded to the carboxamide group. Reversible formation of NAD(P)H–Cys²⁸⁶ adducts in solution causes reversible enzyme inactivation as well as the loss of Cys²⁸⁶ reactivity towards thiol-specific reagents. This novel covalent modification may provide a physiologically relevant regulatory mechanism of the irreversible PaBADH-catalysed reaction, preventing deleterious decreases in the intracellular NAD(P)⁺/NAD(P)H ratios.

Key words: betaine aldehyde dehydrogenase (BADH), crystal structure, cysteine modification, enzyme regulation, *Pseudomonas aeruginosa*, 1,2,3,4-tetrahydropyridine ring.

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], and exhibits great resistance to stress conditions and antibiotics [2]. *P. aeruginosa* cells can grow in choline as their only carbon and nitrogen source [3], which is significant because the tissues infected are rich in choline or choline precursors [4,5] that are converted into choline by enzymes secreted by the bacterium [6]. The second step in the catabolism of choline in several bacteria, including *P. aeruginosa*, is the irreversible NAD(P)⁺-dependent oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine catalysed by BADH (betaine aldehyde dehydrogenase) [7,8]. Glycine betaine is a widely distributed and very efficient osmoprotectant [9], which acts as such in *P. aeruginosa* cells growing in the hyperosmotic environment of infected tissues [10,11]. In addition, PaBADH (*P. aeruginosa* BADH) is one of the few aldehyde dehydrogenases that can use NADP⁺ with similar efficiency to NAD⁺ [12], a property that can be used by the bacterium to produce the NADPH needed to combat the oxidative stress imposed by the host defences [13]. Thus PaBADH might be crucial for the bacterium in its mechanisms of defence against the osmotic and oxidative stresses prevalent in infected tissues, and appears to be a potential target

for antimicrobial agents because, in addition, its inhibition would lead to the accumulation of betaine aldehyde, which is highly toxic [8,14].

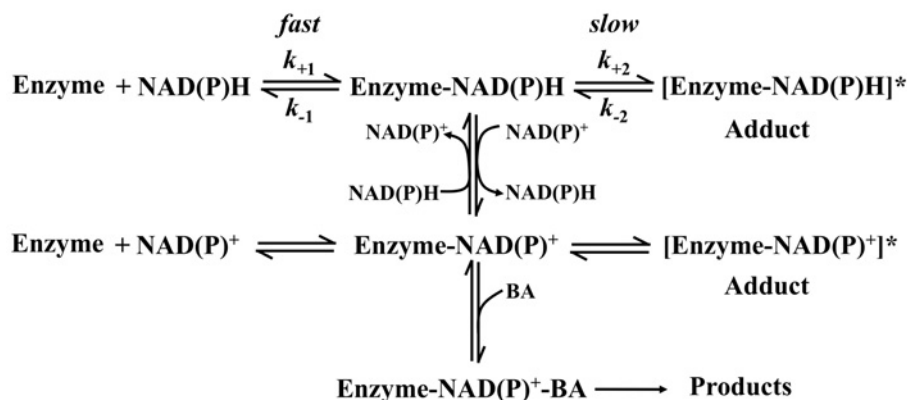
The reaction mechanism of the hydrolytic ALDHs (aldehyde dehydrogenases) involves three chemical steps [15]: (1) the nucleophilic attack of the catalytic cysteine residue (Cys²⁸⁶ in the case of PaBADH) on the aldehyde substrate, resulting in formation of a hemithioacetal intermediate [Enz-S-CH(OH)-R]; (2) the transfer of the hydride from the hemithioacetal to NAD(P)⁺, resulting in formation of a thioester intermediate (Enz-S-CO-R); and (3) the nucleophilic attack of a water molecule on the thioester intermediate, leading to the release of the carboxylic acid product. Glycine betaine is not a physiologically relevant inhibitor of the irreversible reaction catalysed by PaBADH [12], which is negatively regulated only by the other reaction product, the reduced nucleotide. Since the kinetic mechanism of most ALDHs is steady-state bi–bi ordered, with NAD(P)⁺ being the first substrate to add to the enzyme and NAD(P)H the last product to be released, NADP(H) behaves as a competitive inhibitor against NADP⁺ (reviewed in [16]). However, in PaBADH and other BADHs [12,17,18], as well as in ALDH3 [19], a mixed inhibition was observed, which has not yet been satisfactorily explained in mechanistic or structural terms.

Data from crystallographic [20] and NMR [21] studies indicate that there is substantial conformational flexibility of the nicotinamide half of the cofactor bound to ALDH enzymes, and

Abbreviations used: ALDH, aldehyde dehydrogenase; BADH, betaine aldehyde dehydrogenase; DFT, density functional theory; FDH, 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase; HT conformation, hydride transfer conformation; Hyd conformation, hydrolysis conformation; IAM, iodoacetamide; MM, molecular mechanics; MMTS, methyl methanethiosulfonate; PaBADH, *Pseudomonas aeruginosa* BADH; RMSD, root mean square deviation; TLS, translation–libration–screw.

¹ To whom correspondence should be addressed (email clares@servidor.unam.mx).

The structural co-ordinates reported for the binary complexes of wild-type PaBADH and the Cys286Ala mutant with NADPH will appear in the PDB under accession codes 2WOX and 3ZQA respectively.



Scheme 1 Proposed kinetic mechanism for the reversible formation of NAD(P)H–PaBADH and NAD(P)⁺–PaBADH adducts

Asterisks indicate inactive enzyme complexes.

first-order rate constants of formation and breakage of the adduct (k_{+2} and k_{-2} respectively) were estimated by re-plotting the observed first-order inactivation constant (k_{obs}) against NADPH concentration, and fitting the data to eqn (1):

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{-2} + k_{+2}[\text{NADPH}]}{K_d + [\text{NADPH}]} \quad (1)$$

where K_d is the dissociation constant of NADPH from the non-covalent PaBADH–NADPH complex ($K_d = k_{-1}/k_{+1}$; see Scheme 1).

RESULTS

Overall crystal structure of the wild-type and Cys286Ala mutant PaBADHs complexed with NADPH

The structures of the NADPH complexes of the recombinant wild-type PaBADH and of the Cys286Ala mutant have been determined at 2.30 and 2.45 Å resolution respectively (1 Å = 0.1 nm). The crystals belong to the P3₂21 space group and contain four subunits in the asymmetric unit describing one tetramer, which corresponds to the biological unit of the enzyme [33] and show the catalytic, nucleotide binding and oligomerization domains characteristic of ALDH folding [34]. For the two structures, the TLS refinement of the crystallographic data improved the statistics of the refinement, stressing the existence of a dynamic component in the PaBADH structure. The intra- and inter-subunit K⁺ ions found in the PaBADH–NADP⁺ crystal [24] were also observed in these two PaBADH–NADPH crystals. All data collection and refinement statistics are summarized in Table 1.

Novel NADPH–cysteine adduct

In the four subunits of the asymmetric unit of the wild-type PaBADH–NADPH crystal structure, the electron density map shows the C2N of the pyridine ring at covalent bond distances (1.75, 1.50, 1.66, and 1.57 Å in subunits A, B, C and D respectively) of the sulfur of Cys²⁸⁶, indicating the formation of NADPH–cysteine adduct, so far not reported in any ALDH. Neither, to the best of our knowledge, has it been reported that a covalent adduct of this type forms between NAD(P)H and a cysteine residue of other enzymes, or between NAD(P)H and a low-molecular-mass thiol. In order to avoid a bias of the model over the phases, and to confirm the existence of electron density

Table 1 Data collection and refinement statistics for wild-type and Cys286Ala mutant PaBADHs in complex with NADPH

Values in parentheses correspond to the highest resolution shell.

| Parameter | Wild-type enzyme | Cys286Ala mutant enzyme |
|---|---------------------|-------------------------|
| Data collection | | |
| Space group | P3 ₂ 21 | P3 ₂ 21 |
| Cell dimensions | | |
| <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å) | 151.7, 151.7, 242.0 | 151.4, 151.4, 241.8 |
| α , β , γ (°) | 90.0, 90.0, 120.0 | 90.0, 90.0, 120 |
| Asymmetric unit | One tetramer | One tetramer |
| Resolution range (Å) | 30 (2.3) | 38 (2.4) |
| <i>R</i> _{merge} (%) | 7.4 (38.5) | 8.0 (42.3) |
| <i>I</i> / σ (I) – mean <i>I</i> / σ (I) | 6.9–8.3 (1.9–2.2) | 11.7–12.5 (2.0–2.0) |
| Completeness (%) | 99.9 (99.9) | 100 (100) |
| Redundancy | 2.3 (2.2) | 4.6 (4.7) |
| Refinement | | |
| Resolution (Å) | 30–2.3 | 30–2.4 |
| Unique reflections | 141572 | 117977 |
| <i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) | 15.9/19.8 | 15.7/19.1 |
| Number of atoms | | |
| Protein | 15132 | 15077 |
| Ligand/ion | 237 | 392 |
| Water | 1090 | 1892 |
| Glycerol | 66 | 138 |
| PEG | 71 | 32 |
| Mean <i>B</i> -factors (Å ²) | | |
| Protein atoms | 34.8 | 39.4 |
| Water atoms | 46.4 | 49.5 |
| Ligand atoms | 70.8 | 56.9 |
| RMSD from ideal stereochemistry | | |
| Bond lengths (Å) | 0.013 | 0.011 |
| Bond angles (°) | 1.408 | 1.402 |
| Model quality | | |
| Ramachandran plot | | |
| Favoured (%) | 96.5 | 96.1 |
| Allowed (%) | 99.5 | 99.2 |

for the complete NADPH molecule, a simulated annealing omit map of the neighbouring region was calculated (Figure 1A). The clear positive signal higher than 3 σ in the $F_o - F_c$ omit map corroborates the adduct existence. The Michael addition of the cysteine thiolate to the double bond of the α,β -unsaturated nicotinamide results in a 1,2,3,4-tetrahydropyridine derivative (Figures 1B–1D). DFT calculations indicate that the most stable conformations of the 1,2,3,4-tetrahydropyridine ring of

that this conformational flexibility is crucial for catalysis. The oxidized cofactors, NAD(P)^+ , have been observed bound into the active site in an extended conformation that allows the oxidation of the substrate [the *HT* (hydride transfer) conformation], whereas the bound reduced cofactors, NAD(P)H , were found in several different folded conformations [the *Hyd* (hydrolysis) conformations] that allow the hydrolytic step of the reaction (reviewed in [16]). On the other hand, slow conformational changes of the PaBADH protein induced by the binding of the nucleotides were proposed to occur as an explanation of the progressive loss of reactivity of the catalytic cysteine residue towards MMTS (methanethiosulfonate) when the enzyme was pre-incubated in the presence of NAD(P)^+ or NAD(P)H [22]. The three-dimensional crystal structures of ALDH enzymes so far obtained in complex with nucleotides, however, do not show major conformational changes with respect to the apoenzyme forms.

To further our understanding of the structural and functional properties of PaBADH, in particular of the role of the reduced nucleotide in the regulation of the enzyme activity, we determined the crystal structures of the wild-type and of the Cys286Ala mutant enzymes in complex with NADPH. Both structures reveal a conformation of the reduced nucleotide different from those so far observed in other ALDH crystal structures, a novel covalent adduct between the NADPH pyridine ring and the sulfur atom of Cys²⁸⁶ in the wild-type enzyme. This adduct also forms in solution, causing both a reversible enzyme inactivation, which may have important regulatory implications, and the previously found loss of reactivity of Cys²⁸⁶ towards thiol-specific reagents [22].

EXPERIMENTAL

Expression, purification and activity assay of PaBADH

Previously described procedures were used for the expression of wild-type PaBADH and the Cys286Ala mutant in *Escherichia coli* cells [8]. The enzymes were purified to homogeneity as described previously [23] and did not contain bound NAD(P)^+ or NAD(P)H as judged by the A_{280}/A_{260} ratio, which was ~ 2.0 . The dehydrogenase activity of the wild-type enzyme was assayed spectrophotometrically at 30 °C, by monitoring the increase in A_{340} in a mixture (0.5 ml) consisting of 1 mM EDTA, 1 mM betaine aldehyde and 1 mM NADP^+ or 2 mM NAD^+ in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 (standard assay). All assays were initiated by addition of the enzyme (4.0–8.5 nM active sites). Initial rates were determined from the initial linear portions of reaction-progress curves.

Crystallization conditions and data collection

Wild-type PaBADH and the Cys286Ala mutant were concentrated to 20 mg/ml in an Amicon Ultra-4 centrifugal filter unit (Millipore) and dialysed exhaustively against 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.9, containing 0.2 mM EDTA, 200 mM KCl, 1% (v/v) glycerol and 5 mM dithiothreitol. Hanging-drop trays were prepared in 85 mM Hepes/NaOH buffer, pH 7.5, 8.5% (v/v) propan-2-ol, 17% (w/v) PEG 4000 [PEG is poly(ethylene glycol)] and 15% (v/v) glycerol, as described previously [24] inside a glove box filled with nitrogen. NADPH (2 mM final concentration) was added to the enzyme preparation prior to crystallization. Diffraction data of the wild-type enzyme were collected at 100 K at the SER-CAT Access Team beamline 22-ID of the APS (Advanced Photon Source), Argonne National Laboratory (Argonne, IL, U.S.A.), using a MAR Mosaic MX-

300 detector. Diffraction data of the Cys286Ala mutant were collected at 100 K at the X6a beamline at the National Synchrotron Light Source (Upton, NY, U.S.A.) using a ADSC Q270 CCD (charge-coupled device) detector. Data from the wild-type enzyme crystal were auto-indexed and integrated using MOSFLM [25], and scaled and truncated with Scala [26]. The Cys286Ala data were auto-indexed, integrated and scaled using HKL2000 [27].

Structure solution and refinement

Diffraction phases for wild-type and Cys286Ala mutant PaBADHs were determined by molecular replacement with the program Phaser [28] using the PaBADH co-ordinates with the structure given under PDB code 2WME [24] as a starting model. Alternating cycles of automatic and manual refinement were carried out with the standard protocols of Phenix software [29]. We initially used non-crystallographic symmetry restraints, which were later removed. Phenix was also used for atomic positions, atomic displacement parameters, and translation, libration and TLS (translation–libration–screw) refinement calculations. The program Coot [30] was used to analyse the electron density maps ($2F_o - F_c$ and $F_o - F_c$). Water molecules were automatically localized using Phenix [29] and Coot [30]. Structural alignments were performed with the programs Coot [30] and CCP4mg [31]. Figures were created with PyMOL (<http://www.pymol.org/>) and CCP4mg [31].

DFT (density functional theory) calculations

The initial structure of a NADPH–cysteine adduct was built from standard fragments and energy-minimized using PC Spartan 06 software (Wavefunction). A search for the most abundant conformer was performed by MM (molecular mechanics) methods using the MMF94 Conformer Distribution Module of the PC Spartan 06 software package. The exploration of the rotation angle was set to 30° as a limit. The geometry of this conformer was fully optimized by DFT calculations at the B3LYP/6-31G* level.

Inactivation of PaBADH with NAD(P)H and thiol-specific reagents

Wild-type enzyme (3.75 μM active sites) was incubated with different concentrations of NAD(P)H at 25 °C in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 250 mM KCl, 1 mM EDTA and 10% (v/v) glycerol (Buffer A). The remaining enzyme activity was measured in aliquots taken at the indicated times, under the same conditions of the standard assay but using 0.05 mM NAD(P)^+ and 0.25 mM betaine aldehyde, and in the presence of the same NAD(P)H concentration as that used in the incubation. The effect of the reduced nucleotides on PaBADH inactivation by IAM (iodoacetamide) was investigated by incubating enzyme samples, which had been previously depleted of 2-mercaptoethanol by gel filtration using Buffer A saturated with nitrogen gas, with the reduced nucleotides as described above for 2 h prior to adding the thiol-modifying reagent. Then, aliquots were taken from the incubation mixtures at appropriate time intervals for the measurement of the remaining enzyme activity, using the standard assay with no reduced nucleotide added. The thiol-specific reagent and the nucleotides were dissolved in nitrogen-saturated water; incubations were carried out anaerobically. First-order analyses of the time courses of inactivation were performed using single exponential equations and non-linear regression calculations. According to the kinetic mechanism proposed for adduct formation (see Scheme 1), the

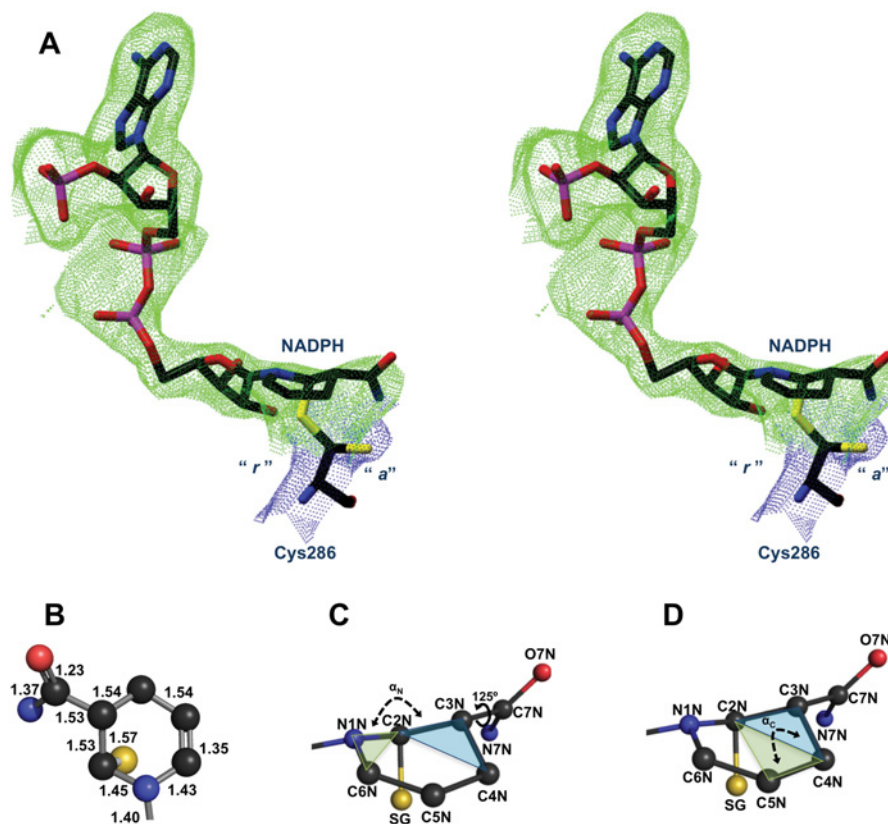


Figure 1 NADPH-Cys²⁸⁶ adduct

(A) Stereoview of $F_o - F_c$ omit map, countered at $+3\sigma$ (green mesh surface), of the subunit B of wild-type PaBADH in the absence of NADPH and of the resting ("r") conformer of Cys²⁸⁶, showing the existence of a covalent bond between the sulfur of Cys²⁸⁶ and C2N of the pyridine ring. The sulfur–C2N bond length is 1.5 Å. The $2F_o - F_c$ electronic density map, countered at 1σ (blue mesh surface), indicates the presence of the attacking, ("a") conformer of Cys²⁸⁶ with an occupancy of 0.3. The Figure was generated using the co-ordinates of subunit B and the CCP4mg program [31]. (B–D) Structure of the most stable conformation (a twisted half-chair) of the 1,2,3,4-tetrahydropyridine ring in the NADPH–Cys²⁸⁶ adduct. Front (B) and side (C and D) views showing bond lengths in angstroms (B) and atom numbers (C and D). In panel (C) the angle α_N (125°) is that formed by the planes defined by C2N–N1N–C6N and C2N–C3N–C4N. In panel (D) the angle α_C (137°) is that between the planes defined by C2N–C4N–C5N and C2N–C3N–C4N. The dihedral angle ν (125°) is that defined by C2N–C3N–C7N–N7N. The angles values and bond lengths were measured using the program Spartan 06 (Wavefunction). The Figure was generated using PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

the NADPH-thiol adduct and of the attached ribose ring are twisted half-chair and $C2'$ -endo envelope respectively. These are the conformations that best fit into the $F_o - F_c$ omit map of the PaBADH crystal, as shown in Figure 1(A). The deviation of the 1,2,3,4-tetrahydropyridine twisted half-chair of the NADPH–cysteine adduct from a planar ring conformation can be described by the angle between the planes defined by C2N–N1N–C6N and C2N–C3N–C4N (α_N , 125°), and the angle between the planes defined by C2N–C4N–C5N and C2N–C3N–C4N (α_C , 137°) (Figure 1C). The carboxamide group, which is not constrained in the plane of the pyridine ring by conjugation as it is in NADP⁺, can rotate freely; this is probably the reason for the poor density attached to it in the crystal. After several refinement cycles, a position of the carboxamide that does not produce any steric clash with the atoms in the active site is that shown in Figure 1 and described by the dihedral angle C2N–C3N–C7N–N7N of -125° .

The twisted half-chair conformation of the 1,2,3,4-tetrahydropyridine is clearly different from the planar pyridine ring of the oxidized nucleotide and from the almost planar conformation of the dihydropyridine ring of the reduced nucleotide so far observed in ALDH enzymes. It is, however, similar to the half-chair conformation found in other tetrahydropyridine rings resulting from alkylation at C5N or C6N [35]. The electronic density and the high B-factor values,

particularly those of C3N and C2N and of the sulfur of the catalytic cysteine residue, suggest that the tetrahydropyridine ring can exist in another half-chair conformation where the C3N has two opposite elevation angles with respect to C2N. Indeed, DFT calculations indicate that this alternative conformation has similar stability in a L-cysteine–NAD(P)H adduct, but in the PaBADH active site this conformation would be less stable due to steric constraints.

The electron density data show that the carboxamide group and the catalytic cysteine residue have a *cis* relation, i.e. the carboxamide group is oriented equatorially and the cysteine residue is oriented axially. Because of this, the nucleophilic attack takes place on the *re* face of the dihydropyridine ring. Given the architecture of the active site of the ALDHs, only when the catalytic cysteine residue is in one of the two conformations observed in the ALDH crystals (the one we called the 'resting' conformation [24] because its sulfur atom is far from the carbonyl C atom of the bound aldehyde) is the thiol group positioned to perform the nucleophilic attack on the reactive C atom of the dihydropyridine ring, the C2N. The occupancy of the nucleotide (0.6–0.8) corresponds to that of the catalytic cysteine in the 'resting' conformation (0.7–1.0). In subunits B, C and D, a small proportion of this residue was observed in the 'attacking' conformation (thus named [24] because the sulfur atom is in

the correct position to perform the nucleophilic attack on the aldehyde), not forming the covalent adduct with NADPH.

Conformations of NADPH inside the PaBADH active site

The crystal structures of the wild-type and mutant Cys286Ala PaBADH enzymes in complex with NADPH show the complete nucleotide in every subunit. In the two enzymes, the adenosine moiety of the NADPH molecules makes essentially the same interactions with the enzyme (Figures 2A and 2B and Supplementary Tables S1 and S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/439/bj4390443add.htm>) as those found in the PaBADH–NADP⁺ crystal [24]. The nicotinamide moiety, however, was found in two different hydrolysis conformations not observed previously in any ALDH enzyme. In one of them (observed in every subunit of the two enzymes) the reduced nicotinamide was in a position deeper inside the active site than in those *Hyd* conformations observed in crystals of other ALDHs with NAD(P)H bound, and closer to the *HT* conformation of NAD(P)⁺ (Figure 2C). Because of this, we call this conformation the *Hyd_i*. The N1N of the reduced nicotinamide in the *Hyd_i* conformation observed in the Cys286Ala PaBADH mutant is rotated around 7° and displaced only by approximately 1 Å (ranging from 0.63 to 1.06 Å in the different subunits) with respect to the position of the same atom in the oxidized nicotinamide in the *HT* conformation found in ALDH2 [20]. In the wild-type enzyme, this displacement is even smaller (ranging from 0.46 to 0.88 Å), but the rotation is 19°. These differences are probably due to the formation of the covalent adduct between the reduced nicotinamide and the catalytic cysteine in the wild-type enzyme. It is not surprising that the interactions of the reduced nicotinamide of NADPH in the *Hyd_i* conformation with PaBADH (Figure 2A and Supplementary Table S1) are similar to those of the oxidized nicotinamide of NAD(P)⁺ in the *HT* conformation observed in other known crystal structures of ALDH enzymes [36]. But different from the known holo ALDH structures, either with NAD(P)⁺ or NAD(P)H, the N7N or O7N of the reduced nucleotide are at hydrogen bond distances from a glycerol hydroxy group (Figure 2D), which occupies the same position as the putative hydrolytic water molecule [37] observed in the PaBADH–NADP⁺ crystal [24]. This hydroxy group is also at a hydrogen bond distance from the OE1 of the catalytic residue Glu²⁵² (Glu²⁶⁸ in ALDH2), which is the general base involved in activation of the hydrolytic water molecule. Only in subunit A of the wild-type enzyme does the carboxamide group not make these interactions, because rotations of the pyridine ring and of the carboxamide group place the O7N and 7N7 inside the oxyanion hole (Supplementary Figure S1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/439/bj4390443add.htm>).

The other novel NADPH conformation, hereafter called *Hyd_n*, was observed only in subunit C of the wild-type enzyme, with an occupancy of 0.3 (Figure 2B). In this conformation, the nucleotide is folded so that the nicotinamide phosphate interacts with the adenine ribose, and the nicotinamide ribose interacts with the adenine ring and Arg²¹⁰ (Figure 2B and Supplementary Table S2). Although there is no electronic density for the nicotinamide ring in this conformation, most probably due to a very high flexibility, the rest of the NADPH molecule has a similar conformation to that adopted by free NADPH in solution, as indicated by DFT calculations (results not shown). This conformation appears, therefore, to be either the last one adopted by the bound NADPH on its way out of the active site or the first one adopted on its way into the active site.

In every subunit of the Cys286Ala mutant we also found a third conformation of NADPH (not shown) with occupancies ranging from 0.3 to 0.5. This conformation is similar to those called by us *Hyd₂* (see Figure 2C), which were observed in other ALDHs (e.g. PDB code 1O00) [20]. An ensemble of several NAD(P)H conformations found so far in the active site of ALDH enzymes, including the two novel ones reported in the present study, constitute a series of snapshots of the trajectory followed by the reduced nucleotide when entering or leaving the active site, as shown in Supplementary Movies S1 and S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/439/bj4390443add.htm>. In PaBADH, *Hyd_i* and *Hyd_n* would be the initial or last conformations.

Formation of NAD(P)H–Cys²⁸⁶ adducts in solution

Formation of NAD(P)H adducts with the catalytic cysteine residue, as the one observed in the PaBADH crystal structure, should cause enzyme inactivation by preventing the formation of the first intermediate of the reaction, the hemithioacetal. Therefore, to investigate the ability of PaBADH to form cysteine–NAD(P)H adducts in solution, we pre-incubated the enzyme with the reduced nucleotides in the absence of substrate aldehyde as described in the Experimental section, and measured the remaining enzyme activity at different times in assay medium containing subsaturating concentrations of the substrates and the reduced nucleotide concentration used in the pre-incubation. Both NADPH and NADH cause a progressive loss of PaBADH activity that is time- and concentration-dependent, follows pseudo-first-order kinetics and reaches a plateau (Figure 3A). The highest concentration of the reduced nucleotides used in these experiments (200 μM) is subsaturating, particularly in the case of NADH [12], but we could not use higher concentrations because of interference with the spectrophotometric enzyme assay. The rate constant of inactivation by NADH is lower than that obtained with the same concentration of NADPH (Figure 3B), congruently with the lower degree of saturation of the enzyme by NADH. The observed inactivation rate constants (k_{obs}) increased hyperbolically in response to increased nucleotide concentrations (Figure 3A, inset), consistent with a reversible process that consists at least of two steps: the rapid reversible binding of the nucleotides to the enzyme followed by a slower and also reversible intramolecular change that leads to inactive enzyme forms (Scheme 1). Eqn (1) of the Experimental section, derived for this mechanism, allowed the estimation of values for the first-order rate constants of formation (k_{+2} , 0.169 min⁻¹) and breakage (k_{-2} , 0.031 min⁻¹) of the PaBADH–NADPH adduct, as well as of the equilibrium constant (k_{+2}/k_{-2}). The reversible nature of adduct formation was confirmed by the total reactivation of the NAD(P)H-modified enzyme by removal of NADPH by gel filtration, or by the 500-fold dilution into the assay medium when the reduced nucleotide was not included (results not shown). NAD(P)⁺ can reverse the enzyme inactivation caused by NAD(P)H, as proved by the recovery of activity observed when the assays were performed at high, saturating, NAD(P)⁺ concentrations (results not shown).

To confirm that the observed NAD(P)H-induced enzyme inactivation was due to formation of NAD(P)H–Cys²⁸⁶ adducts, in the present study we followed the kinetics of inactivation by IAM of PaBADH samples that had been previously incubated with 0.05 NADPH or with 0.2 mM NAD(P)H until the remaining activity reached a plateau (120 min). Enzyme activity assays in these experiments were performed in the absence of NAD(P)H and at high substrate concentration, to allow for the full reactivation

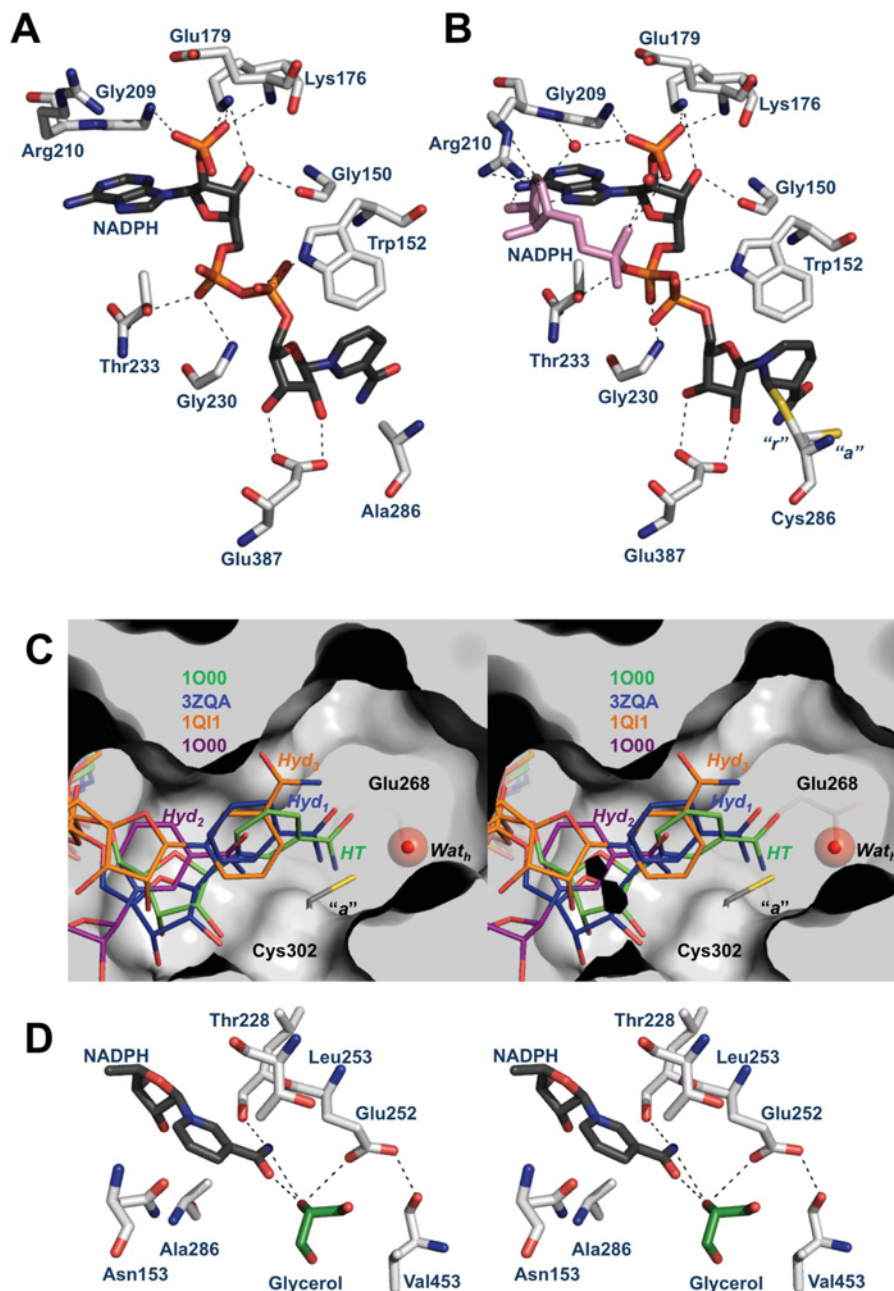


Figure 2 Interactions of NADPH in the PaBADH active site

(A) NADPH in the *Hyd*₁ conformation observed in subunit A of the Cys286Ala mutant. The 2'-phosphate group of the adenosine ribose does not interact with Glu¹⁷⁹, which is interacting instead with Arg⁴⁰ (not shown). (B) NADPH (pink) in the *Hyd*₁ conformation observed in subunit C of the wild-type PaBADH with 0.3 occupancy. The interactions of the adenine moiety (not shown for clarity of the Figure) are the same as those of the *Hyd*₁ conformation shown in panel (A). The nicotinamide ring has no associated electron density. For comparison, the nicotinamide moiety in the *Hyd*₁ conformation, observed in the same subunit with 0.7 occupancy, is also shown. The two conformations of the catalytic cysteine residue are denoted by "r" (resting) and "a" (attacking). PaBADH residues and the NADPH molecule are shown as sticks with carbon atoms in grey (light grey for protein, dark grey for NADPH in the *Hyd*₁ conformation), and oxygen and sulfur atoms in red and yellow respectively. Hydrogen bonds (cut-off 3.5 Å) are depicted as broken black lines. (C) Stereoviews showing the position of the nicotinamide ring of NADPH in PaBADH (*Hyd*₁, blue, PDB code 3ZQA), and of the nicotinamide rings of NAD⁺ in human ALDH2 (*HT*, green, PDB code 1O00), NADH in human ALDH2 (*Hyd*₂, purple, PDB code 1O00), and NADPH in the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans* (*Hyd*₃, orange, PDB code 1QI1) modelled into the PaBADH active site. Stick representations are used with oxygen and nitrogen atoms in red and blue respectively. The putative hydrolytic water molecule (*Wat*_h, red sphere) observed in the PaBADH–NADP⁺ crystal structure (PDB code 2WME) was also modelled. (D) Stereoview of the nicotinamide moiety of NADPH, as observed in subunit A of the Cys286Ala mutant, showing the hydrogen bonds (black broken lines) between the N7N of the carboxamide group and the main chain carbonyl oxygen of Leu²⁵³ and between N7N or O7N and a glycerol molecule (green). The glycerol O2 occupies a position similar to that of the putative hydrolytic water molecule (*Wat*_h in panel C), and potentially could form two pairs of hydrogen bonds, either with the carboxy group of Glu²⁵² and the carboxamide oxygen, or with the carboxy group of Glu²⁵² and the carboxamide nitrogen. The Figure was generated using PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

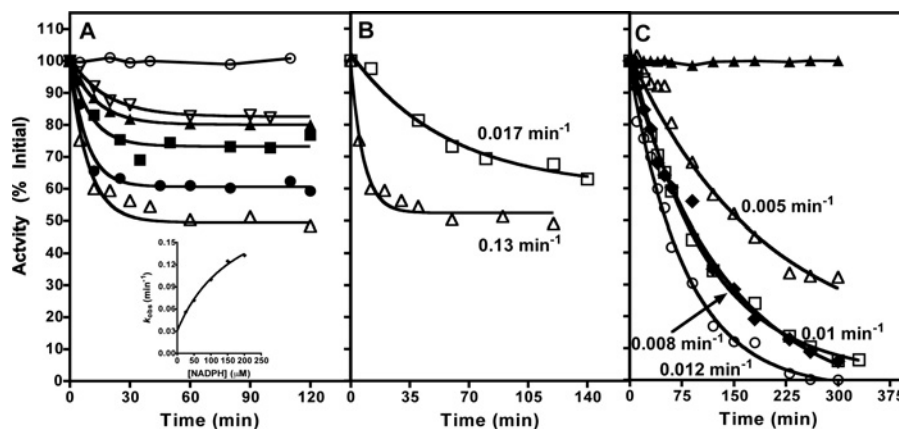


Figure 3 Inactivation of PaBADH by NAD(P)H and protection of the NAD(P)H-modified enzyme against IAM modification

(A) Time courses of the loss of enzyme activity by pre-incubation with NADPH. The enzyme ($3.75 \mu\text{M}$ as active sites) was pre-incubated at 25°C in Buffer A in the absence (\circ) or presence of 25 (∇), 50 (\blacktriangle), 100 (\blacksquare), 150 (\bullet) or 200 (\triangle) μM NADPH. At the indicated times, NADP^+ and betaine aldehyde (0.05 and 0.25 mM respectively, final concentrations) were added to the pre-incubation medium and the remaining enzyme activity determined. The experimental data were fitted to a single exponential equation. The enzyme pre-incubated in Buffer A (\circ) remained stable during the experiment. Inset: Replot of the observed first-order rate constant of inactivation (k_{obs} ; estimated from the data in the main Figure) against NADPH concentration. The line is theoretical, resulting from the best fit of the data to eqn (1). (B) Comparison of the PaBADH inactivation kinetics by pre-incubation with $200 \mu\text{M}$ NADPH (\triangle) and $200 \mu\text{M}$ NADH (\square). The estimated values of the inactivation rate constant are given next to each line. (C) Effect of pre-incubation with NAD(P)H on the time courses of inactivation of PaBADH by IAM. The enzyme ($3.75 \mu\text{M}$ as active sites) was pre-incubated for 2 h at 25°C in Buffer A in the absence (\circ) or presence of $200 \mu\text{M}$ NADPH (\triangle) or $200 \mu\text{M}$ NADH (\square). Then, $125 \mu\text{M}$ IAM was added to the pre-incubation medium and the remaining enzyme activity determined at the indicated times using 1 mM NADP^+ and 1 mM betaine aldehyde (final concentrations). As a control, $200 \mu\text{M}$ NADPH was added together with IAM to an enzyme sample pre-incubated for 2 h in Buffer A in the absence of NADPH (\blacklozenge). The enzyme pre-incubated in Buffer A (\blacktriangle) remained stable during the experiment. The experimental data were fitted to a single exponential equation; the estimated values for the inactivation rate constants of inactivation are given next to each line.

of the enzyme inactivated by the reduced nucleotide so that only the inactivation caused by IAM was followed. As shown in Figure 3(C), the protection against inactivation by the thiol-specific reagent afforded by a given NAD(P)H concentration correlates with the extent of enzyme inactivation achieved by the same nucleotide concentration. The level of protection provided by NADPH was higher than that afforded by NADH, again consistent with the higher affinity of the enzyme for the former. The degree of protection was less than that of inactivation, probable due to a partial dissociation of the adduct favoured by the reaction of the thiol reagent with the free enzyme thiolate that exists in equilibrium with the adduct.

An adduct between the sulfur atom of the catalytic cysteine residue and the pyridine ring of NADP^+ was observed in the crystal structure of FDH (10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase) [38]. On the basis of QM (quantum mechanics)/MM calculations, an NAD-catalytic cysteine adduct was predicted to also form in ALDH2 [39]. We found that Cys^{286} also forms adducts with NAD(P)^+ , as indicated by the peak at 325 nm observed in the UV absorption difference spectra of NAD(P)^+ (Supplementary Figure S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/439/bj4390443add.htm>), which was absent in the difference spectrum of the $\text{Cys}^{286}\text{Ala}$ mutant (results not shown). This peak is within the wavelength range of $310\text{--}345 \text{ nm}$ where similar peaks have been found for NAD(P)^+ adducts with thiol groups [38,40,41]. Pre-incubation with NAD(P)^+ , however, does not result in activity losses because the NAD(P)^+ -cysteine adducts are readily reversible in the presence of the aldehyde substrate of the ALDH reaction [38], as shown in Scheme 1.

The previously observed loss of reactivity of the catalytic cysteine residue towards a thiol-specific reagent, MMTS, when PaBADH was pre-incubated in the presence of NAD(P)^+ or NAD(P)H [22] was explained by a slow conformational change (of unknown nature) of the enzyme upon binding the nucleotides. The ability of Cys^{286} to form adducts with the oxidized and reduced nucleotides reported here provides an alternative

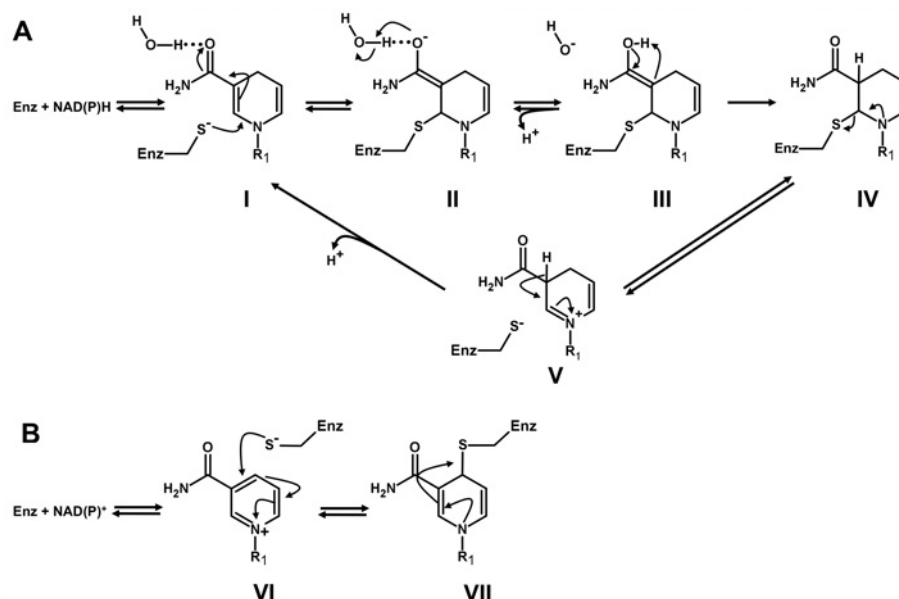
satisfactory explanation to those results. The nucleotides produce a chemical change in the enzyme, not a conformational one as previously proposed [22]. In that study inactivation by NAD(P)H following incubation with the enzyme was not detected because the activity assays were performed in the absence of the reduced nucleotides at high substrate concentration, thus allowing for a fast enzyme reactivation.

DISCUSSION

Mechanisms of formation of NAD(P)H-cysteine and NAD(P)-cysteine adducts

The crystallographic evidence indicating that an adduct is formed between the sulfur of the catalytic cysteine residue of PaBADH and the C2N of the dihydropyridine ring is fully consistent with Michael addition of the thiolate to the double bond of the α,β -unsaturated nicotinamide. We propose a mechanism (Scheme 2A) that involves an initial nucleophilic attack of the conjugate base of the cysteine residue (the thiolate) at the 2-position of the 1,2-dihydropyridine ring (I), forming an unstable oxyanion intermediate (II). Then, the oxyanion removes a proton from a water molecule to give an enol intermediate (III), which readily and irreversibly tautomerizes to the 1,2,3,4-tetrahydropyridine derivative (IV). It is clear that the 1,2,3,4-tetrahydropyridine derivative cannot be formed by exposure of the crystal to the high-energy X-rays of the synchrotron during the diffraction process. If reduction of the dihydropyridine ring of NADPH to a 1,2,3,4-tetrahydropyridine ring took place under these conditions, which has not been observed before, it would result in a nonreactive pyridine unable to form the adduct with the catalytic cysteine residue.

The slow, rate-limiting, step in the mechanism is most probably the thiolate attack on the C2N, as is usually the case in nucleophilic additions [41]. In the case of the NAD(P(H))-cysteine adducts, the nucleophilic attack is favoured by the high polarization of



Scheme 2 Proposed chemical mechanisms for the formation of NAD(P)H-cysteine and NAD(P)-cysteine adducts

(A) The catalytic thiolate performs a nucleophilic attack at the C2N of the 1,4-dihydropyridine ring of NAD(P)H (I). The oxyanion intermediate (II) formed in the nucleophilic addition step abstracts a proton from a water molecule to yield the enol intermediate (III), which tautomerizes to the observed 1,2,3,4-tetrahydropyridine (IV). The NAD(P)H-cysteine adduct dissociates through formation of an iminium cation (V) that leads to the elimination of the cysteinyl residue. (B) The catalytic thiolate performs a nucleophilic attack at the C4N of the pyridine ring of NAD(P)⁺ (VI), producing, by a nucleophilic addition, a 1,4-dihydropyridine ring derivative (VII), the NAD(P)-cysteine adduct, which may readily dissociate by an elimination reaction.

the electronic density of C2N promoted by the carboxamide carbonyl conjugation at this position. Additionally, in the active site of PaBADH this step is greatly favoured by the hydrogen bond formed between the carbonyl oxygen atom of the NADPH carboxamide group and an ordered water molecule observed in the PaBADH-NADP⁺ crystal [24] in a similar position to a hydroxy group of a glycerol molecule observed in the wild-type and mutant Cys286Ala PaBADH-NADPH crystals (Figure 2D). This interaction would: (i) polarize the carbonyl group, thus making the double bond between C2N and C3N more susceptible to the nucleophilic attack on C2N; (ii) stabilize the oxyanion formed after the nucleophilic addition; and (iii) allow for protonation of the oxyanion intermediate, leading to formation of a stable NAD(P)H-cysteine adduct, the 1,2,3,4-tetrahydropyridine derivative.

Even though the last step in the formation of the 1,2,3,4-tetrahydropyridine derivative is irreversible, the NAD(P)H-Cys²⁸⁶ adduct dissociates by formation of an iminium cation via the elimination of the cysteinyl residue promoted by the vicinal nitrogen atom of the pyridine ring. In the spatial arrangement of the pyridine ring observed in the PaBADH crystal structure (the twisted half-chair), the nitrogen lone electron pair has an antiplanar orientation with respect to the sulfur atom, thus promoting the elimination of the cysteine residue, i.e. the formation of the free thiolate and of a NAD(P)H iminium derivative (V), which can experience a tautomeric equilibrium imine-enamine (Scheme 2A). Given the acidic nature of the proton at the C3N position, the enamine, i.e. NAD(P)H, is highly favoured in this equilibrium.

Regarding the NAD(P)-catalytic cysteine adducts, these form in a nucleophilic addition reaction where the thiolate group performs a nucleophilic attack on the C4N of the pyridine ring of NAD(P)⁺ (Scheme 2B, VI), producing the 1,4-dihydropyridine ring derivative (VII) observed in the crystal structure of 10-

formyltetrahydrofolate dehydrogenase [38]. These kinds of adducts can readily dissociate via an elimination reaction [42].

NADPH conformation

NAD(P)H adducts can only be formed by nucleophilic attack on pyridine ring carbon atoms that are making double bonds, such as C2N, C5N or C6N. In PaBADH, because of the manner in which the reduced pyridine ring binds into the active site (the *Hyd_i* conformation), the electrophilic carbon atom susceptible to attack by the catalytic cysteine residue is C2N, and only the resting conformation of the catalytic cysteine has the appropriate distance and angle of attack for forming the adduct, as found in the PaBADH-NADPH crystal structure reported in the present study. Although the binding of the nicotinamide into the active site is incompatible with the cysteine residue in the resting conformation because of the steric clash between the pyridine ring and the thiol group, NAD(P)H molecules can form an adduct with the catalytic cysteine in the resting conformation when they enter the active site and their C2N clashes with the sulfur atom.

The similarities between the *Hyd_i* conformation of the reduced nucleotide observed inside the active site of PaBADH and the conformation adopted in the active site of ALDHs by the oxidized nucleotide (the *HT* conformation) might suggest that in the PaBADH crystal there is an NADP⁺ molecule instead of NADPH. It is known that the reduced pyridine nucleotides can be spontaneously oxidized, but oxidation of our crystals is highly improbable because they were grown under anaerobic conditions. That the observed conformation corresponds to NADPH and not to NADP⁺ is strongly supported by: (i) the small but significant displacement of the reduced pyridine ring with respect to the position of the oxidized one, which occupies an almost invariable position in every ALDH crystal, the position needed

for an efficient hydride transfer; (ii) the formation of the adduct at the C2N, which is the electrophilic centre in the dihydropyridine ring, whereas C4N is the electrophilic centre in the oxidized pyridine ring; (iii) the non-planar structure of the pyridine ring, which would be planar if it were NADP^+ even in the case that this nucleotide formed an adduct with the catalytic cysteine, as observed in the FDH [38]; (iv) the high mobility of the carboxamide group, which in the tetrahydropyridine derivative may rotate freely, as in NADPH, whereas in NAD(P)^+ it is constrained in the plane of the ring by conjugation; and (v) the catalytic cysteine conformation, which is the resting one as needed for the attack on the C2N of NADPH and not the conformation intermediate between the resting and attacking needed for the attack on the C4N of NADP^+ [38].

To demonstrate that the *Hyd*₁ conformation of NADPH observed in the wild-type PaBADH does not result from adduct formation but that, on the contrary, adduct formation is facilitated by the nucleotide adopting this particular conformation, we obtained the crystal structure of the Cys286Ala mutant in complex with NADPH. Crystals of both the wild-type and the mutant enzymes had the same space group, which allows an accurate structural comparison between them. The same conformation of the reduced nucleotide was observed in all subunits of the asymmetric unit of the Cys286Ala crystal, in which the adduct is obviously absent. This finding is clear evidence of the ability of the reduced nucleotide to adopt the *Hyd*₁ conformation inside the PaBADH active site. Moreover, after running a non-rigid docking of the NADH molecule into the PaBADH active site using the PatchDock server [43], the only resulting NADH conformation in which the nicotinamide was inside the active site was very similar [with a RMSD (root mean square deviation) of 0.11 Å] to the *Hyd*₁ conformation observed in the Cys286Ala mutant (results not shown).

Implications of the cysteine–NAD(P)H adduct formation

The significant decreases in the Cys²⁸⁶ reactivity resulting from formation of adducts with NAD(P)H may protect the catalytic cysteine residue against oxidation (as pointed out by others in the case of the NAD(P)–catalytic cysteine adducts [39]), thus preventing irreversible enzyme inactivation. However, the catalytic NAD(P)H–Cys adducts may also play a regulatory role of predictable physiological relevance. This is because this covalent modification of the thiol group is reversible and would be of great help in slowing down an irreversible reaction (such as the one catalysed by ALDH enzymes) before this reaction could significantly decrease the intracellular $\text{NAD(P)}^+/\text{NADPH}$ ratio with adverse consequences. In the reaction catalysed by the ALDH enzymes, the acid product is a very poor inhibitor so that the negative control of the reaction rate is mainly by NAD(P)H inhibition. PaBADH has a low affinity for the reduced nucleotides as assessed by their competitive inhibition constant, (K_{ic}) values, 182 and 1075 μM for NADPH and NADH respectively [12]. These values are considerably higher than those of the NAD(P)^+ dissociation constant (K_{ia}), which are 48 and 186 μM for NADP^+ and NAD^+ respectively [12], making the reduced nucleotides, particularly NADH, poor inhibitors of the PaBADH reaction in their physiological range of concentrations. The reversible inactivation of the enzyme by NAD(P)H notably increases its sensitivity to decreases in the $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ ratios and therefore allows for a finer tuning of the PaBADH activity to the intracellular redox conditions. Thus formation of the NAD(P)H–Cys²⁸⁶ adducts may constitute an efficient mechanism by which PaBADH activity can be transiently decreased if it

is higher than the activities of the NAD(P)H-utilizing enzymes, thus allowing time for the recycling of the oxidized nucleotide. Given the reversibility of the catalytic cysteine–NAD(P)H adducts, the PaBADH activity can be re-assumed when the NAD(P)H concentrations go down and the NAD(P)^+ concentrations go up to normal values.

AUTHOR CONTRIBUTION

Ángel Díaz-Sánchez performed experiments and helped with data analysis and general discussion; Lilian González-Segura obtained the crystals, solved their structure and performed structural alignments; Enrique Rudiño-Piñera helped with phase determination and refinement of the crystal structures; Alfonso Lira-Rocha made DFT calculations and proposed the chemical mechanisms for adduct formation; Alfredo Torres-Larios collected and processed the diffraction data of the wild-type enzyme; Rosario Muñoz-Clares designed the study, analysed data, provided guidance and wrote the paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the staff of the Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas (Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México) for giving us access to its facilities. We acknowledge the use of beamline 22-ID of the Southeast Regional Collaborative Access Team (SER-CAT) at the Advanced Photon Source of the Argonne National Laboratory (Argonne, IL, U.S.A.) and of the X6a beamline of the National Synchrotron Light Source (Upton, NY, U.S.A.). We are grateful to Carlos Mújica-Jiménez (Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México) for protein purification.

FUNDING

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [grant number 59654] (to R.A.M.-C.). A.G.D.-S. is a recipient of a CONACYT scholarship.

REFERENCES

- Hardalo, C. and Edberg, S. C. (1997) *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* **23**, 47–75
- Strateva, T. and Yordanov, D. (2009) *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1133–1148
- 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
- Wright, J. R. and Clements, J. A. (1987) Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**, 426–444
- 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
- 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
- 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
- Velasco-García, R., Villalobos, M. A., Ramírez-Romero, M. A., Mújica-Jiménez, C., Iturriaga, G. and Muñoz-Clares, R. A. (2006) Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt. *Arch. Microbiol.* **185**, 14–22
- Csonka, L. N. and Hanson, A. D. (1991) Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 569–606
- 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
- Kilbourn, J. P. (1978) Bacterial content and ionic composition of sputum in cystic fibrosis. *Lancet* **1**, 334
- 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
- Miller, R. A. and Britigan, B. E. (1997) Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**, 1–18

- 14 Zaldivar-Machorro, J. V., López-Ortiz, M., Demare, P., Regla, I. and Muñoz-Clares, R. A. (2011) The disulfiram metabolites *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamoyl sulfoxide and *S*-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamoyl sulfone irreversibly inactivate betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, both *in vitro* and *in situ*, and arrest bacterial growth. *Biochimie* **93**, 286–295
- 15 Feldman, R. I. and Weiner, H. (1972) Horse liver aldehyde dehydrogenase. II. Kinetics and mechanistic implications of the dehydrogenase and esterase activity. *J. Biol. Chem.* **247**, 267–272
- 16 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
- 17 Valenzuela-Soto, E. M. and Muñoz-Clares, R. A. (1993) Betaine-aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an Iso Ordered Bi Bi Steady State mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**, 23818–23823
- 18 Figueroa-Soto, C. G. and Valenzuela-Soto, E. M. (2000) Kinetic study of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 596–603
- 19 Perozich, J., Kuo, I., Wang, B. C., Boesch, J. S., Lindahl, R. and Hempel, J. (2000) Shifting the NAD/NADP preference in class 3 aldehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6197–6203
- 20 Perez-Miller, S. J. and Hurley, T. D. (2003) Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **42**, 7100–7109
- 21 Hammen, P. K., Allali-Hassani, A., Hallenga, K., Hurley, T. D. and Weiner, H. (2002) Multiple conformations of NAD and NADH when bound to human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **41**, 7156–7168
- 22 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
- 23 González-Segura, L., Velasco-García, R., Rudiño-Piñera, E., Mújica-Jiménez, C. and Muñoz-Clares, R. A. (2005) Site-directed mutagenesis and homology modelling indicate an important role of cysteine 439 in the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* **87**, 1056–1064
- 24 González-Segura, L., Rudiño-Piñera, E., Muñoz-Clares, R. A. and Horjales, E. (2009) The crystal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* provides new insight into the reaction mechanism and shows a novel binding mode of the 2'-phosphate of NADP⁺ and a novel cation binding site. *J. Mol. Biol.* **385**, 542–557
- 25 Leslie, A. G. W. (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* **26**, 22–33
- 26 The CCP4 suite: programs for protein crystallography (1994) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760–763, Collaborative Computational Project Number 4
- 27 Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Method Enzymol.* **276**, 307–326
- 28 McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674
- 29 Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Read, R. J., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K. and Terwilliger, T. C. (2002) PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58**, 1948–1954
- 30 Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D* **60**, 2126–2132
- 31 Potterton, L., McNicholas, S., Krissinel, E., Gruber, J., Cowtan, K., Emsley, P., Murshudov, G. N., Cohen, S., Perrakis, A. and Noble, M. (2004) Developments in the CCP4 molecular-graphics project. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2288–2294
- 32 Reference deleted
- 33 Valenzuela-Soto, E., Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Gaviria-González, 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
- 34 Liu, Z. J., Sun, Y. J., Rose, J., Chung, Y. J., Hisao, 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. Mol. Biol.* **4**, 317–326
- 35 Hope, H. (1969) The crystal structure of 1-(2,6-dichlorobenzyl)-6-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydronicotinamide dihydrate. *Acta Crystallogr. B* **25**, 78–87
- 36 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
- 37 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
- 38 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
- 39 Wymore, T., Deerfield, D. W. and Hempel, J. (2007) Mechanistic implications of the cysteine–nicotinamide adduct in aldehyde dehydrogenase based on quantum mechanical/molecular mechanical simulations. *Biochemistry* **46**, 9495–9506
- 40 Van Eys, J. and Kaplan, N. O. (1957) The addition of sulfhydryl compounds to diphosphopyridine nucleotide and its analogues. *J. Biol. Chem.* **228**, 305–314
- 41 Patai, S. and Rappoport, Z. (1964) Nucleophilic attacks on carbon–carbon double bonds. In *The Alkenes: Volume 1. In The Chemistry of Functional Groups* (Patai, S., ed.), pp. 469–584, Wiley Interscience, New York
- 42 Dittmer, D. C. and Kolyer, J. M. (1963) Addition compounds of thiols and 1-substituted nicotinamides. *J. Org. Chem.* **28**, 1720–1722
- 43 Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R. and Wolfson, H. J. (2005) PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res.* **33**, 363–367

Received 28 March 2011/30 June 2011; accepted 7 July 2011

Published as BJ Immediate Publication 7 July 2011, doi:10.1042/BJ20110376

SUPPLEMENTARY ONLINE DATA

Novel NADPH–cysteine covalent adduct found in the active site of an aldehyde dehydrogenase

Ángel G. DÍAZ-SÁNCHEZ*, Lilian GONZÁLEZ-SEGURA*, Enrique RUDIÑO-PIÑERA†, Alfonso LIRA-ROCHA‡, Alfredo TORRES-LARIOS§ and Rosario A. MUÑOZ-CLARES*¹

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D. F., CP 04510, México, †Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, CP 62250, México, ‡Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D. F., CP 04510, México, and §Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70-243, México D. F., CP 04510, México

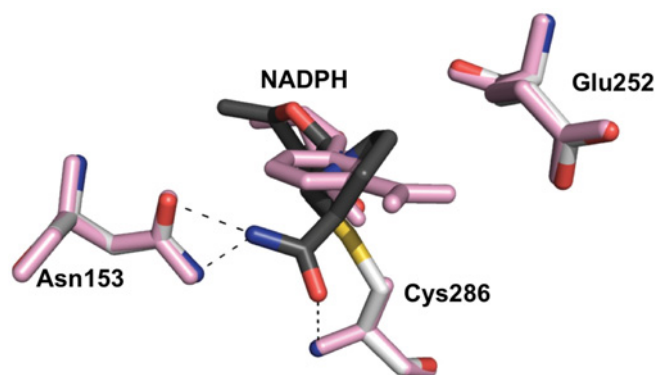
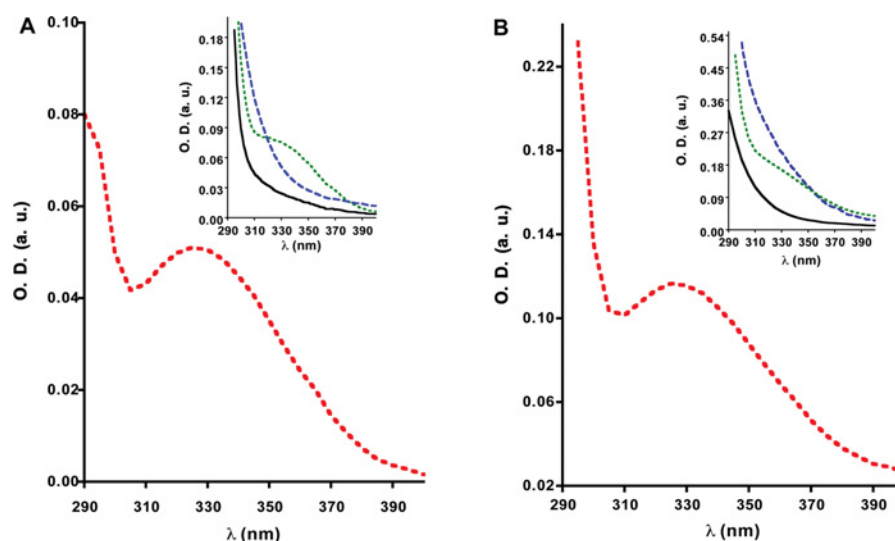


Figure S1 Interactions of the carboxamide group of NADPH in the active site of subunit A of the wild-type PaBADH crystal structure

A rotation of -145° of the pyridine ring around the glycosidic bond, together with a rotation of -37° of the carboxamide group, positioned the O7N and 7N7 inside the oxyanion hole, where they made hydrogen bonds with the amide group of the lateral chain of Asn¹⁵³ and the NH group of the main chain of Cys²⁸⁶, the catalytic cysteine residue. PaBADH residues and the NADPH molecule are shown as sticks with carbon atoms in grey (light grey for protein, dark grey for NADPH), and oxygen and sulfur atoms in red and yellow respectively. Hydrogen bonds (cut-off 3.5 Å) are depicted as broken black lines. For comparison, the conformation of the nicotinamide observed in subunit B is shown superimposed in pink. The Figure was generated using PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

¹ To whom correspondence should be addressed (email clares@servidor.unam.mx).

The structural co-ordinates reported for the binary complexes of wild-type PaBADH and the Cys286Ala mutant with NADPH will appear in the PDB under accession codes 2WOX and 3ZQA respectively.


Figure S2 UV absorption spectra of the NAD(P)–Cys²⁸⁶ adducts

Enzyme samples (8.4 μ M as active sites) were incubated with 1 mM NADP⁺ (**A**) or 2 mM NAD⁺ (**B**) at 25 °C in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 250 mM KCl, 1 mM EDTA and 10% (v/v) glycerol (Buffer A). The difference UV spectra of NADP⁺ (broken red lines) were obtained by subtracting the spectra of NAD(P)⁺ (continuous black lines) and of the enzyme (broken blue lines) from those of the enzyme plus NAD(P)⁺ (broken green lines). The difference spectra show the peak characteristic of thiol–NAD(P) adducts [1]. a.u., absorbance units; O. D., absorbance.

Table S1 Interactions* of the NADPH molecule in the *Hyd*₁ conformation in the active site of the wild-type and Cys286Ala mutant PaBADHs

| NADPH | Atom of protein residue or solvent | Distance (Å) | |
|-----------------------------|------------------------------------|--------------|-----------|
| | | Wild-type | Cys286Ala |
| Adenine ribose | | | |
| O2B | NZ Lys ¹⁷⁶ | 3.04 | 3.04 |
| O3B | NZ Lys ¹⁷⁶ | 3.36† | 3.44‡ |
| | O Gly ¹⁵⁰ | 2.60 | 2.76 |
| Adenine ribose 2'-phosphate | | | |
| O1X | NZ Lys ¹⁷⁶ | 2.85 | 2.95 |
| | N Glu ¹⁷⁹ | 2.76 | 2.59 |
| O2X | N Gly ²⁰⁹ | 3.01 | 2.75 |
| O3X | OG Ser ¹⁷⁸ | 2.73§ | 2.81 |
| Adenine phosphate | | | |
| O1A | OG1 Thr ²³³ | 2.74 | 2.60 |
| | N Gly ²³⁰ | 2.92 | 3.11¶ |
| | OG1 Thr ²³³ | 2.66 | – |
| Nicotinamide phosphate | | | |
| O1N | NE1 Trp ¹⁵² | – | 2.88 |
| O2N | NE1 Trp ¹⁵² | 3.15 | – |
| Nicotinamide ribose | | | |
| O2D | OE2 Glu ³⁸⁷ | 2.68 | 2.66 |
| O3D | OE1 Glu ³⁸⁷ | 3.00 | 2.51 |
| | O Gly ²²⁹ | 3.46 | – |
| Nicotinamide ring | | | |
| N7N | O Leu ²⁵³ | 2.36 | 2.81 |
| | O2 Glycerol | 3.24** | 3.17** |
| O7N | O2 Glycerol | 2.79** | 2.90** |
| | O1 PEG | – | 2.41†† |

*Shortest contacts (less than 3.5 Å) with protein atoms and compounds from the crystallization medium.

†Interaction found in subunits A and C.

‡Interaction found in subunit A.

§Interaction found in subunits B and D.

||Interaction found in subunit D.

¶Interaction found in subunits A, B and C.

**The O2 of glycerol cannot interact simultaneously with O7N and N7N.

††Interaction found in subunit A with O1 of poly(ethylene glycol), in subunits B and D with the O1 and O3 of glycerol respectively, and in subunit C with a water molecule.

Table S2 Interactions* of the NADPH molecule in the Hyd_n conformation in the active site of the wild-type PaBADH

Wat, water.

| NADPH | Atom of protein residue or solvent | Distance (Å)† |
|-----------------------------|------------------------------------|---------------|
| Adenine ribose | | |
| O2B | NZ Lys ¹⁷⁶ | 3.27 |
| | N Gly ²⁰⁹ | 3.26 |
| O3B | NZ Lys ¹⁷⁶ | 3.49 |
| | O Gly ¹⁵⁰ | 2.77 |
| Adenine ribose 2'-phosphate | | |
| O1X | NZ Lys ¹⁷⁶ | 2.96 |
| | N Glu ¹⁷⁹ | 2.44 |
| O2X | N Gly ²⁰⁹ | 2.86 |
| | Wat 2352 | 2.71 |
| O3X | O1N Nicotinamide phosphate | 3.35 |
| | Wat 2355 | 3.08 |
| Adenine phosphate | | |
| O2A | N Gly ²³⁰ | 2.44 |
| O3 | OG1 Thr ²³³ | 3.08 |
| Nicotinamide phosphate | | |
| O1N | O3X Adenine ribose 2'-phosphate | 3.35 |
| | Wat 2355 | 3.47 |
| | Wat 2353 | 3.24 |
| Nicotinamide ribose | | |
| O2D | N6A Adenine | 2.54 |
| | N7A Adenine | 2.87 |
| O3D | NZ Lys ²³⁶ | 3.30 |
| O4D | NH1 Arg ²¹⁰ | 3.14 |
| | NH2 Arg ²¹⁰ | 2.95 |
| | NE Arg ²¹⁰ | 3.42 |
| | Wat 2352 | 2.51 |

*Shortest contacts (less than 3.5 Å) with protein atoms.

†Interaction found in subunit C.

REFERENCE

- van Eys, J. and Kaplan, N. O. (1957) The addition of sulfhydryl compounds to diphosphopyridine nucleotide and its analogues. *J. Biol. Chem.* **228**, 305–314

Received 28 March 2011/30 June 2011; accepted 7 July 2011

Published as BJ Immediate Publication 7 July 2011, doi:10.1042/BJ20110376

Amino Acid Residues Critical for the Specificity for Betaine Aldehyde of the Plant ALDH10 Isoenzyme Involved in the Synthesis of Glycine Betaine^{1[W][OA]}

Ángel G. Díaz-Sánchez², Lilian González-Segura², Carlos Mújica-Jiménez, Enrique Rudiño-Piñera, Carmina Montiel³, León P. Martínez-Castilla, and Rosario A. Muñoz-Clares*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico Distrito Federal, Mexico (A.G.D.-S., L.G.-S., C.M.-J., C.M., L.P.M.-C., R.A.M.-C.); and Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico (E.R.-P.)

Plant Aldehyde Dehydrogenase10 (ALDH10) enzymes catalyze the oxidation of ω -primary or ω -quaternary aminoaldehydes, but, intriguingly, only some of them, such as the spinach (*Spinacia oleracea*) betaine aldehyde dehydrogenase (SoBADH), efficiently oxidize betaine aldehyde (BAL) forming the osmoprotectant glycine betaine (GB), which confers tolerance to osmotic stress. The crystal structure of SoBADH reported here shows tyrosine (Tyr)-160, tryptophan (Trp)-167, Trp-285, and Trp-456 in an arrangement suitable for cation- π interactions with the trimethylammonium group of BAL. Mutation of these residues to alanine (Ala) resulted in significant K_m (BAL) increases and V_{max}/K_m (BAL) decreases, particularly in the Y160A mutant. Tyr-160 and Trp-456, strictly conserved in plant ALDH10s, form a pocket where the bulky trimethylammonium group binds. This space is reduced in ALDH10s with low BADH activity, because an isoleucine (Ile) pushes the Trp against the Tyr. Those with high BADH activity instead have Ala (Ala-441 in SoBADH) or cysteine, which allow enough room for binding of BAL. Accordingly, the mutation A441I decreased the V_{max}/K_m (BAL) of SoBADH approximately 200 times, while the mutation A441C had no effect. The kinetics with other ω -aminoaldehydes were not affected in the A441I or A441C mutant, demonstrating that the existence of an Ile in the second sphere of interaction of the aldehyde is critical for discriminating against BAL in some plant ALDH10s. A survey of the known sequences indicates that plants have two ALDH10 isoenzymes: those known to be GB accumulators have a high-BAL-affinity isoenzyme with Ala or cysteine in this critical position, while non GB accumulators have low-BAL-affinity isoenzymes containing Ile. Therefore, BADH activity appears to restrict GB synthesis in non-GB-accumulator plants.

Osmotic stress caused by drought, salinity, or low temperatures is a major limitation of agricultural production. Some plants synthesize and accumulate glycine betaine (GB), the most efficient osmoprotector known (Courtenay et al., 2000), when subjected to osmotic stress (Hanson and Wyse, 1982; Yancey et al.,

1982; Weretilnyk et al., 1989; Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994). It is generally accepted that GB is synthesized in the chloroplast stroma, as it is in spinach (*Spinacia oleracea*; Hanson et al., 1985), by a two-step oxidation of choline: first the alcohol group of choline is oxidized to the aldehyde group of betaine aldehyde (BAL) in a reaction catalyzed by choline monooxygenase (EC1.14.15.7; CMO), an enzyme unique to plants (Burnet et al., 1995); then the aldehyde group of BAL is oxidized to the acid group of GB in a reaction catalyzed by plant betaine aldehyde dehydrogenase [betaine aldehyde:NAD(P)⁺ oxidoreductase (EC 1.2.1.8); BADH; Hanson et al., 1985; Arakawa et al., 1987; Weretilnyk and Hanson, 1989; Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994; Burnet et al., 1995; Hibino et al., 2001; Nakamura et al., 2001; Fujiwara et al., 2008; Kopěčný et al., 2011], an enzyme that belongs to the aldehyde dehydrogenase family10 (ALDH10; Vasiliou et al., 1999). Engineering the synthesis of GB in crops that naturally lack this ability has been a biotechnological goal for improving tolerance to osmotic stress (McNeil et al., 1999; Rontein et al., 2002; Waditee et al., 2007). The several attempts made so far have had limited success, stressing the need for a better understanding of the structural and functional

¹ This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (grant no. IN204708 to R.A.M.-C.) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant no. 101986 to L.G.-S., doctoral scholarship to A.G.D.-S., and postdoctoral fellowship to C.M.).

² These authors contributed equally to the article.

³ Present address: Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico Distrito Federal, Mexico.

* Corresponding author; e-mail clares@unam.mx.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Rosario A. Muñoz-Clares (clares@unam.mx).

[W] The online version of this article contains Web-only data.

[OA] Open Access articles can be viewed online without a subscription.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.112.194514

properties of the enzymes involved in the GB biosynthetic pathway.

Most biochemically characterized plant ALDH10s appear to be ω -aminoaldehyde dehydrogenases (AMADHs) that can oxidize small aldehydes possessing an ω -primary amine group, such as 3-aminopropionaldehyde (APAL) and 4-aminobutyraldehyde (ABAL; Trossat et al., 1997; Vojtechová et al., 1997; Sebela et al., 2000; Livingstone et al., 2003; Oishi and Ebina, 2005; Bradbury et al., 2008; Fujiwara et al., 2008), or an ω -quaternary amino (trimethylammonium) group, as in BAL and 4-trimethylaminobutyraldehyde (TMABAL; Brauner et al., 2003; Fujiwara et al., 2008). In addition, unsurprisingly, given the structural similarity between the trimethylammonium and dimethylsulfonium groups, some plant BADHs can also use as substrate 3-dimethylsulfoniopropionaldehyde to produce the osmoprotectant 3-dimethylsulfoniopropionate (Trossat et al., 1997; Vojtechová et al., 1997; Fig. 1). Because of their relatively broad specificity, the plant ALDH10 enzymes may be involved not only in the synthesis of these two osmoprotectants but also in the synthesis of others, such as β -Ala betaine (Rathinasabapathi et al., 2000) and 4-aminobutyric acid (Bouché and Fromm, 2004), as well as in polyamine catabolism and the synthesis of carnitine (Fig. 1). To date, there are no other known plant ALDHs with AMADH or BADH activities other than the ALDH10 enzymes. With the exception of the two BADH isoenzymes from the mangrove plant *Avicennia marina* (Hibino et al., 2001), plant ALDH10s oxidize ω -primary aminoaldehydes with similar, or even higher, efficiency than they oxidize BAL, but

some of these enzymes exhibit a very low activity with BAL (Sebela et al., 2000; Livingstone et al., 2003; Bradbury et al., 2008; Fujiwara et al., 2008), for as yet unknown reasons. On the basis of their affinity and activity with BAL, it has been proposed that plant BADHs constitute two subfamilies: true BADHs and high-BADH-homology aminoaldehyde dehydrogenases (Fitzgerald et al., 2009).

Neither how some ALDH10 enzymes discriminate against BAL nor the structural bases for BAL binding is known. Here, to our knowledge for the first time, we present the crystal structure of a chloroplastic ALDH10 with high BADH activity, the one from spinach (*Spinacia oleracea*; SoBADH), and report the results of site-directed mutagenesis of the residues involved in the binding of BAL as well as of the critical residue involved in discriminating BAL from other aminoaldehydes in those plant ALDH10s with poor BADH activity.

RESULTS

Overall Description of the SoBADH Three-Dimensional Structure

The structure of SoBADH in complex with NAD^+ was determined at 2.3 Å resolution. The crystal belongs to the P1 space group and contains four subunits in the asymmetric unit describing two dimers, each of which corresponds to the biological unit of the enzyme (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994). The final model has an R_{work} value of 21.3% and an R_{free} value of

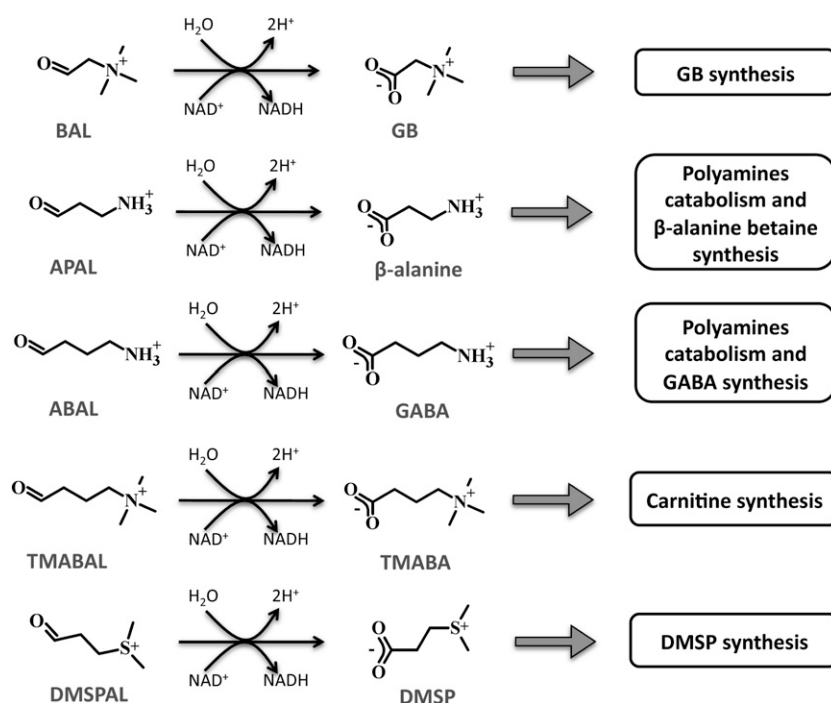


Figure 1. Physiological roles of the reactions catalyzed by plant ALDH10 enzymes with ω -aminoaldehydes and 3-dimethylsulfoniopropionaldehyde as substrates. DMSP, 3-Dimethylsulfoniopropionate; DMSPAL, 3-dimethylsulfoniopropionaldehyde; GABA, 4-aminobutyrate; TMBA, 4-trimethylaminobutyrate.

24.6%. R_{work} is a measure of the agreement between the crystallographic model and the experimental x-ray diffraction data. $R_{\text{work}} = \sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum F_{\text{obs}}$, where F_{obs} and F_{calc} are the observed and the calculated structure factors, respectively. R_{free} is an R calculated using only 5% of reflections, which were randomly chosen and omitted from refinement. All data collection and refinement statistics are summarized in Supplemental Table S1. The folding (Supplemental Fig. S1) and topology (Supplemental Fig. S2) are very similar to those of every ALDH of known three-dimensional structure. The two K^+ -binding sites, one intrasubunit and the other intersubunit, which were previously found in the tetrameric BADH from *Pseudomonas aeruginosa* (González-Segura et al., 2009) also occur in the dimeric SoBADH.

Role of Aromatic Residues in the BAL-Binding Site of SoBADH

An inspection of the SoBADH crystal structure revealed four aromatic residues, Tyr-160, Trp-167, Trp-285, and Trp-456, in an arrangement suitable for the binding of the trimethylammonium group of BAL through cation- π interactions (Fig. 2A). As a first step to evaluate whether these residues play a role in substrate recognition and enzyme specificity, we constructed an energy-minimized model of the SoBADH active site with BAL productively bound, so that its carbonyl oxygen is inside the oxyanion hole (Muñoz-Clares et al., 2010), accepting two hydrogen bonds, one from the side chain amide nitrogen of Asn-159 and the other from the main-chain nitrogen of the catalytic Cys (Cys-291; SoBADH numbering), and its carbonyl carbon is in a position suitable for accepting the nucleophilic attack of the catalytic Cys. In the model, the trimethylammonium group is surrounded by the four aromatic residues at distances in the range of 3.2 to 4.2 Å, consistent with their involvement in BAL binding (Fig. 2B). The tunnel through which the aldehyde enters the active site has an irregular shape, widening in the vicinity of the catalytic Cys (Fig. 2C). The molecular electrostatic potential of the surface of this tunnel is clearly negative, mainly due to Glu and Asp residues near the tunnel entrance and to the aromatic rings of the four residues mentioned above, located where the trimethylammonium group binds (Fig. 2C). The side chain aromatic electrons contribute to the binding of the positively charged trimethylammonium group of BAL through cation- π interactions.

To determine the relative contribution of these four aromatic residues to the binding of BAL, we individually mutated each of them to Ala to exclude the possibility for π -cation stabilization of the BAL trimethylammonium group. The kinetics of the pure mutant enzymes were studied with BAL, APAL, ABAL, and TMABAL as substrates. Steady-state kinetics studies were carried out at pH 8.0, which is close to the physiological intrachloroplast pH value in spinach under light conditions (7.88; Werdan and Heldt, 1972),

and at fixed 0.2 mM NAD^+ , which is the concentration estimated to exist in the stroma of spinach chloroplast (0.19; Heineke et al., 1991). This NAD^+ concentration was found to be saturating or near saturating for both the wild-type and mutant enzymes in experiments in which the concentration of NAD^+ was varied at a fixed concentration of BAL [a high but noninhibitory concentration that was at least four times the $K_m(\text{BAL})$ value of each enzyme; Supplemental Table S2].

The wild-type SoBADH exhibited kinetic parameters for BAL, APAL, and ABAL (Table I; Fig. 2D) similar to those reported earlier for this enzyme (Incharoensakdi et al., 2000). The kinetics of TMABAL were comparable to those of APAL and ABAL. The V_{max} and K_m values determined using BAL as substrate were between four and nine times and between 12 and 26 times higher, respectively, than the values obtained using the other ω -aminoaldehydes, whose tighter binding to the enzyme appears to correlate with a slower catalysis. This results in a higher (between 1.2 and 4.3 times) catalytic efficiency (measured as V_{max}/K_m) for the other ω -aminoaldehydes tested than for BAL (Table I; Fig. 2D). The mutant enzymes exhibited significantly increased $K_m(\text{BAL})$ and decreased $V_{\text{max}}/K_m(\text{BAL})$ values, particularly the Y160A mutant, which had 140 times higher $K_m(\text{BAL})$ and 550 times lower $V_{\text{max}}/K_m(\text{BAL})$ than the wild-type SoBADH (Table I; Fig. 2D), indicating that the Tyr

Table I. Kinetic parameters of wild-type and mutant SoBADH enzymes using different ω -aminoaldehydes as substrates

Initial velocities were obtained at 30°C, pH 8.0, and 0.2 mM NAD^+ . The kinetic parameters \pm SE were estimated by nonlinear regression of the experimental data to Equations 1 or 2, as appropriate. V_{max} and K_m values are given as units/mg protein and μM , respectively.

| Enzyme | V_{max} | K_m | V_{max}/K_m |
|---------------|------------------------------|--|---|
| BAL | | | |
| Wild type | 5.4 \pm 0.1 | 69 \pm 5 | 7.8 \pm 0.4 ($\times 10^{-2}$) |
| Y160A | 1.4 \pm 0.1 ^b | 9.7 \pm 1.2 ($\times 10^3$) ^b | 1.4 \pm 0.8 ($\times 10^{-4}$) ^b |
| W167A | 0.62 \pm 0.01 ^b | 2.9 \pm 0.2 ($\times 10^2$) ^b | 2.1 \pm 0.1 ($\times 10^{-3}$) ^b |
| W285A | 3.4 \pm 0.4 | 1.2 \pm 0.3 ($\times 10^3$) ^b | 2.8 \pm 0.3 ($\times 10^{-3}$) ^b |
| W456A | 1.7 \pm 0.2 ^b | 2.4 \pm 0.5 ($\times 10^2$) ^b | 7.0 \pm 0.7 ($\times 10^{-3}$) ^b |
| APAL | | | |
| Wild type | 0.70 \pm 0.04 ^a | 2.6 \pm 0.3 ^a | 2.7 \pm 0.4 ($\times 10^{-1}$) ^a |
| Y160A | 0.86 \pm 0.21 | 2.0 \pm 0.2 ($\times 10^2$) ^b | 4.4 \pm 0.4 ($\times 10^{-3}$) ^b |
| W167A | 0.49 \pm 0.01 ^b | 3.6 \pm 0.3 | 1.4 \pm 0.1 ($\times 10^{-1}$) |
| W285A | 0.14 \pm 0.01 ^b | 3.3 \pm 0.8 | 4.2 \pm 0.4 ($\times 10^{-2}$) ^b |
| W456A | 0.52 \pm 0.08 | 3.9 \pm 0.8 | 1.3 \pm 0.0 ($\times 10^{-1}$) |
| ABAL | | | |
| Wild type | 0.58 \pm 0.03 ^a | 5.5 \pm 0.6 ^a | 1.0 \pm 0.2 ($\times 10^{-1}$) |
| Y160A | 0.34 \pm 0.02 ^b | 1.2 \pm 0.1 ($\times 10^2$) ^b | 2.8 \pm 0.2 ($\times 10^{-3}$) ^b |
| W167A | 1.4 \pm 0.1 ^b | 31 \pm 6 ^b | 4.5 \pm 0.4 ($\times 10^{-2}$) ^b |
| W285A | 0.30 \pm 0.00 ^b | 2.3 \pm 0.2 ^b | 1.3 \pm 0.1 ($\times 10^{-1}$) |
| W456A | 0.19 \pm 0.03 ^b | 4.3 \pm 0.6 | 4.4 \pm 0.0 ($\times 10^{-2}$) ^b |
| TMABAL | | | |
| Wild type | 1.2 \pm 0.0 ^a | 3.6 \pm 0.2 ^a | 3.4 \pm 0.1 ($\times 10^{-1}$) ^a |
| Y160A | 0.68 \pm 0.02 ^b | 86 \pm 8 ^b | 7.9 \pm 0.6 ($\times 10^{-3}$) ^b |
| W167A | 0.85 \pm 0.03 | 3.7 \pm 0.6 | 2.3 \pm 0.3 ($\times 10^{-1}$) |
| W285A | 0.47 \pm 0.01 ^b | 1.8 \pm 0.2 | 2.6 \pm 0.3 ($\times 10^{-1}$) |
| W456A | 0.19 \pm 0.02 ^b | 1.5 \pm 0.4 ^b | 1.3 \pm 0.2 ($\times 10^{-1}$) ^b |

^aThe estimated parameter is different to that determined for the wild-type enzyme with 99% confidence. ^bThe estimated parameter is different to that determined with BAL with 99% confidence.

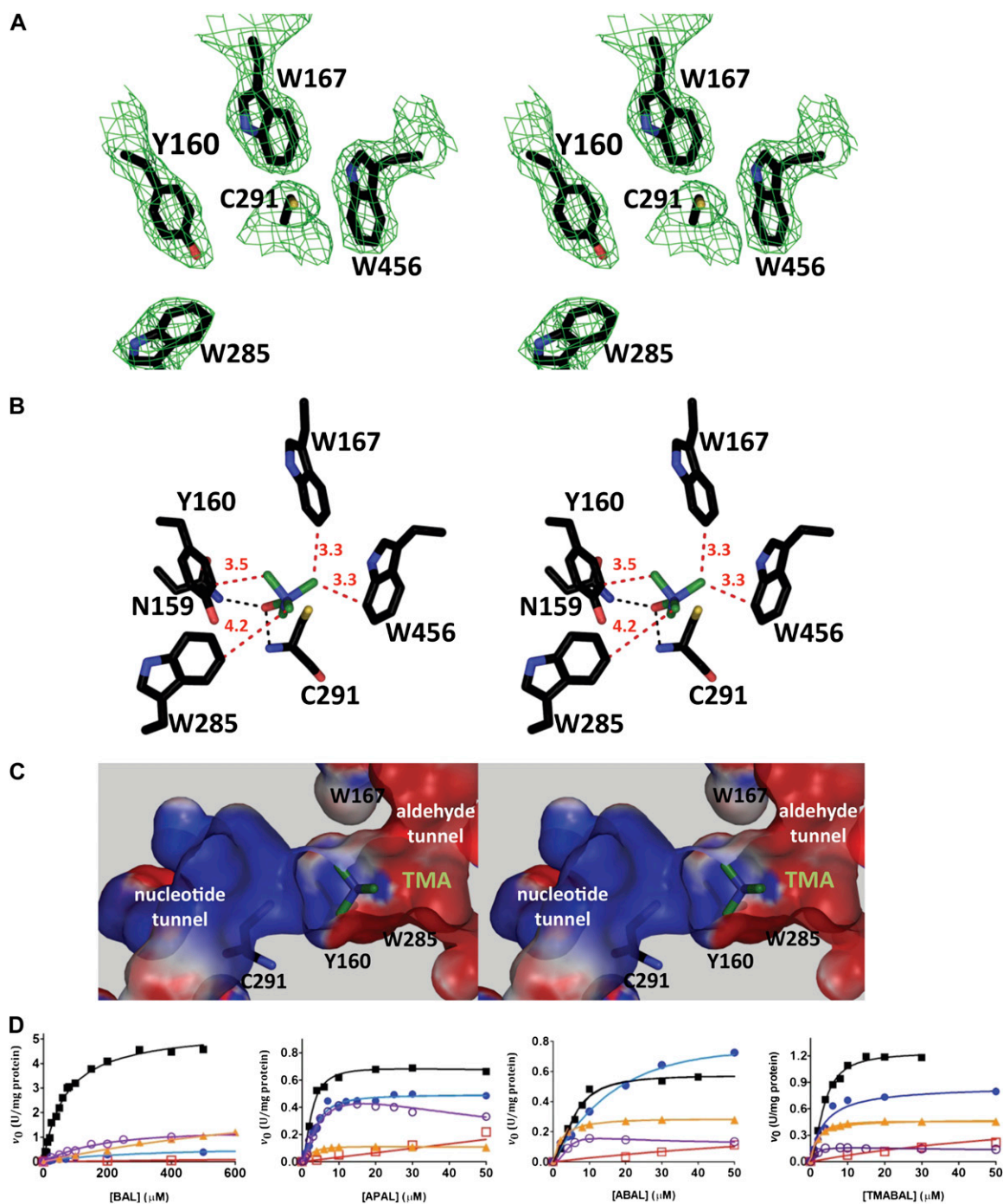


Figure 2. Aromatic residues involved in binding of BAL to SoBADH. **A**, Stereoview of the $2F_o - F_c$ map contoured at 1σ showing the aromatic residues in the aldehyde-binding site. **B** and **C**, Stereoviews of energy-minimized models of a BAL molecule docked into the active site showing the most favorable position of the trimethylammonium group when the carbonyl oxygen is kept inside the oxyanion hole and the carbonyl carbon is trigonal. In **C**, a section of the SoBADH active site shows the surface electrostatic potentials (-10 kT/e, red; 10 kT/e, blue) of the solvent-accessible molecular surface of the aldehyde and nucleotide entrance tunnels. Aromatic side chains are shown as sticks, with carbon atoms in black, oxygen in red, nitrogen in blue, and sulfur in yellow. The methyl groups are shown as green sticks. Distances of the methyl groups to the aromatic residues are given in angstroms and are depicted as red dashed lines. The hydrogen bonds between the carbonyl oxygen of the aldehyde and the oxyanion groups (i.e. the side chain amide nitrogen of Asn-159 and the main chain amide nitrogen of Cys-295) are depicted as black dashed lines. These panels were generated using PyMOL (DeLano, 2002). **D**, Saturation curves of wild-type SoBADH (black squares) and the mutants Y160A (red squares), W167A (blue circles), W285A (orange triangles), and W456A (violet circles) with BAL, APAL, ABAL, and TMABAL as substrates. Assays were carried out at pH 8.0 and fixed 0.2 mM NAD^+ . The points

aromatic ring is of the utmost importance for binding of the aldehyde. On the basis of the observed changes in K_m (BAL), Trp-285 also appears to be very important for the productive BAL binding, followed by Trp-167 and last by Trp-456. Although in our energy-minimized model Trp-285 is the farthest from the methyl groups of BAL, the significant effect of its mutation may be due in part to the loss of the van der Waals interactions of its indole ring carbon atoms CH2 and CZ3 with the phenol oxygen of Tyr-160. These interactions contribute to maintain the position of Tyr-160, which allows binding of the trimethylammonium group (see below). The mutant enzymes exhibited decreased V_{max} values, but to a lesser extent than the increases in K_m values. The exception was the W167A mutant, which had a greater effect on V_{max} than on K_m . Interestingly, the mutation of the four aromatic residues had a much smaller effect on the kinetics of SoBADH with APAL, ABAL, and TMABAL than on those with BAL (Table I; Fig. 2D). The mutant enzymes W167A, W285A, and W456A exhibited small changes in K_m for APAL, ABAL, and TMABAL compared with the wild-type enzyme, indicating that their affinity for these aldehydes has not been importantly affected and, therefore, that these aromatic residues do not contribute to their binding. The V_{max} values determined using these aldehydes as substrates were not importantly affected by the mutation of these three aromatic residues. Consequently, neither were the V_{max}/K_m values. The Y160A mutant, however, exhibited an 80 times increase in the K_m value for APAL and around 20 times increases in the K_m values for ABAL and TMABAL with respect to the wild-type SoBADH, resulting in importantly decreased V_{max}/K_m values. Multiple alignments of the known plant ALDH10 amino acid sequences indicated that Tyr-160, Trp-167, and Trp-456 are strictly conserved residues in these enzymes, whereas Trp-285 is a Phe or an Ala in some of them. On the basis of our results, it could be speculated that those enzymes with an Ala in the position equivalent to Trp-285 in SoBADH would use APAL, ABAL, and TMABAL as substrates preferentially to BAL.

Residues Involved in Discriminating against the Binding of BAL in Plant ALDH10 Enzymes

To date, there are only three plant ALDH10 enzymes whose three-dimensional structures are known: the SoBADH reported here (Protein Data Bank [PDB] code 4A0M) and two isoenzymes from pea (*Pisum sativum* [PsAMADH1 and PsAMADH2; PDB codes 3IWK and 3IWJ, respectively]; Tylichová et al., 2010). As none of the pea enzymes can use BAL as substrate (Šebela et al., 2000; Tylichová et al., 2010) whereas the spinach enzyme uses this aldehyde very efficiently, we com-

pared the active sites of SoBADH and PsAMADH2 to find out the structural reasons for this important difference between them. We choose PsAMADH2 for this comparison because it has a Trp residue in the position of Trp-285 of SoBADH, whereas PsAMADH1 has a Phe. The superposition of the aldehyde-binding sites of the two enzymes shows that every residue lining the aldehyde entrance tunnel has a very similar conformation in both of them, with the exception of the side chain of the Trp residue equivalent to Trp-456 (Trp-459 in PsAMADH2), which in the pea enzyme is closer to the phenol group of the side chain of the Tyr residue equivalent to Tyr-160 (Tyr-163 in PsAMADH2) than in the spinach enzyme. This results in a narrower cavity in PsAMADH2 than in SoBADH at the place where the bulky trimethylammonium group of the BAL should be accommodated (Fig. 3, A and B). Energy-minimized models of the productively bound BAL molecule indicated that the trimethylammonium group can be bound in SoBADH but that it clashes with the Trp residue in PsAMADH2 (Fig. 3C). The reason for this is the different position of the Trp side chain in PsAMADH2, which is pushed toward the phenol group of the Tyr by the side chain of a non-active site residue (an Ile [Ile-444; PsAMADH2 numbering]) that is behind and in close contact with the indole ring, at van der Waals distance (3.6 Å). Instead of Ile-444, SoBADH has Ala-441, whose much smaller side chain allows Trp-456 to be at a distance from Tyr-160 sufficient for accommodating the trimethylammonium group of BAL (Fig. 3C). To investigate whether this difference in a residue in the second sphere of interaction of the aldehyde could account for the differences in BAL specificity between the spinach and pea enzymes, we individually mutated Ala-441 in SoBADH for an Ile. As expected, the mutant A441I enzyme showed a greatly reduced affinity for BAL, indicated by a K_m (BAL) value 23 times higher than that of the wild-type enzyme. It also exhibited an approximately seven times lower V_{max} , which results in a decrease in the catalytic efficiency of the mutant A441I with BAL as substrate [V_{max}/K_m (BAL)] of around 160 times. On the contrary, the K_m and V_{max} values for the other ω -aminoaldehydes were very similar to those of the wild-type enzyme (Table II; Fig. 3, D and E). These results confirm our hypothesis of the critical importance of the side chain of the residue behind the indole ring of the Trp residue equivalent to Trp-456 for plant ALDH10s to discriminate against BAL.

The only other plant ALDH10 that so far has been found to have a very poor affinity for BAL is the barley (*Hordeum vulgare*) BADH isoenzyme called BBD1 by the authors (Fujiwara et al., 2008), which also has an Ile in this position. Interestingly, barley has another BADH isoenzyme with a high affinity for BAL, called

Figure 2. (Continued.)

shown are experimentally determined values, and the lines drawn through these points are those calculated from the best fit of the data by nonlinear regression to Equation 1. Other experimental details are described in "Materials and Methods."

Table II. Kinetic parameters of wild-type and mutant SoBADH enzymes using different ω -aminoaldehydes as substrates

Initial velocities were obtained at 30°C, pH 8.0, and 0.2 mM NAD⁺. The kinetic parameters \pm SE were estimated by nonlinear regression of the experimental data to Equations 1 or 2, as appropriate. V_{\max} and K_m values are given as units/mg protein and μ M, respectively.

| Enzyme | V_{\max} | K_m | V_{\max}/K_m |
|-----------|------------------------------|--|---|
| BAL | | | |
| Wild type | 5.4 \pm 0.1 | 69 \pm 5 | 7.8 \pm 0.4 ($\times 10^{-2}$) |
| A441I | 0.77 \pm 0.02 ^a | 1.6 \pm 0.2 ($\times 10^3$) ^a | 4.7 \pm 0.4 ($\times 10^{-4}$) ^a |
| A441C | 5.1 \pm 0.6 | 120 \pm 20 | 4.3 \pm 0.7 ($\times 10^{-2}$) ^a |
| APAL | | | |
| Wild type | 0.70 \pm 0.04 | 2.6 \pm 0.3 | 2.7 \pm 0.4 ($\times 10^{-1}$) |
| A441I | 0.65 \pm 0.01 | 2.5 \pm 0.1 | 2.6 \pm 0.8 ($\times 10^{-1}$) |
| A441C | 0.78 \pm 0.16 | 2.8 \pm 0.6 | 2.7 \pm 0.2 ($\times 10^{-1}$) |
| ABAL | | | |
| Wild type | 0.58 \pm 0.03 ^a | 5.5 \pm 0.6 | 1.0 \pm 0.2 ($\times 10^{-1}$) |
| A441I | 1.05 \pm 0.06 ^a | 3.8 \pm 0.5 | 2.7 \pm 0.2 ($\times 10^{-1}$) |
| A441C | 0.58 \pm 0.05 | 1.8 \pm 0.2 ^a | 3.2 \pm 0.5 ($\times 10^{-1}$) |
| TMABAL | | | |
| Wild type | 1.2 \pm 0.02 | 3.6 \pm 0.2 ^a | 3.4 \pm 0.1 ($\times 10^{-1}$) |
| A441I | 0.70 \pm 0.2 ^a | 2.8 \pm 0.3 | 2.5 \pm 0.2 ($\times 10^{-1}$) |
| A441C | 0.88 \pm 0.22 ^a | 2.7 \pm 0.2 | 3.2 \pm 0.2 ($\times 10^{-1}$) |

^aThe estimated parameter is different to that determined for the wild-type enzyme with 99% confidence.

BBD2, which possesses a Cys residue in the position of Ala-441 of SoBADH (Cys-439; BBD2 numbering). We anticipated that in this enzyme the steric impediment for the binding of the trimethylammonium group of BAL does not occur because of the small size of the Cys side chain. To prove this, we constructed the A441C mutant and confirmed that this change did not affect the V_{\max} and had a slight negative effect on K_m (BAL), which was increased 1.7 times compared with the wild-type value (Table II; Fig. 3, D and E). These findings give additional support to our proposal of the critical importance of a small residue behind the indole group of the Trp residue for allowing BAL binding. The saturation kinetics with APAL, ABAL, and TMABAL were not affected in the A441C mutant, as was also expected.

DISCUSSION

The positive charge of the quaternary nitrogen of the trimethylammonium group of BAL suggests that negatively charged active-site residues should be involved in conferring substrate specificity to plant BADHs, by analogy with other enzymes that bind this group (Quaye et al., 2008). In a first study with SoBADH, Glu-103, which is strictly conserved in the known plant ALDH10 enzymes, was thought to be this residue; when mutated to Gln, however, there were no changes in the kinetics with BAL as substrate and only a small negative effect on those with APAL and ABAL (Incharoensakdi et al., 2000). The crystal structure of the spinach enzyme reported here explains these results: the side chain carboxylic group of Glu-103 is far

from the aldehyde tunnel (Supplemental Fig. S3). ALDH10 enzymes also have two conserved Asp residues (Asp-107 and Asp-110; SoBADH numbering) whose carboxyl groups are exposed, or partially exposed in the case of Asp-107, to the solvent filling the aldehyde tunnel. The energy-minimized model of the productively bound BAL indicates that these carboxyl groups are too far away from the trimethylammonium group to directly interact with it. While this paper was in preparation, Kopečný et al. (2011) reported marked decreases in the affinity for APAL and ABAL of PsAMADH2 mutants in which these two Asp residues were changed to Ala. Our energy-minimized models with these aminoaldehydes productively bound (data not shown) showed that Asp-107 and Asp-110 are more than 7.5 Å away from the amino group of ABAL and APAL. Since the carboxyl of Asp-110 is relatively close to that of Asp-107, and therefore may influence its position, and the carboxyl group of Asp-107 is at an appropriate distance from Tyr-160 to electrostatically interact with the aromatic ring, the observed negative effects of the mutations D107A and D110A in PsAMADH2 may be, at least in part, due to the loss of this latter interaction, which may be relevant for the correct positioning of the tyrosyl residue equivalent to Tyr-160, a residue that is critical for the binding of the aldehydes (see below).

On the other hand, the trimethylammonium group of choline or GB has been shown to bind to proteins mainly through cation- π interactions with aromatic residues (Schiefner et al., 2004; Horn et al., 2006). The crystal structure of SoBADH showed four aromatic residues, Tyr-160, Trp-167, Trp-285, and Trp-456, in an arrangement suitable for cation- π interactions with the trimethylammonium group of BAL (Fig. 2). The residue equivalent to Trp-167 was suspected to participate in binding BAL in the BADH from cod liver (Johansson et al., 1998), which is an ALDH9, not an ALDH10, enzyme (Vasilioiu et al., 1999), but this possibility was discarded on the basis that this residue is conserved in several other ALDHs that are not specific for BAL. The architecture of the BAL-binding site in SoBADH is similar to but not exactly the same as that of the GB-binding site in the GB transporter from *Bacillus subtilis* (Horn et al., 2006; PDB code 2B4L). While in the transporter, there are only three tryptophanyl residues forming a prism that perfectly accommodates and binds the trimethylammonium group in a fixed position, in SoBADH, there are four aromatic residues that could interact with the trimethylammonium group even if this group adopts different positions inside the active site. This allows a certain degree of flexibility in the binding of BAL that is needed for catalysis. The chemical mechanism of the ALDH-catalyzed reactions involves intermediates covalently attached to the catalytic Cys in which the trigonal carbonyl carbon of the aldehyde substrate changes to a tetrahedral carbon. First, the nucleophilic attack of the catalytic Cys on the carbonyl carbon results in the formation of a tetrahedral thiohemiacetal intermediate; second, the oxida-

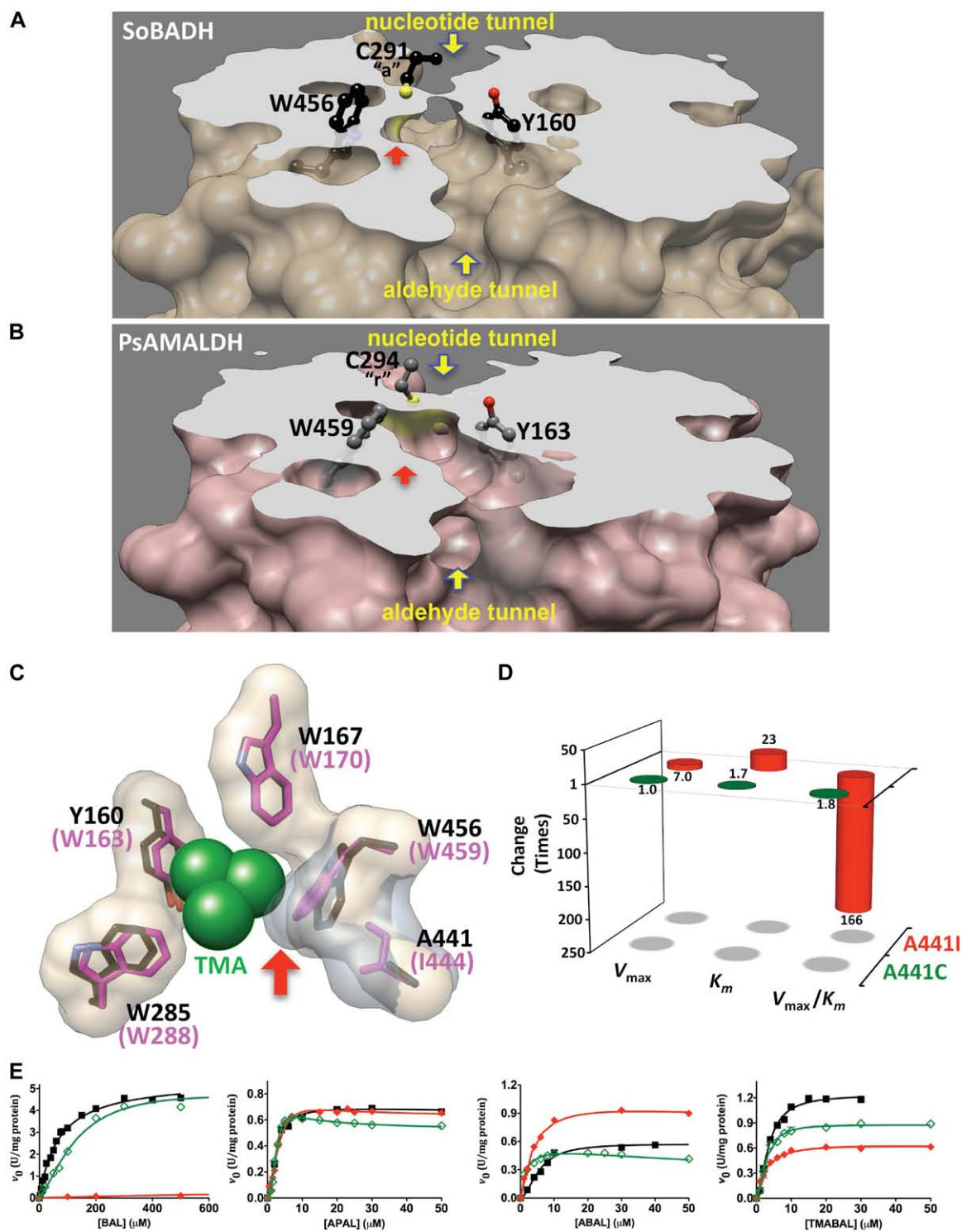


Figure 3. Structural determinants for BAL discrimination in ALDH10 enzymes. A to C, Comparison of the aldehyde-binding sites of SoBADH and PsAMADH2. A and B, Transverse sections of SoBADH and PsAMADH2 monomers (PDB codes 4A0M and 3IWI, respectively) showing the catalytic tunnel and the narrowing of the active-site region where the trimethylammonium group of BAL binds due to the different position of Trp-459 (PsAMADH2) compared with that of Trp-456 (SoBADH), as signaled by the red arrow. Also shown is the catalytic Cys, which is in the attacking (“a”) conformation in SoBADH and in the resting (“r”) conformation in PsAMADH2. Amino acid side chains are shown as sticks, with carbon atoms in black (SoBADH) or gray (PsAMADH), oxygen in red, nitrogen in blue, and sulfur in yellow. C, Molecular surface of the aromatic residues of SoBADH (beige molecular surface, black carbon atoms) and PsAMADH (gray molecular surface, pink carbon atoms) showing the steric

tion of this intermediate by the transfer of an hydride to NAD(P)⁺ forms a trigonal thioester intermediate; and then, the nucleophilic attack of the hydrolytic water molecule to the thioester forms a new tetrahedral intermediate that collapses into the trigonal acid product of the reaction. The oxygen atom remains in the oxyanion hole, but the rest of the molecule moves inside the active site as the geometry of the carbonyl carbon repeatedly changes (Muñoz-Clares et al., 2010). If the trimethylammonium group were bound in a fixed position, these movements would be hindered and catalysis negatively affected.

The kinetics of the SoBADH mutant enzymes in which the four aromatic residues were separately changed were consistent with the involvement of these residues in binding of the trimethylammonium group. Our results indicate that Tyr-160 is an important residue for binding the shortest ω -aminoaldehydes, BAL and APAL, particularly for BAL, but also for binding of ABAL and TMABAL, in spite of their amino group being farther from the aromatic ring. Interestingly, the K_m for propionaldehyde, which lacks the amino group, is increased 50 times in the SoBADH Y160A mutant (data not shown). The energy-minimized model constructed by us suggests that the carbonyl oxygen of the aldehyde when bound into the oxyanion hole is at van der Waals distance from the CE1 carbon of the phenol ring and in the same plane. In this position, the carbonyl oxygen can electrostatically interact with the positive pole of the aromatic ring quadrupole. In this way, Tyr-160 may be involved in the binding of any aldehyde. Most known ALDH sequences have a Tyr or a Phe in this position (Julián-Sánchez et al., 2007), supporting the relevance of the aromatic ring for binding of the aldehyde group and probably also for its correct positioning for the following catalytic steps.

Our kinetic results with the mutant enzymes indicate that the binding of BAL to SoBADH depends on the interactions with the four aromatic residues much more than does the binding of APAL, ABAL, and TMABAL (i.e. the structural requirements for BAL binding are stricter than those for binding of the other ω -aminoaldehydes). This is because the architecture and size of the active-site pocket where the bulky trimethylammonium group binds should allow for cation- π interactions with the four aromatic rings and, at the same time, should prevent steric clashes be-

tween the active-site residues and the trimethylammonium group. Comparison of the aldehyde-binding sites of SoBADH and PsAMADH2 confirms this. Although an almost identical arrangement of the four aromatic residues can be observed in both, there is a subtle but critical difference between the spinach and pea enzymes responsible for the low affinity for BAL of the latter one: the size of the pocket formed by the residues equivalent to Tyr-160 and Trp-456 (SoBADH numbering), where the trimethylammonium group of BAL binds (Fig. 3). The residue behind the indole group of the Trp, an Ile in the pea enzyme and an Ala in SoBADH, determines the size of this pocket. The bulkier Ile pushes the Trp against the Tyr, thus hindering the binding of BAL, as the kinetics of the SoBADH mutant A441I demonstrated. Our findings are consistent with the increase in BADH activity of the Y163A mutant of PsAMADH2 relative to the wild-type enzyme (Kopěčný et al., 2011). Sequence alignments show that plant ALDH10 enzymes have only one of three different residues in the position of Ala-441, an Ala, a Cys, or an Ile. On the basis of the structural and biochemical studies reported here, we propose that those ALDH10 enzymes that have an Ala or a Cys at the position equivalent to Ala-441 of SoBADH are high-BAL-affinity isoenzymes, which presumably are involved in the synthesis of GB, while those ALDH10 enzymes that have an Ile in this position are low-BAL-affinity isoenzymes, which are likely involved in any of the other physiological functions of the plant ALDH10 enzymes (Fig. 1). The biochemical characterization of the ALDH10 isoenzymes from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*), spinach, barley, rice (*Oryza sativa*), pea, maize (*Zea mays*), and Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) supports our proposal that those having Ala or Cys exhibit a high activity with BAL while those having Ile have a poor activity with this substrate (Supplemental Table S3). The exception is the Ile-containing isoenzyme from mangrove, which was reported to have a high affinity for BAL and to be unable to use APAL and ABAL as substrates (Hibino et al., 2001). Interestingly, all known ALDH10s that we propose as high-BAL-affinity isoenzymes contain a Trp in the position equivalent to Trp-285 of SoBADH, while several low-BAL-affinity isoenzymes have an Ala, Phe, Pro, or Ser instead. This is consistent with our results of the kinetics of the W285A mutant.

Figure 3. (Continued.)

clash (marked by a red arrow) in the latter enzyme with the trimethylammonium group (TMA), shown as green balls, of a modeled BAL molecule. In PsAMADH, Ile-444 pushes Trp-459 toward Tyr-163, while in SoBADH, Ala-441 allows Trp-456 to be more distant from Tyr-160, thus leaving enough room between these two residues for a trimethylammonium group to bind. Images were generated using the UCSF Chimera package from the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (Pettersen et al., 2004). D, Effects of mutation of residue Ala-441 to Ile or Cys on the kinetic parameters of SoBADH with BAL as variable substrate. Enzyme assays were carried out as described in "Materials and Methods," and the data were analyzed as described in Figure 2D. E, Saturation curves of wild-type SoBADH (black squares) and the mutants A441I (red diamonds) and A441C (green diamonds) with BAL, APAL, ABAL, and TMABAL as substrates. Enzyme assays were carried out and the data analyzed as described in Figure 2D.

Different ALDH10 genes have been reported to exist in the genomes of several plants (McCue and Hanson, 1992; Ishitani et al., 1995; Wood et al., 1996; Legaria et al., 1998; Hibino et al., 2001; Bradbury et al., 2005), and the complete sequencing of several plant genomes has confirmed this trend. Some of them were considered alleles, given their high similarity at the nucleotide and amino acid sequences (McCue and Hanson, 1992), but others may be true isoenzymes, not only because they might be located in different loci but mainly because they may perform different physiological functions (i.e. some may be involved in the synthesis of GB from BAL and others in oxidizing other ω -aminoaldehydes). To clarify this, we searched all available ALDH10 sequences in the nonredundant protein sequences database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using SoBADH as a query. After eliminating duplicates, we found that many species have two distinct ALDH10 sequences (Supplemental Table S3), which may correspond to two different isoenzymes. An examination of these sequences under the criterion of the residue occupying the position of Ala-441 in SoBADH indicated that some plants, such as amaranth, mangrove, barley, sorghum (*Sorghum bicolor*), *Leymus chinensis*, maize, and *Zoysia tenuifolia*, have the two kinds of isoenzymes: one with Ala or Cys in the position equivalent to Ala-441 of SoBADH and the other with Ile. Moreover, the known plant genomes have two ALDH10 genes that code for two isoenzymes; although there are other sequences deposited in the NCBI protein database, they are allelic variants or sequencing errors of these two. In some plants, such as maize, *Zoysia*, and sorghum, one of the two is the high-BAL-affinity isoenzyme and the other is the low-BAL-affinity isoenzyme. In other plant species whose genomes are known, such as *Arabidopsis*, *Arabidopsis lyrata*, soybean (*Glycine max*), rice, *Populus trichocarpa*, and potato (*Solanum tuberosum*), the two ALDH10 isoenzymes contain Ile and therefore are of the low-BAL-affinity kind. Phylogenetically, however, these two isoenzymes do not constitute two subfamilies within the ALDH10 family. It appears that they are the result of independent gene duplications that took place in different plant families.

Our phylogenetic analysis, described in "Materials and Methods," showed that plant ALDH10 sequences form a highly supported monophyletic clade, to the exclusion of bacterial ALDH10 and other plant ALDH sequences (bootstrap support for the monophyly of plant ALDH10, 100%; support for the monophyly of bacterial ALDH10, 99%; support for the monophyly of other plant ALDHs, 100%). Since these three groups of sequences formed well-supported separate clades, either the bacterial ALDH10s or the plant ALDHs can be used to root the plant ALDH10 clade, thus revealing its branching order, which was the same regardless of whether the rooting was done with the bacterial ALDH10s or the plant ALDHs, and a sequence of mutations from the hypothetical ancestral sequence

toward contemporary plant ALDH10s. The mapping of amino acid residues for the position corresponding to Ala-441 in SoBADH indicates that Ile is the more common and ancient residue and that Ala tends to show up in gene duplicates in which the sister gene, if available, bears an Ile, whereas there are duplicates in which both copies bear an Ile. Furthermore, the bacterial ALDH10 sequences bear an Ile in the discussed position. Taken together, these observations strongly suggest that the ancestral plant ALDH10 gene coded for an Ile at the position homologous to Ala-441 in SoBADH. A functional specialization seems to have occurred when, in one of the two copies of the gene, the Ile mutated into an Ala or a Cys (or in the case of *Vitis vinifera* and potato, into a Val).

It has been suggested that the main reason why some plants do not accumulate GB is the lack of a functional CMO or an inadequate supply of choline to the chloroplast (Nuccio et al., 1998). Our results indicate that the absence of the high-BAL-affinity ALDH10 isoenzyme may be a major limitation for GB biosynthesis in plants. This is supported by our finding that the plant species in which one of the two isoenzymes is a high-BAL-affinity enzyme according to our criterion of possessing Ala or Cys in the position of Ala-441 of SoBADH, as well as other plants in which there have been found so far only one isoenzyme with Ala in this position, such as spinach and sugar beet (*Beta vulgaris*), or with Cys, such as wheat (*Triticum aestivum*), have been reported as being GB accumulators, whereas those plants that only have low-BAL-affinity isoenzymes are reported as lacking the ability to accumulate GB (Supplemental Table S3). Moreover, a functional CMO has only been found in species of Amaranthaceae that have the high-BAL-affinity isoenzyme, such as amaranth (Russell et al., 1998; Meng et al., 2001), orache (*Atriplex hortensis*; Shen et al., 2002), spinach (Rathinasabapathi et al., 1997), and sugar beet (Russell et al., 1998), whereas a nonfunctional gene was found in rice (Luo et al., 2007) and the recombinant CMO protein from *Arabidopsis* has no activity (Hibino et al., 2002). There are other CMO sequences deposited in GenBank, but it is not yet known whether the CMO proteins in these plants are functional or not.

Although there are no experimental data concerning the subcellular locations of most of the ALDH10 enzymes, the presence of Ala or Cys in position 441 of SoBADH correlates with a chloroplastic location in some of them while the presence of an Ile correlates with a peroxisomal location in others, but this is not a general rule (Supplemental Table S3). Thus, in Amaranthaceae, the high-BAL-affinity isoenzymes lack the C-terminal tripeptide SKL that has been considered as a signal for transport into peroxisomes (Gould et al., 1988) and the chloroplastic location of the spinach enzyme has been experimentally determined (Weigel et al., 1986), consistent with CMO being also chloroplastic (Burnet et al., 1995). According to their C-terminal signal, the low-BAL-affinity isoenzymes, but not the high-BAL-affinity ones, from mangrove,

L. chinensis, and wheat are predicted to be peroxisomal isoenzymes, but both kinds of isoenzymes from *Zoysia*, sorghum, and maize have the peroxisomal signal. Interestingly, the high-BAL-affinity isoenzyme from barley, BBD2, was found to be cytosolic (Fujiwara et al., 2008) and the barley CMO peroxisomal (Mitsuya et al., 2011), suggesting that the subcellular location of GB synthesis in this plant is not chloroplastic but probably cytosolic. On the other hand, some low-BAL-affinity isoenzymes lack the peroxisomal signal. They may be located in leucoplasts, as was recently found for one of the two low-BAL-affinity isoenzymes from *Arabidopsis* (Missihoun et al., 2011). The rest of the low-BAL-affinity isoenzymes have an SKL or SKL-like C-terminal tripeptide. The peroxisomal location has been proved for the low-BAL-affinity isoenzymes from barley (Nakamura et al., 1997) and from the second *Arabidopsis* isoenzyme (Missihoun et al., 2011), both of which have the C-terminal SKL tripeptide.

CONCLUSION

The first crystal structure of a plant BADH, that from spinach, together with site-directed mutagenesis studies provide, to our knowledge for the first time, experimental evidence of the aromatic residues involved in binding of the trimethylammonium group of BAL in plant ALDH10 enzymes and, importantly, of the main structural feature determining whether they accept BAL as substrate: a non-active-site amino acid residue located in the second sphere of interaction of the aldehyde bound inside the active site. If this is a small residue, Ala or Cys, the enzyme will be a true BADH, whereas if this residue is an Ile, it pushes an active-site residue so that the cavity where the bulky trimethylammonium group of BAL binds is narrowed and the binding of BAL is prevented. Consequently, the activity with BAL will be low and the enzyme can be described as an AMADH. This conclusion is confirmed by the previously reported biochemical characterization of some of these enzymes. A survey of the known plant ALDH10 sequences indicates that the presence or absence of the high-BAL-affinity ALDH10 isoenzyme in plants correlates with them being a GB accumulator or a non GB accumulator, respectively. Therefore, the lack of the high-BAL-affinity ALDH10 isoenzyme appears to be a major limitation for GB biosynthesis in plants.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Biochemicals

BAL chloride, the diethylacetals of APAL and ABAL, and NAD⁺ were obtained from Sigma-Aldrich. The diethylacetal of TMABAL was synthesized following the described method (Vaz et al., 2000). APAL, ABAL, and TMABAL were prepared freshly, hydrolyzing the corresponding diethylacetal forms following the method described by Flores and Filner (1985). The exact concentration of the resulting free aldehydes was determined in each exper-

iment by determining the amount of NADH produced after their complete oxidation in the reaction catalyzed by SoBADH in the presence of an excess of NAD⁺.

Construction of the Expression Plasmid

The cDNA for SoBADH, a kind gift from Dr. Andrew D. Hanson, was the template to obtain the His-tagged enzyme by PCR, using the forward primer 5'-AGCATATGGCGTTCCAATTCC-3', which contains the starting codon and an *NdeI* restriction site, and the reverse primer 5'-CTCGAGAGGAGACTTG-TACC-3', which corresponds to the 3' end of the gene and contains the restriction site *XhoI*. The amplified DNA fragments were ligated into the pGEM-T Easy vector (Promega) and selected on Luria-Bertani agar plates. Plasmids were purified and digested with *NdeI* and *XhoI* restriction enzymes, and the fragment corresponding to the spinach (*Spinacia oleracea*) *badh* gene was purified and ligated into the corresponding sites of the pET28b⁺ vector (Invitrogen). The resulting plasmid, pET28-SoBADH, was used for the expression of full-length, N-terminal, His-tagged SoBADH.

For the expression of the recombinant proteins, cells of *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Agilent) were grown at 37°C in 400 mL of Luria-Bertani broth, added with 50 mg mL⁻¹ kanamycin, until the optical density at 600 nm reached 0.6. At this point, protein expression was induced by the addition of 0.1 mM isopropyl thio-β-D-galactoside. The cells were allowed to grow for 4 h and harvested by centrifugation at 3,800g for 10 min. The pellet was suspended in 10 mL of 50 mM HEPES-KOH buffer, pH 7.5, containing 10 mM 2-mercaptoethanol and 10% (v/v) glycerol (buffer A) and sonicated for 20 min. Cell debris was removed by centrifugation at 15,000 rpm for 20 min, and the supernatant was applied to a Q-Sepharose Fast Flow column (GE Healthcare) equilibrated with buffer A. The column was washed with 10 volumes of the same buffer, and the enzyme was eluted with 300 mL of a linear KCl gradient from 0 to 350 mM in buffer A. His-tagged enzymes were applied into a column packed with Protino Ni-(tris(carboxymethyl)ethylene diamine) resin (Macherey-Nagel) equilibrated with 50 mM HEPES-KOH buffer, pH 6.5, containing 10% (v/v) glycerol and 10 mM imidazole (buffer B). The column was washed with the same buffer, and the enzymes were eluted by applying a linear gradient of imidazole from 10 to 250 mM in buffer B. Imidazole excess was removed by centrifugal concentration using Amicon Ultra 30 (Millipore), while buffer B was replaced by buffer A. To get rid of small contaminants, in the crystallization experiments a final step of purification through a Mono Q HR5 column (GE Healthcare) connected to a HPLC system (Waters) was included.

Site-Directed Mutagenesis

The plasmid pET28-SoBADH, containing the full sequence of the spinach *badh* gene and an N-terminal His tag, was used as a template for site-directed mutagenesis, which was performed via PCR using the Quick Change XL-II Site Directed Mutagenesis system (Agilent) and the following mutagenic primers: Y160A, 5'-GATTAATATCCCCATGGAATGCCCACTTCTAATG-GCTAC-3' (forward) and 5'-AGCCATTAGAAGTGGGGCATTCCATGGG-GATATTAATCC-3' (reverse); W167A, 5'-CCACTTCTAATGGCTACAGCG-AAAATTGCTCCAGCACTTGC-3' (forward) and 5'-AAGTGCTGGAGCA-ATTTCCGTGTAGCCATTAGAAGTGGG-3' (reverse); W285A, 5'-ACTA-TTTTGGCTGTTTCGCGACAAATGGTCAAATATGTAGTGC-3' (forward) and 5'-ACATATTTGACCATTGTGTCGGGAAACAGCCAAAATAGTCC-3' (reverse); W456A, 5'-TTTGTTCAAGCTCCTGCGGGAGGCATCAAGCG-TAGTGG-3' (forward) and 5'-CTACGCTTGATGCTCCCGCAGGAGCTTG-AACAAAGCATG-3' (reverse); A441I, 5'-GAAGGCTCTAGAAGTTGGA-ATTGTTTGGGTTAATTGCTCAC-3' (forward) and 5'-TTGTGAGCAATTA-ACCCAAACAATTCCAACCTTCTAGAGCC-3' (reverse); A441C, 5'-GAA-GGCTCTAGAAGTTGATGTGTTTGGGTTAATTGCTCAC-3' (forward) and 5'-TTGTGAGCAATTAACCCAAACACATCCAACCTTCTAGAGCC-3' (reverse). The underlined portion of the oligonucleotides is the noncomplementary mutagenic region. Mutagenesis was confirmed by DNA sequencing. The level of production of functional recombinant protein in *E. coli* was similar for the wild-type SoBADH and its mutants.

Activity Assay and Kinetic Characterization of the Wild-Type and Mutant SoBADH Enzymes

The specific dehydrogenase activities of wild-type SoBADH and its mutants were measured spectrophotometrically at 30°C by monitoring the increase in A₃₄₀ ($\epsilon = 6,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in a mixture (0.5 mL) consisting of 50

mM HEPES-KOH buffer, pH 8.0, 1 mM EDTA, and 0.2 mM NAD⁺ and variable concentrations of the aldehydes or saturating concentrations of the aldehydes and variable NAD⁺. The exact concentration of the aldehydes was determined by end-point assays using SoBADH and the standard assay conditions described below, and the exact concentration of NAD⁺ was determined by its A_{260} using a molar absorptivity of 18,000 M⁻¹ cm⁻¹ (Dawson et al., 1986). All assays were initiated by addition of the enzyme. Each saturation curve was determined at least in duplicate using enzymes from different purification batches. One unit of activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μ mol of NADPH per minute under our assay conditions.

Kinetic data were analyzed by nonlinear regression calculations using a Michaelis-Menten equation that includes terms in the numerator and denominator to account for partial substrate inhibition:

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

where v is the experimentally determined initial velocity, V_{\max} is the maximal velocity, $[S]$ is the concentration of the variable substrate, K_m is the concentration of substrate at half-maximal velocity, K_{IS} is the substrate inhibition constant, and β is the factor that describes the effect of substrate inhibition on V_{\max} . For the estimation of V_{\max}/K_m values and their associated SE, a modified form of Equation 1 was used:

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

where K_A is V_{\max}/K_m . In those cases where no substrate inhibition was observed within the substrate concentration range used in the experiment, the data were fitted to the Michaelis-Menten equation.

Two estimated values for a given kinetic parameter determined for the wild-type enzyme and a mutant enzyme, or for two different amino aldehyde substrates, were considered significantly different at 99% confidence levels when the estimated values had confidence intervals that did not overlap. Confidence intervals were computed by multiplying the SE of the estimated value by a factor that depends on the confidence level chosen and on the number of degrees of freedom, which equals the number of data points minus the number of parameters that were fit.

Protein concentrations were determined spectrophotometrically using the molar absorptivity at 280 nm deduced from the amino acid sequence by the method of Gill and von Hippel (1989): 43,200 M⁻¹ cm⁻¹ for the wild-type and A441I and A441C enzymes; 40,450 M⁻¹ cm⁻¹ for the single Trp mutant enzymes (W167A, W285A, and W456A); and 42,455 M⁻¹ cm⁻¹ for the Y160A mutant enzyme.

Crystallization, Structure Solution, and Refinement

Crystals of wild-type SoBADH were obtained by the hanging-drop technique under anaerobic conditions. Prior to crystallization, wild-type SoBADH at a concentration of 20 mg mL⁻¹ was incubated with 2 mM NAD⁺ for 15 min at room temperature. Subsequently, 2 μ L of protein solution was mixed with 2 μ L of reservoir solution, which contained 85 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.17 M sodium acetate trihydrate, 25.5% (w/v) polyethylene glycol 4000, and 15% (v/v) glycerol (solution 22 of the crystal screen Cryo of Hampton Research). Bar-shaped crystals appeared at 18°C after 48 h and grew to their final dimensions within 1 week. The crystals were cooled under a nitrogen stream at 100 K during data collection. Synchrotron data were collected at the National Synchrotron Light Source on beamline X6a. The data were indexed with Mosflm (Leslie, 1992), integrated using XDS (Kabsch, 2010), and scaled and truncated with programs from the CCP4 suite (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).

Before phases were obtained, SoBADH diffraction data analysis suggests a triclinic symmetry, which was probed after phases were determined with molecular replacement. A clear solution for the molecular replacement was obtained with the program Phaser (McCoy et al., 2007) using the coordinates of the BADH from *Staphylococcus aureus* (SaBADH; PDB code 3ED6) as a starting model. Two dimers were found in the asymmetric unit; however, the low data-parameters ratio, because of the resolution of the diffraction, compromises a free refinement of all the components in the asymmetric unit. To avoid an overrefinement, noncrystallographic symmetries (NCS) were applied, starting with constrained NCS, moving to tight restrained NCS and loose restrained NCS, and finishing the refinement releasing the NCS. Once the NCS were retired, alternating cycles of automatic and manual refinement were carried out with the standard protocols of Phenix (Adams et al., 2002) monitoring the R_{work} and R_{free} split during the whole process. The program Coot (Emsley and Cowtan, 2004) was used to analyze the electron

density. Water molecules were automatically localized using Phenix (Adams et al., 2002) and Coot. Structural alignments were performed with Coot and PyMOL (DeLano, 2002).

Docking and Surface Electrostatic Potential Calculations

Aldehyde molecules were rigidly docked into the active site of the SoBADH and PsAMADH2 three-dimensional structure, so that the carbonyl oxygen makes the known interactions inside the oxyanion hole, using the PyMOL building mode and then energy minimized using the GROMOS 96 force field potential (van Gunsteren et al., 1996) of the Swiss PDB Viewer software (Guex and Peitsch, 1997). The convergence criterion was a value of 0.05 kJ mol⁻¹ for the averaged derivative. The trimethylammonium group of BAL was nonrigidly docked into the SoBADH after removing NAD⁺ and glycerol molecules from the crystallographic structure using the PatchDock server (Schneidman-Duhovny et al., 2005) and then further refined with FireDock (Mashiach et al., 2008). The solution with the highest geometric shape complementarity score was used.

Surface electrostatics calculations of SoBADH were carried out with the Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (Baker et al., 2001) using the PDB 2PQR Web portal (<http://kryptonite.nbc.net/pdb2pqr/>). The PQR (for per-atom charge and radius) file was generated using the PARSE force field. The PROPKA program (Li et al., 2005) was used to assign the protonation state of SoBADH at pH 7.5. The rendered electrostatic potential was visualized using the plug-in Adaptive Poisson-Boltzmann Solver of the PyMOL software (DeLano, 2002).

Retrieval and Phylogenetic Analysis of ALDH10 Orthologs

To obtain a phylogenetically wide sampling of ALDH10 orthologs from plants, we performed a BLASTP search in the nonredundant protein sequences database of the NCBI using the amino acid sequence of SoBADH as query. The maximum number of target sequences was set at 100, and in order not to exclude any candidate plant ALDH10, the expected threshold was set at 10; the scoring matrix used was BLOSUM62, with gap-opening and gap-extension costs of 11 and 1, respectively. All sequences retrieved belong to either Viridiplantae or Eubacteria. In order to determine whether different hits coming from a given species correspond to different isoenzymes, we performed a series of BLASTP searches on the protein databases of the following completely sequenced and annotated species, maize (*Zea mays*), rice (*Oryza sativa japonica*), and potato (*Solanum tuberosum*), with the same parameters as indicated previously. Only hits with an E-value higher than 10e-3 were excluded. The resulting sequences were added to the first set and aligned using MAFFT (Katoh et al., 2002). A maximum likelihood phylogeny was constructed using RAxML (Stamatakis, 2006) on the CIPRES Web portal (Miller et al., 2010) under the JTT+G substitution model. The resulting tree was rooted at the bacterial sequences, showing a clade containing all the plant ALDH10 isoenzymes and a second clade including other plant ALDHs. This phylogeny was used as a guide, and the following criteria were applied to exclude sequences that could represent allelic variants or sequencing errors: (1) all sequences with associated activity information were kept; (2) when chromosome-mapping information was available, a representative of every locus was kept; and (3) for sequences that were 99% identical or that differed only by single position mutations, only one representative was kept.

The coordinates and the structure factors for the structure of SoBADH in complex with NAD⁺ have been deposited in the Protein Data Bank (www.rcsb.org) with the accession code 4A0M.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure S1. Fold and secondary structure elements of the dimeric SoBADH.

Supplemental Figure S2. Topology diagram of the SoBADH subunit.

Supplemental Figure S3. Section of a SoBADH monomer showing the aldehyde tunnel and the positions of Glu-103, Asp-107, and Asp-110.

Supplemental Table S1. Data collection and refinement statistics for the SoBADH crystal.

Supplemental Table S2. Kinetic parameters of wild-type and mutant SoBADH enzymes using NAD⁺ as a variable substrate.

Supplemental Table S3. Plant isoenzymes of the ALDH10 family.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Andrew D. Hanson (University of Florida, Gainesville) for providing the spinach BADH cDNA and Patricia Demare and Dr. Ignacio Regla (Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México) for the synthesis of TMABAL. We acknowledge the use of the X6a beamline of the National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory.

Received January 26, 2012; accepted February 14, 2012; published February 16, 2012.

LITERATURE CITED

- Adams PD, Grosse-Kunstleve RW, Hung LW, Ioerger TR, McCoy AJ, Moriarty NW, Read RJ, Sacchettini JC, Sauter NK, Terwilliger TC (2002) PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 1948–1954
- Arakawa K, Takabe T, Sugiyama T, Akazawa T (1987) Purification of betaine-aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. *J Biochem* **101**: 1485–1488
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 10037–10041
- Bouché N, Fromm H (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci* **9**: 110–115
- Bradbury LMT, Fitzgerald TL, Henry RJ, Jin Q, Waters DLE (2005) The gene for fragrance in rice. *Plant Biotechnol J* **3**: 363–370
- Bradbury LMT, Gillies SA, Brushett DJ, Waters DLE, Henry RJ (2008) Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. *Plant Mol Biol* **68**: 439–449
- Brauner F, Šebela M, Snegaroff J, Peč P, Meunier J-C (2003) Pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase: primary structure and active site residues. *Plant Physiol Biochem* **41**: 1–10
- Burnet M, Lafontaine PJ, Hanson AD (1995) Assay, purification, and partial characterization of choline monoxygenase from spinach. *Plant Physiol* **108**: 581–588
- Collaborative Computational Project Number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**: 760–763
- Courtenay ES, Capp MW, Anderson CF, Record MT Jr (2000) Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants *in vivo* and for the interpretation of “osmotic stress” experiments *in vitro*. *Biochemistry* **39**: 4455–4471
- Dawson RM, Elliot DC, Elliot WH, Jones KM (1986) *Data for Biochemical Research*, Ed 3. Oxford University Press, New York
- DeLano WL (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, Palo Alto, CA
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 2126–2132
- Fitzgerald TL, Waters DLE, Henry RJ (2009) Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. *Plant Biol (Stuttg)* **11**: 119–130
- Flores HE, Filner P (1985) Polyamine catabolism in higher plants: characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Regul* **3**: 277–291
- Fujiwara T, Hori K, Ozaki K, Yokota Y, Mitsuya S, Ichiyanagi T, Hattori T, Takabe T (2008) Enzymatic characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases in barley. *Physiol Plant* **134**: 22–30
- Gill SC, von Hippel PH (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**: 319–326
- González-Segura L, Rudiño-Piñera E, Muñoz-Clares RA, Horjales E (2009) The crystal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* provides new insight into the reaction mechanism and shows a novel binding mode of the 2'-phosphate of NADP⁺ and a novel cation binding site. *J Mol Biol* **385**: 542–557
- Gould SJ, Keller GA, Subramani S (1988) Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J Cell Biol* **107**: 897–905
- Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714–2723
- Hanson AD, May AM, Grumet R, Bode J, Jamieson GC, Rhodes D (1985) Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 3678–3682
- Hanson AD, Wyse R (1982) Biosynthesis, translocation, and accumulation of betaine in sugar beet and its progenitors in relation to salinity. *Plant Physiol* **70**: 1191–1198
- Heineke D, Riens B, Grosse H, Hoferichter P, Peter U, Flüge UI, Heldt HW (1991) Redox transfer across the inner chloroplast envelope membrane. *Plant Physiol* **95**: 1131–1137
- Hibino T, Meng YL, Kawamitsu Y, Uehara N, Matsuda N, Tanaka Y, Ishikawa H, Baba S, Takabe T, Wada K, et al (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
- Hibino T, Waditee R, Araki E, Ishikawa H, Aoki K, Tanaka Y, Takabe T (2002) Functional characterization of choline monoxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants. *J Biol Chem* **277**: 41352–41360
- Horn C, Sohn-Bösser L, Breed J, Welte W, Schmitt L, Bremer E (2006) Molecular determinants for substrate specificity of the ligand-binding protein OpuAC from *Bacillus subtilis* for the compatible solutes glycine betaine and proline betaine. *J Mol Biol* **357**: 592–606
- Incharoensakdi A, Matsuda N, Hibino T, Meng Y-L, Ishikawa H, Hara A, Funaguma T, Takabe T, 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
- Ishitani M, Nakamura T, Han SY, Takabe T (1995) Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol* **27**: 307–315
- Johansson K, El-Ahmad M, Ramaswamy S, Hjelmqvist L, Jörnvall H, Eklund H (1998) Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci* **7**: 2106–2117
- Julián-Sánchez A, Rivero-Rosas H, Martínez-Castilla LP, Velasco-García R, Muñoz-Clares RA (2007) Phylogenetic and structural relationships of the betaine aldehyde dehydrogenase. *In* H Weiner, B Plapp, R Lindahl, E Maser, eds, *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, Vol 13. Purdue University Press, West Lafayette, IN, pp 64–76
- Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 125–132
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**: 3059–3066
- Kopečný D, Tylíčková M, Snegaroff J, Popelková H, Šebela M (2011) Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of ω -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. *FEBS J* **278**: 3130–3139
- Legaria J, Rajsbaum R, Muñoz-Clares RA, Villegas-Sepúlveda N, Simpson J, Iturriaga G (1998) Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth: expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid. *Gene* **218**: 69–76
- Leslie AGW (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *In* Joint CCP4 and EACMB Newsletter Protein Crystallography 26. Daresbury Laboratory, Warrington, UK, pp 22–33
- Li H, Robertson AD, Jensen JH (2005) Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK_a values. *Proteins* **61**: 704–721
- Livingstone JR, Maruo T, Yoshida I, Tarui Y, Hirooka K, Yamamoto Y, Tsutui N, Hirasawa E (2003) Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*. *J Plant Res* **116**: 133–140
- Luo D, Niu X, Wang Y, Zheng W, Chang L, Wang Q, Wei X, Yu G, Lu B-R, Liu Y (2007) Functional defect at the rice choline monoxygenase locus from an unusual post-transcriptional processing is associated with the sequence elements of short-direct repeats. *New Phytol* **175**: 439–447
- Mashiach E, Schneidman-Duhovny D, Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ (2008) FireDock: a Web server for fast interaction refinement in molecular docking. *Nucleic Acids Res* **36**: W229–W232

- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Cryst* **40**: 658–674
- McCue KF, Hanson AD (1992) Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Mol Biol* **18**: 1–11
- McNeil SD, Nuccio ML, Hanson AD (1999) Betaines and related osmoprotectants: targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol* **120**: 945–950
- Meng YL, Wang YM, Zhang B, Nii N (2001) Isolation of a choline monooxygenase cDNA clone from *Amaranthus tricolor* and its expressions under stress conditions. *Cell Res* **11**: 187–193
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop. Institute of Electrical and Electronics Engineers, Inc., Piscataway, NY, pp 1–8
- Missihoun TD, Schmitz J, Klug R, Kirch H-H, Bartels D (2011) Betaine aldehyde dehydrogenase genes from *Arabidopsis* with different sub-cellular localization affect stress responses. *Planta* **233**: 369–382
- Mitsuya S, Kuwahara J, Ozaki K, Saeki E, Fujiwara T, Takabe T (2011) Isolation and characterization of a novel peroxisomal choline monooxygenase in barley. *Planta* **234**: 1215–1226
- Muñoz-Clares RA, Díaz-Sánchez AG, González-Segura L, Montiel C (2010) Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: mechanistic and regulatory implications. *Arch Biochem Biophys* **493**: 71–81
- Nakamura T, Nomura M, Mori H, Jagendorf AT, Ueda A, Takabe T (2001) An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol* **42**: 1088–1092
- Nakamura T, Yokota S, Muramoto Y, Tsutsui K, Oguri Y, Fukui K, Takabe T (1997) Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant J* **11**: 1115–1120
- Nuccio ML, Russell BL, Nolte KD, Rathinasabapathi B, Gage DA, Hanson AD (1998) The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant J* **16**: 487–496
- Oishi H, Ebina M (2005) Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *J Plant Physiol* **162**: 1077–1086
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**: 1605–1612
- Quaye O, Lountos GT, Fan F, Orville AM, Gadda G (2008) Role of Glu312 in binding and positioning of the substrate for the hydride transfer reaction in choline oxidase. *Biochemistry* **47**: 243–256
- Rathinasabapathi B, Burnet M, Russell BL, Gage DA, Liao P-C, Nye GJ, Scott P, Golbeck JH, Hanson AD (1997) Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3454–3458
- Rathinasabapathi B, Sigua C, Ho J, Douglas AG (2000) Osmoprotectant β -alanine betaine synthesis in the Plumbaginaceae: S-adenosyl-L-methionine dependent N-methylation of β -alanine to its betaine is via N-methyl and N,N-dimethyl β -alanines. *Physiol Plant* **109**: 225–231
- Rontein D, Basset G, Hanson AD (2002) Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metab Eng* **4**: 49–56
- Russell BL, Rathinasabapathi B, Hanson AD (1998) Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. *Plant Physiol* **116**: 859–865
- Schiefner A, Breed J, Bösser L, Kneip S, Gade J, Holtmann G, Diederichs K, Welte W, Bremer E (2004) Cation- π interactions as determinants for binding of the compatible solutes glycine betaine and proline betaine by the periplasmic ligand-binding protein ProX from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**: 5588–5596
- Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ (2005) PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res* **33**: 363–367
- Šebela M, Brauner F, Radová A, Jacobsen S, Havliš J, Galuszka P, Peč P (2000) Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **1480**: 329–341
- Shen Y-G, Du B-X, Zhang W-K, Zhang J-S, Chen S-Y (2002) AhCMO, regulated by stresses in *Atriplex hortensis*, can improve drought tolerance in transgenic tobacco. *Theor Appl Genet* **105**: 815–821
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPc: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688–2690
- Trossat C, Rathinasabapathi B, Hanson AD (1997) Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde and ω -aminoaldehydes. *Plant Physiol* **113**: 1457–1461
- Tylichová M, Kopečný D, Moréra S, Briozzo P, Lenobel R, Snégaroff J, Šebela M (2010) 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, Muñoz-Clares RA (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
- van Gunsteren WF, Billeter SR, Eising AA, Hünenberger PH, Krüger P, Mark AE, Scott WRP, Tironi IG (1996) Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide. Verlag der Fachvereine, Zurich
- Vasilioiu V, Bairoch A, Tipton KE, Nebert DW (1999) Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* **9**: 421–434
- Vaz FM, Fouchier SW, Ofman R, Sommer M, Wanders RJA (2000) Molecular and biochemical characterization of rat γ -trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *J Biol Chem* **275**: 7390–7394
- Vojtechová M, Hanson AD, Muñoz-Clares RA (1997) Betaine-aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD-dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde to dimethylsulfoniopropionate. *Arch Biochem Biophys* **337**: 81–88
- Waditee R, Bhuiyan NH, Hirata E, Hibino T, Tanaka Y, Shikata M, Takabe T (2007) Metabolic engineering for betaine accumulation in microbes and plants. *J Biol Chem* **282**: 34185–34193
- Weigel P, Weretilnyk EA, Hanson AD (1986) Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiol* **82**: 753–759
- Werdan K, Heldt HW (1972) Accumulation of bicarbonate in intact chloroplasts following a pH gradient. *Biochim Biophys Acta* **283**: 430–441
- Weretilnyk EA, Bednarek S, McCue KE, Rhodes D, Hanson AD (1989) Comparative biochemical and immunological studies of the glycine betaine synthesis pathway in diverse families of dicotyledons. *Planta* **178**: 342–352
- Weretilnyk EA, Hanson AD (1989) Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, in vitro translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Arch Biochem Biophys* **271**: 56–63
- Wood AJ, Saneoka H, Rhodes D, Joly RJ, Goldsbrough PB (1996) Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. *Plant Physiol* **110**: 1301–1308
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214–1222

Amino Acid Residues Critical for the Specificity for Betaine Aldehyde of Plant ALDH10 Enzymes Involved in the Response to Osmotic Stress¹

Ángel G. Díaz-Sánchez², Lilian González-Segura², Carlos Mújica-Jiménez, Enrique Rudiño-Piñera, Carmina Montiel³, León Martínez-Castilla, and Rosario A. Muñoz-Clares^{*}

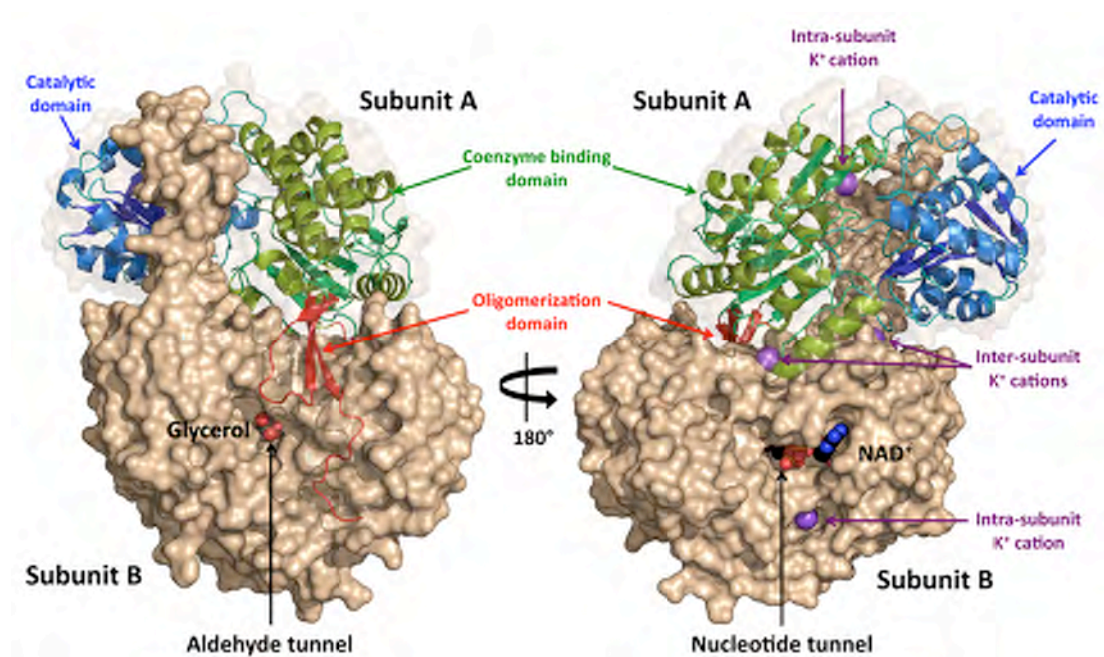
Departamento de Bioquímica (A.G.D.-S., L.G.-S., C.M.-J., L.M.-C., R.A.M.-C.), Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México D.F., México; Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos (E. R.-P.), Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62250, México.

² These authors contributed equally to the article.

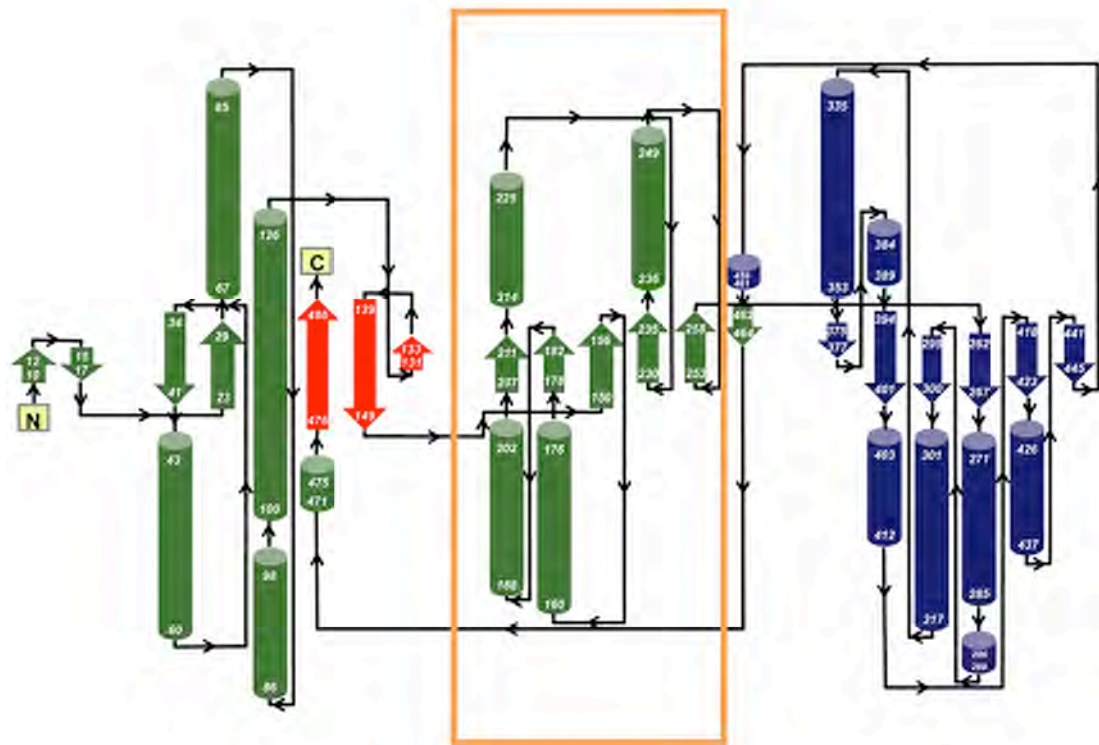
³ Present address: Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D. F., México.

^{*} Corresponding author; e-mail clares@unam.mx

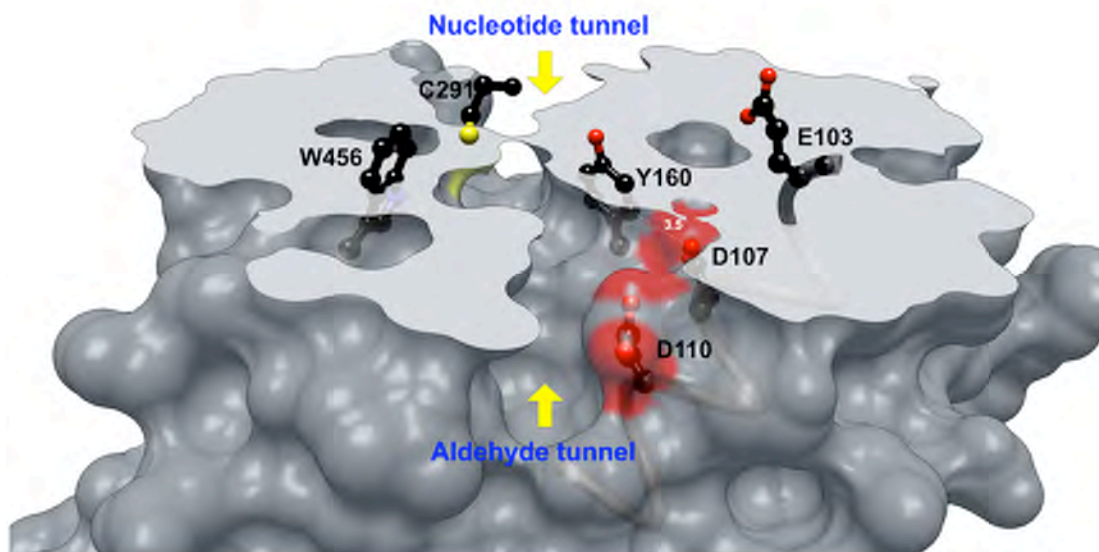
SUPPLEMENTAL FIGURES



Supplemental Figure S1. Fold and secondary structure elements of the dimeric SoBADH. The two views of the molecule, resulting from a rotation of 180°, show the aldehyde or nucleotide tunnel entrances, which are in the opposite face of each monomer. In the aldehyde section of the aldehyde tunnel there is a glycerol molecule, whereas the NAD⁺ molecule occupies its normal position in the nucleotide-binding site. Subunits are depicted as surface representation in light brown. Subunit A shows the secondary structure elements as cartoons with the coenzyme binding domain in two shades of green, the catalytic domain in two shades of blue, and the oligomerization domain in red. The K⁺ ions found in the intra-subunit and inter-subunit monovalent-cation-binding sites are shown as purple balls. The glycerol and NAD⁺ molecules are represented as spheres using atom-code colors (carbon black, oxygen red, and nitrogen blue). The figure was generated with PyMOL (<http://www.pymol.org/>).



Supplemental Figure S2. Topology diagram of the SoBADH subunit. Domains are shown using the same color code as in Supplemental Fig. S1. The Rossman-type fold is enclosed in an orange rectangle. The figure was prepared using PDBsum (Laskowski RA, Chistyakov VV, Thornton JM (2005) PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **33**: D266-D268).



Supplemental Figure S3. Section of a SoBADH monomer showing the aldehyde tunnel and the position of Glu-103, Asp-107, and Asp-110. The side-chain of Glu-103 is far from the tunnel. The side-chain of Asp-107 is at 3.5 Å from Tyr-160, as indicated by the dashed line. Amino acid side-chains are shown as balls and sticks with carbon atoms in black, oxygen in red, nitrogen in blue, and sulfur in yellow. Image was generated using the UCSF Chimera package from the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, CA (Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Comput Chem* **13**: 1605-1612).

SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table S1. *Data collection and refinement statistics for the SoBADH crystal*

| Enzyme | SoBADH-NAD ⁺ |
|---|-------------------------|
| <u>Data collection^a</u> | |
| Space group | P1 |
| Unit cell dimensions | |
| <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å) | 69.4, 80.9, 85.5 |
| α , β , γ (°) | 79.1, 84.9, 77.9 |
| Wavelength | 0.9795 |
| Asymmetric unit | two dimers |
| Resolution range (Å) | 30.0-2.3 (2.4-2.3) |
| <i>R</i> _{merge} (%) | 4.1 (38.6) |
| <i>I</i> / σ (<i>I</i>) | 10.8 (2.2) |
| Completeness (%) | 93.2 (81.1) |
| Redundancy | 2.3 (2.2) |
| Unique reflections | 76,619 (2,428) |
| <u>Refinement</u> | |
| Resolution range (Å) | 30.0 – 2.3 |
| <i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) | 21.3/24.6 |
| Number of atoms | |
| Protein | 15,382 |
| Ligand (NAD ⁺ /K ⁺) | 176/8 |
| Water | 524 |
| Glycerol | 42 |
| Average <i>B</i> -values (Å ²) | |
| Protein atoms | 55.5 |
| Water atoms | 47.7 |
| Ligand atoms | 51.7 |
| Root mean square deviation from ideal stereochemistry | |
| Bond lengths (Å) | 0.012 |
| Bond angles (°) | 1.35 |
| Ramachandran plot | |
| Favored (%) | 91.8 |
| Additional allowed (%) | 5.6 |
| Disallowed (%) | 2.6 |

^aThe values within parentheses correspond to the highest resolution shell.

Supplemental Table S2. *Kinetic parameters of wild-type (WT) and mutant SoBADH enzymes using NAD⁺ as variable substrate*

Initial velocities were obtained at 30 °C in 50 mM HEPES-KOH buffer, pH 8.0, containing 1 mM EDTA. Betaine aldehyde (BAL) was kept fixed at the given concentrations (mM), which are at least 4-times the K_m (BAL) value for each enzyme. The kinetic parameters were estimated by non-linear regression of the experimental data to the Hill equation. S.E values were around 10 % of the estimated kinetic parameters. V_{max} and K_m values are expressed as U/mg protein and μ M, respectively.

| ENZYMES | WT | Y160A | W285A | W167A | W456A | A441I | A441C |
|--------------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| [BAL] | 0.5 | 20 | 4 | 2 | 1 | 5 | 0.5 |
| V_{max} | 3.9 | 2.0 | 1.8 | 1.0 | 2.0 | 0.4 | 2.0 |
| K_m | 32 | 12 | 9 | 55 | 47 | 3 | 7 |
| <i>Hill number</i> | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.8 | 2.1 | 1.0 | 1.0 |

Supplemental Table S3. Plant isoenzymes of the ALDH10 family

| Plant family | Plant species | Accession number | Chromosome mapping | Position441 | BAL affinity | Peroxisomal signal | GB-accumulator |
|----------------------|---------------------------------|---------------------|--------------------|-------------|-------------------|--------------------|------------------|
| DICOTS | | | | | | | |
| Amaranthaceae | <i>Amaranthus</i> | GI2811031 | — | A | High ^a | No | — |
| | <i>hypochondriacus</i> | GI2388710 | — | I | — | No | Yes ^a |
| | <i>Atriplex centralasiatica</i> | GI21655215 | — | A | — | No | Yes ^j |
| | <i>A. hortensis</i> | GI104303705 | — | A | — | No | Yes ^k |
| | <i>A. micrantha</i> | GI124264139 | — | A | — | No | — |
| | <i>A. prostrata</i> | GI20135572 | — | A | — | No | Yes ^l |
| | <i>A. tatarica</i> | GI146289946 | — | A | — | No | Yes ^m |
| | <i>Beta vulgaris</i> | GI118490 | — | A | — | No | Yes ⁿ |
| | <i>Halostachys caspica</i> | GI134034500 | — | A | — | No | Yes ^o |
| | <i>Haloxylon ammodendron</i> | GI247421572 | — | A | — | No | — |
| | <i>Spinacia oleracea</i> | GI1813538 | — | A | High ^b | No | Yes ^p |
| | <i>Suaeda liaotungensis</i> | GI17026368 | — | A | — | No | Yes ^q |
| | <i>Kalidium foliatum</i> | GI115353973 | — | I | — | No | Yes ^o |
| Acanthaceae | <i>Avicennia marina</i> | GI11414908 | — | A | High ^c | No | Yes ^r |
| | | GI11414910 | — | I | High ^c | SKL | — |
| Aizoaceae | <i>Sesuvium portulacastrum</i> | GI341868781 | — | I | — | No | — |
| Solanaceae | <i>Lycium barbarum</i> | GI237506885 | — | I | — | No | No ^p |
| | <i>Solanum lycopersicum</i> | GI113205159 | — | I | — | No | No ^s |
| | <i>Solanum tuberosum</i> | PGSC000DMT400063205 | Chromosome III | V | — | SKL | No ^s |
| | | PGSC000DMT400083025 | Chromosome VI | I | — | SRN | — |
| Asteraceae | <i>Chrysanthemum</i> | GI63145792 | — | I | — | No | — |
| | <i>lavandulifolium</i> | GI63145794 | — | I | — | No | — |
| | <i>Helianthus annuus</i> | GI256260278 | — | I | — | SKL | No ^p |
| Betulaceae | <i>Corylus heterophylla</i> | GI321272538 | — | I | — | No | — |
| Araliaceae | <i>Panax ginseng</i> | GI34595979 | — | I | — | SKL | — |
| Vitaceae | <i>Vitis vinifera</i> | GI225452652 | — | I | — | No | — |
| Brassicaceae | <i>Arabidopsis lyrata</i> | GI297819432 | — | I | — | SKL | — |
| | | GI297842237 | — | I | — | No | — |
| | <i>A. thaliana</i> | GI15228346 | Chromosome III | I | — | SKL | No ^s |
| | | GI334183914 | Chromosome I | I | Low ^d | No | No ^t |
| | <i>Brassica napus</i> | GI33943628 | — | I | — | SKL | No ^t |
| | <i>Chorispora bungeana</i> | GI119336424 | — | I | — | No | — |
| Jatrophaeae | <i>Jatropha curcas</i> | GI134285028 | — | I | — | SKL | Yes ^u |
| Malvaceae | <i>Gossypium hirsutum</i> | GI40850676 | — | I | — | SKL | No ^v |
| Eupobiaceae | <i>Ricinus communis</i> | GI255540797 | — | I | — | SKL | — |
| Saliceae | <i>Populus trichocarpa</i> | GI224121626 | Chromosome XIV | I | — | SKL | — |
| | | GI224135733 | Chromosome XV | I | — | AKL | No ^w |
| Fabaceae | <i>Glycine max</i> | GI167962545 | — | I | — | SKL | — |
| | | GI100170731 | — | I | — | SRL | — |
| | <i>Medicago truncatula</i> | GBABE82378 | — | I | — | AKL | No ^x |
| | <i>Pisum sativum</i> | GI284055630 | — | I | Low ^e | AKL | No ^y |
| | GI284055632 | — | — | I | Low ^e | SKL | — |
| Cucurbitaceae | <i>Cucumis melo</i> | GI341579690 | — | I | — | SKL | No ^z |

Supplemental Table S3. Plant isoenzymes of the ALDH10 family

| Plant family | Plant species | Accession number | Chromosome mapping | Position441 | BAL affinity | Peroxisomal signal | GB-accumulator | |
|-----------------------|----------------------------|------------------|--------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|
| MONOCOTS | | | | | | | | |
| Poaceae | <i>Zoysia tenuifolia</i> | GI50950081 | — | A | — | SKI | Yes ^{ab} | |
| | | GI50950101 | — | I | Moderate ^f | SKL | | |
| | <i>Hordeum vulgare</i> | GI144228152 | — | — | C | High ^g | No | Yes ^{ac,s} |
| | | GI15147873 | — | — | I | Low ^g | SKL | |
| | | GI45479172 | — | — | I | — | SKL | |
| | <i>H. brevisubulatum</i> | GI45479172 | — | — | I | — | SKL | — |
| | <i>Leymus chinensis</i> | GI57635840 | — | — | I | — | SKL | Yes ^{ad} |
| | | GI57635842 | — | — | C | — | No | |
| | <i>Sorghum bicolor</i> | GI242079177 | — | Chromosome VII | C | — | SKL | Yes ^{ae} |
| | | GI520546 | — | Chromosome VI | I | — | SKL | |
| | <i>Triticum aestivum</i> | GI21747870 | — | — | C | — | No | Yes ^{af} |
| | <i>Zea mays</i> | GI256355113 | — | Chromosome I | C | High ^h | SKL | Yes ^{ag} |
| | | GI194707306 | — | Chromosome X | I | — | SKL | |
| | <i>Agropyron cristatum</i> | GI270282575 | — | — | I | — | SKL | — |
| | | GI125590656 | — | Chromosome VIII | I | Moderate ⁱ | SKL | |
| | | GI115458832 | Chromosome IV | I | Low ⁱ | SKL | No ^{ah} | |
| CONIPHEROPHYTA | | | | | | | | |
| Pinaceae | <i>Picea sitchensis</i> | GI116786844 | — | I | — | SKL | — | |

The symbol — indicates that, to the best of our knowledge, information is not available.

^aValenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994. *J Plant Physiol* **143**: 145-152. ^bWeretilnyk and Hanson, 1989. *Arch Biochem Biophys* **271**: 56-63. ^cHibino et al., 2001. *Plant Mol Biol* **45**: 353-363. ^dMissihoun et al., 2011. *Planta* **233**: 369-382. ^eTylichová et al., 2010. *J Mol Biol* **396**: 870-882. ^fOishi and Ebina, 2005. *J Plant Physiol* **162**: 1077-1086. ^gFujiwara et al., 2008. *Physiol Plantarum* **134**: 22-30. ^hKopěčný et al., 2011. *FEBS J* **278**: 3130-3139. ⁱMitsuya et al., 2009. *FEBS Lett* **583**: 3625-3629. ^jYin et al., 2002. *Biochim Biophys Acta* **1577**: 452-456. ^kShen et al., 2002. *Theor Appl Genet* **105**: 815-821. ^lYancey et al., 1982. *Science* **217**: 1214-1222. ^mTipirdamaz et al., 2006. *Environ Exp Bot* **57**: 139-153. ⁿHanson and Wyse, 1982. *Plant Physiol* **170**: 1191-1198. ^oWang et al., 2007. *Act Bot Bor-Occ Sinica*. DOI : CNKI:SUN:DNYX.0.2007-03-015. ^pWeretilnyk et al., 1989. *Planta* **178**: 342-352. ^qLi et al., 2003. *Biotechnol Lett* **25**: 1431-1436. ^rPoljakoff-Mayber et al., 1987. *Aust J Plant Physiol* **14**: 341-350. ^sWyn Jones and Storey, 1981. Betaines. In: Paleg LG, Aspinal D, eds, *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*, Academic Press, New York, pp 171-204. ^tSelvaraj et al., 1995. *Phytochemistry* **38**: 1143-1146. ^uZhang et al., 2008. *Plant Sci* **174**: 510-518. ^vDeRidder and Crafts-Brandner, 2008. *Physiol Plantarum* **134**: 430-439. ^wBray et al., 1991. *Physiol Plantarum* **83**: 136-143. ^xNaidu et al., 1992. *Phytochemistry* **31**: 1195-1197. ^yCharlton et al., 2008. *Metabolomics* **4**: 312-327. ^zItai and Paleg, 1982. *Plant Sci Lett* **25**: 329-335. ^{aa}Liu et al., 2010. *Open Biotechnol J* **4**: 18-25. ^{ab}Marcum, 1999. *Crop Sci* **39**: 1153-1160. ^{ac}Hitz et al., 1982. *Crop Sci* **22**: 47-54. ^{ad}Cui et al., 2008. *Chem Res Chin Univ* **24**: 204-209. ^{ae}Grieve and Maas, 1984. *Physiol Plantarum* **61**: 167-171. ^{af}McDonnell and Wyn Jones, 1988. *J Exp Bot* **39**: 421-430. ^{ag}Hitz and Hanson, 1980. *Phytochemistry* **19**: 2371-2374. ^{ah}Rathinasabapathi et al., 1993. *Crop Sci* **33**: 534-538.



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXXIII. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

COMO CONVERTIR A UN INHIBIDOR COMPETITIVO EN INCOMPETITIVO: EL CASO DE LAS BETAÍNAS ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS

Rosario A. Muñoz Clares, Ángel G. Díaz Sánchez, Carmina Montiel
Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, CP 04510,
México D. F., México.
clares@servidor.unam.mx

Resumen

*Las betaina aldehído deshidrogenasas (BADHs) son un grupo de aldehído deshidrogenasas capaces de oxidar con diferente eficiencia a la betaina aldehído (BA) en una reacción irreversible que tiene como coenzimas a los nicotinamín adenín dinucleótidos, NAD(P)⁺. Hasta donde se conoce, su mecanismo de reacción y su estructura tridimensional son esencialmente iguales a los descritos para otras aldehído deshidrogenasas (ALDHs). Sin embargo, las propiedades cinéticas de aquellas BADHs que han sido caracterizadas a la fecha presentan diferencias—importantes por sus posibles implicaciones fisiológicas—con las de otras ALDHs. Una de estas diferencias es la inhibición mixta del NADH frente al NAD⁺ encontrada en las BADHs de plantas, bacterianas y animales, mientras que esta inhibición es competitiva en la gran mayoría de las deshidrogenasas dependientes de NAD(P)⁺, incluyendo a las ALDHs. Otra peculiaridad es que se inactivan reversiblemente si se preincuban con el nucleótido reducido o durante el curso de la reacción, inactivación esta última que es más rápida cuanto mayor sea la concentración de sustrato. La estructura tridimensional de la BADH de *Pseudomonas aeruginosa* en complejo con NADPH mostró la formación de un aducto entre la nicotinamida del nucleótido y el grupo tiol de la cisteína catalítica. Pensamos que este aducto, que no ha sido encontrado con anterioridad en ninguna enzima, es la forma inactiva de la PaBADH observada bajo condiciones catalíticas—como el componente incompetitivo de la inhibición y como la inactivación durante la reacción—y no catalíticas. La existencia de dos conformaciones de la Cys catalítica, una que permite que se lleve a cabo la reacción y otra que permite la formación de un aducto no activo con el NAD(P)H, explica el que la inactivación por NAD(P)H ocurra aún a concentraciones saturantes de NAD(P)⁺. Este mecanismo novedoso permite que un inhibidor como el NAD(P)H—que por razones estructurales debería ser exclusivamente competitivo con respecto al NAD(P)⁺—posea un componente incompetitivo en su inhibición, es decir no sólo disminuya la*

afinidad aparente de la enzima por NAD(P)⁺ sino que también disminuya la V_{max}. Tanto el componente incompetitivo como la formación del aducto durante la reacción proveen de válvulas de seguridad que evitan que una alta velocidad de la reacción lleve rápidamente al agotamiento del NAD⁺. “In vivo”, la inactivación transitoria de la enzima por cualquiera de estos dos mecanismos permitiría que el NAD⁺ consumido en la reacción de la BADH se regenere por las reacciones más lentas que lo reciclan. En el caso de la BADH de plantas ocurre además el establecimiento de una ruta alterna de liberación del NADH cuando la BA está a alta concentración, lo que lleva a que la inhibición por NADH sea parcial y por tanto se evite no sólo el agotamiento del NAD⁺ sino también que el aldehído pueda llegar a acumularse y producir efectos tóxicos. En conclusión, ciertas propiedades estructurales de las BADHs les permiten tener mecanismos efectivos de control a corto plazo por el nucleótido reducido, los cuales probablemente también operen en otras ALDHs que los requieran.

Palabras clave: Inhibición competitiva versus incompetitiva; bases estructurales de la inhibición por NAD(P)H; inactivación por NAD(P)H; aducto tiol-nicotinamida; consecuencias fisiológicas de la regulación por NAD(P)H.

Abstract

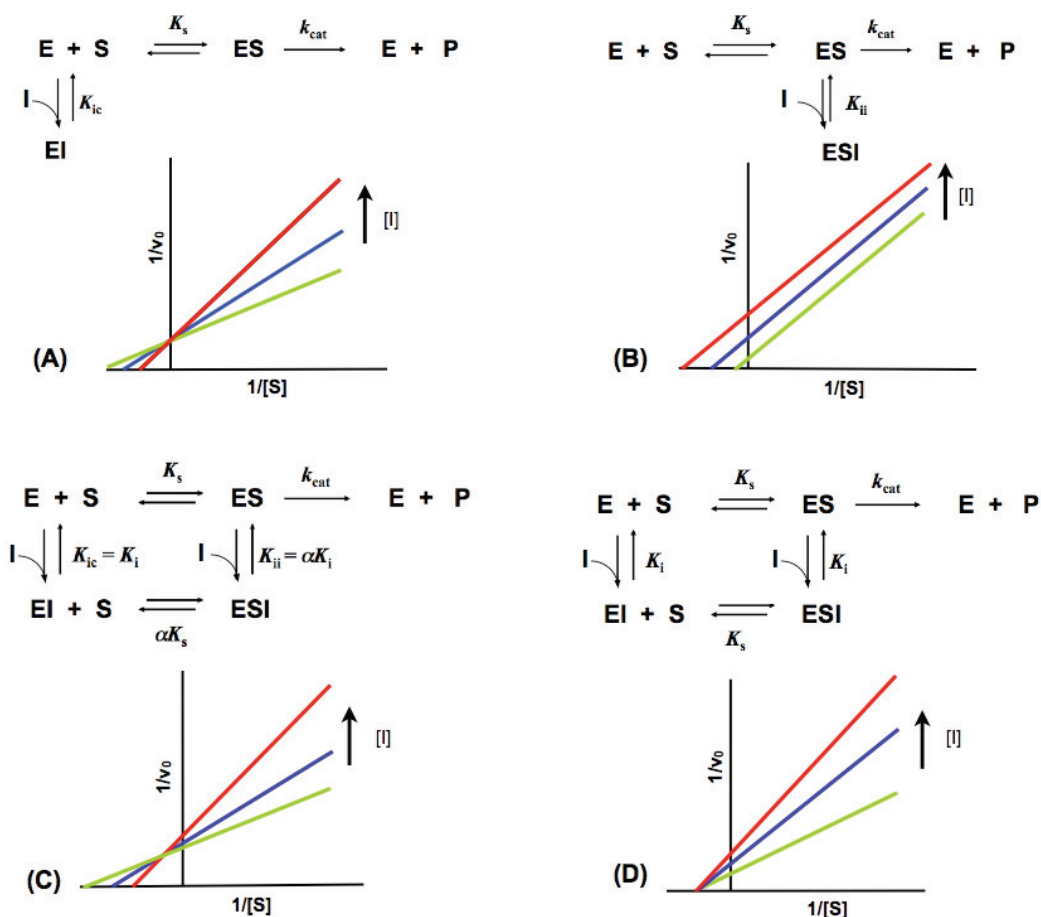
*The betaine aldehyde dehydrogenases (BADHs) are a group of aldehyde dehydrogenases able of oxidizing betaine aldehyde (BA) with different efficiency in an irreversible reaction that uses nicotinamide adenine dinucleotides, NAD(P)⁺, as coenzymes. As far as it is known, their reaction mechanism and three-dimensional structure are essentially the same as those described for other aldehyde dehydrogenases (ALDHs). However, the kinetic properties of the BADHs so far characterized present several differences—which may be physiologically relevant—with respect to other ALDHs. One of these differences is the mixed inhibition of NADH against NAD⁺ found in the BADHs from plants, bacteria and animals, while this inhibition is competitive in the majority of the NAD(P)⁺-dependent dehydrogenases, including the ALDHs. Another peculiarity is their reversible inactivation after being pre-incubated with the reduced nucleotide, or during the course of the reaction, the latter being faster as the concentration of substrates increases. The *Pseudomonas aeruginosa* BADH three-dimensional structure in complex with NADPH showed the formation of an adduct between the nicotinamide of the nucleotide and the thiol group of the catalytic cysteine. We propose that this adduct—which so far has not been detected in any other enzyme—is the PaBADH inactive form observed under catalytic and non-catalytic conditions. The existence of two conformations of the catalytic cysteine, one that allows the reaction and another that allows the formation of the inactive NAD(P)H-adduct, explains that inactivation by NAD(P)H takes place even at saturating NAD(P)⁺ concentrations. This novel mechanism adds an uncompetitive component in the inhibition of NAD(P)H against NAD(P)⁺, an inhibition that should be strictly competitive for structural reasons. In other words, NAD(P)H not only decreases the apparent affinity of the enzyme for NAD(P)⁺ but also decreases V_{max}. Both the uncompetitive component of the inhibition and the enzyme inactivation during the reaction provides the enzyme with a security valve that prevents the exhaustion of NAD(P)⁺ when the reaction velocity is high. “In vivo” the transitory inhibition of the enzyme for any of these two mechanisms would allow the recycling of the NAD(P)⁺ consumed during the BADH reaction. In the case of the chloroplasmic BADH, a new route of NADH release is established at high concentrations of BA. As a consequence, the inhibition by the reduced nucleotide is partial, and thus not only the exhaustion is prevented of NAD⁺ but also the build up of the toxic betaine aldehyde. In conclusion, our results show that certain structural features of the BADHs are the base for effective short-term regulation mechanisms, which are likely shared by other ALDHs that needs them.*

Keywords: Competitive versus uncompetitive inhibition; structural bases for NAD(P)H inhibition; enzyme inactivation by NAD(P)H; thiol-nicotinamide adduct; physiological implications of the regulation by NAD(P)H.

Diferentes tipos de inhibición y sus implicaciones fisiológicas

La inhibición enzimática juega un papel fundamental en la regulación de los flujos metabólicos, por lo que es de gran importancia el conocer los efectos que sobre estos flujos tienen los diferentes tipos de inhibidores. Atendiendo a la especie de la enzima a la que se unen, en las reacciones monosustrato los inhibidores se clasifican en competitivos, incompetitivos y mixtos [1]. Los inhibidores competitivos se unen a la enzima libre (E) en competencia con el sustrato y por tanto el sustrato y el inhibidor no pueden estar unidos simultáneamente a la enzima (Esquema 1A). Esta inhibición puede eliminarse a altas concentración de sustrato relativas a su K_m y a la concentración efectiva de inhibidor presente (es decir, a la concentración de inhibidor relativa a su K_i). Los inhibidores incompetitivos se unen a la especie de la enzima que ya tiene unido el sustrato (ES) (Esquema 1B), por lo que producen mayor inhibición a mayor concentración de sustrato y su máxima inhibición a saturación de éste. Los inhibidores mixtos se unen a ambas formas de la enzima y presentan por tanto dos componentes de inhibición: el competitivo y el incompetitivo (Esquema 1C). Un tipo especial, y no muy frecuente, de la inhibición mixta es la inhibición nocompetitiva (Esquema 1D), que se caracteriza porque el inhibidor posee igual afinidad por la enzima libre que por la enzima que ya ha unido al sustrato.

Los inhibidores incompetitivos, o los mixtos que poseen un componente incompetitivo por muy pequeño que éste sea, son mucho más efectivos que los inhibidores competitivos en disminuir el flujo a través de la ruta metabólica en la que se encuentre la enzima inhibida. Esto es porque—a diferencia de la inhibición competitiva—el efecto de la inhibición incompetitiva no es contrarrestado por la acumulación de sustrato que sigue inevitablemente a la inhibición de una enzima. Por el contrario, se favorece a medida que transcurre el tiempo, ya que el sustrato de la reacción inhibida va acumulándose progresivamente al seguir siendo producido por la reacción anterior y no consumido en la reacción de la que es sustrato. Como discute Cornish-Bowden [2], la inhibición incompetitiva puede llevar a que no se pueda establecer la condición de estado estacionario—necesaria para cualquier ruta metabólica—y con ello a la muerte celular. Es por esto que los organismos vivos parecen no usar inhibidores “sin salida” incompetitivos o mixtos como medio de control metabólico. En reacciones con dos sustratos o más que operan bajo la condición de estado estacionario es frecuente que se dé una inhibición incompetitiva de algún producto con respecto a alguno de los sustratos, pero estos productos, a diferencia de los inhibidores “sin salida”, son sustratos de la reacción siguiente en la ruta metabólica y eso controla su concentración dentro de los límites impuestos por el flujo en estado estacionario de esta vía.



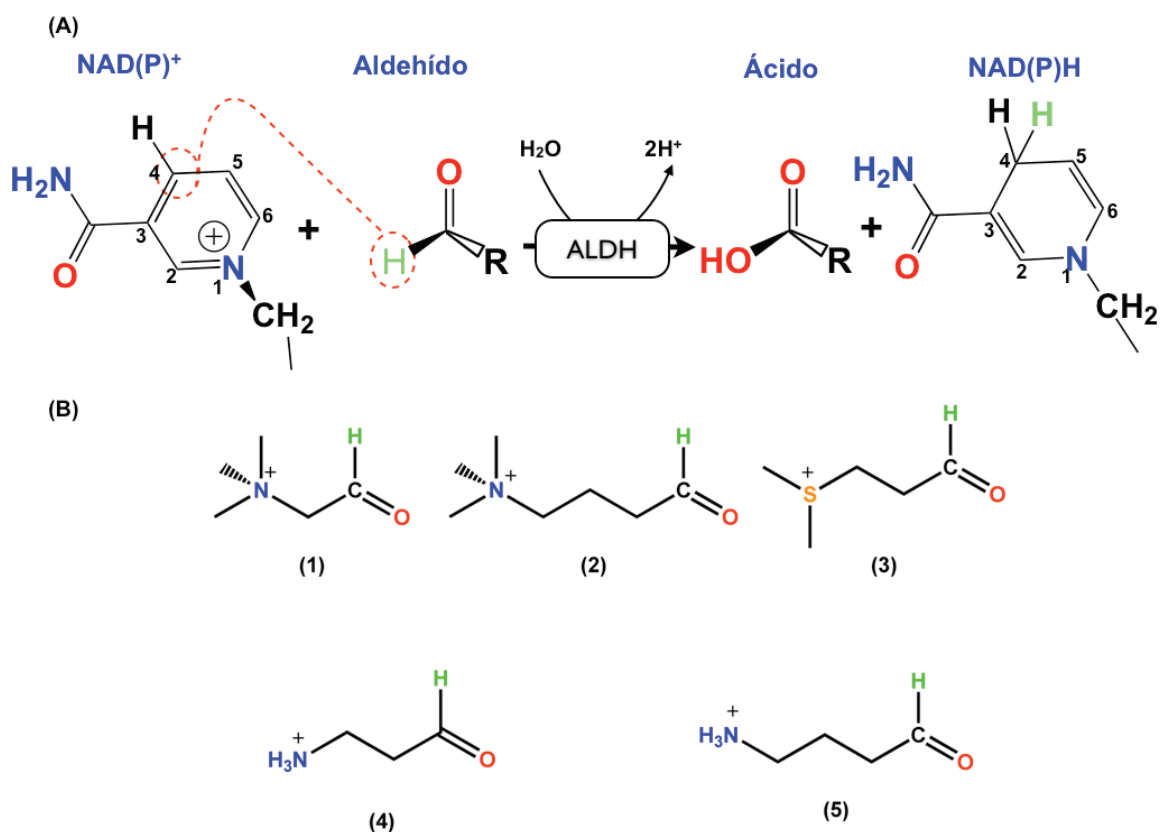
Esquema 1. Tipos de inhibición. Formas de la enzima que unen al inhibidor en reacciones monosustrato y patrones de inhibición mostrados en gráficas de dobles recíprocos. Inhibición competitiva (A). Inhibición incompetitiva (B). Inhibición mixta (C). Inhibición no competitiva (D). E = enzima libre; ES = complejo enzima-sustrato. EI = complejo enzima-inhibidor. ESI = complejo enzima-sustrato-inhibidor. K_s = constante de disociación del sustrato del complejo ES; αK_{is} = constante de disociación del sustrato del complejo ESI; K_{ic} = constante de disociación del inhibidor del complejo EI; K_{ii} = constante de disociación del inhibidor del complejo ESI.

Las betaína aldehído deshidrogenasas

Las betaína aldehído deshidrogenasas (BADHs) son enzimas capaces de oxidar con diferente eficiencia a la betaína aldehído (BA) en una reacción irreversible que usa como coenzimas a los nicotinamín adenín dinucleótidos, NAD(P)⁺ [3-9] (Esquema 2A). Dentro de la superfamilia de las aldehído deshidrogenasas existen varias familias de enzimas entre las que destacan, por poseer un mayor número de miembros caracterizados bioquímicamente, las ALDH9 bacterianas y animales, las ALDH10 de plantas y las ALDH22 bacterianas [10].

Las BADHs no constituyen un grupo homogéneo en lo que respecta a su estado de oligomerización, distribución subcelular y especificidad de coenzima y sustrato [10]. Debido a que históricamente su actividad se midió con diferentes sustratos (Esquema 2B), en el sistema de clasificación de enzimas se les han asignado diferentes números: EC 1.2.1.8 (betaína

aldehído deshidrogenasa); EC 1.2.1.5 (E3 ALDH); EC 1.2.1.19 (γ -aminobutiraldehído deshidrogenasa) y EC 1.2.1.47 (4-*N*-trimetilaminobutiraldehído deshidrogenasa). En general esto refleja además sus diferentes preferencias por un sustrato, y en consecuencia sus diferentes papeles fisiológicos que dependen de su origen o distribución intracelular. Hasta la fecha se ha encontrado que las BADHs participan en: (1) la síntesis del osmoprotector glicina betaína (GB) [6,11-13]; (2) la degradación de colina—por las bacterias que pueden crecer en este compuesto como única fuente de carbono, nitrógeno y energía [4,14-15]; (3) la degradación de poliaminas [16]; (4) la síntesis del ácido γ -amino butírico [17] y (5) la síntesis de carnitina [18]. En nuestro grupo de trabajo estamos estudiando las propiedades cinéticas y estructurales de las BADHs de cloroplasto (chBADH) de amaranto y espinaca [12,19-27], como ejemplos de las enzimas anabólicas que sintetizan glicina betaína, y de la BADH del patógeno humano oportunista *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) [20,28-33], como ejemplo de las enzimas catabólicas.



Esquema 2. Reacción catalizada por la BADHs y sustratos conocidos de estas enzimas. (A) El hidruro del aldehído se transfiere al C4 del NAD(P)⁺ en una reacción irreversible que produce el ácido correspondiente y el NAD(P)H. (B) Las enzimas hasta ahora caracterizadas bioquímicamente aceptan a compuestos aldehídos con una carga positiva, ya sea ésta en un nitrógeno cuaternario: betaína aldehído (1) o trimetilamino butiraldehído (2); un azufre ternario: dimetilsulfonio propionaldehído (3); o en un grupo amino: 3 amino propionaldehído (4) y γ -amino butiraldehído (5).

Las chBADHs son enzimas diméricas [5,7] que usan exclusivamente al NAD⁺ [5,7] y participan en la respuesta al estrés osmótico—producido éste ya sea por déficit de agua (sequía) o por exposición a suelos hipersalinos—que consiste en la síntesis y acumulación de glicina betaína en los cloroplastos. Las plantas que poseen esta capacidad de respuesta son mucho más resistentes a estas condiciones adversas que aquellas plantas que no acumulan glicina

betaína. Es por esto que desde hace unos años han habido numerosos intentos de ingeniería metabólica para convertir plantas no acumuladoras de glicina betaína en plantas acumuladoras, transformándolas con genes de BADH de origen bacteriano [34,35] o vegetal [36-39]. Sin embargo, no se ha logrado que las plantas transformadas acumulen el osmoprotector hasta los niveles que lo hacen las plantas que lo producen naturalmente. Estos fracasos pudieran deberse, entre otras razones, a que las enzimas que se introdujeron no posean las características cinéticas adecuadas para llevar a cabo la síntesis de glicina betaína en cantidades tales que permitan su acumulación. De aquí el interés de conocer las propiedades cinéticas de la chBADH que poseen las plantas acumuladoras de GB y las implicaciones fisiológicas de estas propiedades.

En cuanto a la PaBADH, ésta es una enzima tetramérica [21] que cataliza un paso intermedio del catabolismo de colina o de los precursores de colina—acetilcolina, fosfatidilcolina o fosforilcolina, todos ellos compuestos muy abundantes en los sitios que infecta la bacteria. Al mismo tiempo, provee a la bacteria del osmoprotector glicina betaína, importante para resistir el estrés osmótico existente en los tejidos infectados, y de equivalentes de reducción tanto para el catabolismo (NADH) como para el anabolismo (NADPH), ya que ésta—al igual que la enzima de otras bacterias con capacidad de crecer en colina [14,40]—es la única ALDH conocida que usa con igual eficiencia al NAD^+ y al NADP^+ . El NADPH producido en la reacción de la PaBADH puede también ser necesario para la respuesta de la bacteria al estrés oxidativo, que le impone el organismo infectado como una primera línea de defensa frente a la infección. Debido a las importantes funciones de esta enzima en la fisiopatología de la bacteria, pensamos que la PaBADH puede ser un enzima clave en el establecimiento y crecimiento del patógeno y un blanco potencial de fármacos. Su inhibición, además, llevaría a la acumulación de BA que es un compuesto altamente tóxico para la bacteria [41]. El diseño o selección de inhibidores específicos de la PaBADH que puedan usarse como agentes antibacterianos en la lucha contra *P. aeruginosa*—un patógeno altamente resistente hacia los antibióticos de uso común—requiere de una caracterización cinética y estructural a fondo de esta enzima.

Las peculiares propiedades cinéticas de las betaína aldehído deshidrogenasas de cloroplasto y de *P. aeruginosa*

Hasta donde se conoce, la estructura tridimensional [42, 43] (Fig. 1) y el mecanismo de reacción [15] (Esquema 3) de las BADHs son esencialmente iguales a los descritos para el resto de las aldehído deshidrogenasas no fosforilantes (ALDHs) [44]. Sin embargo, las propiedades cinéticas de aquellas pocas BADHs que han sido caracterizadas a la fecha [19, 27, 33, 40] presentan diferencias—importantes por sus posibles implicaciones fisiológicas—con las encontradas en otras ALDHs. El mecanismo cinético de las chBADH [27], PaBADH [33] y BADH de riñón de cerdo [19] es el bi bi secuencial ordenado en estado estacionario característico de las deshidrogenasas dependientes de NAD(P)^+ incluyendo a las ALDHs [45], con el nucleótido oxidado como el primer sustrato y el nucleótido reducido como el último producto. Sin embargo, las BADHs presentan inhibición mixta del NAD(P)H frente al NAD(P)^+ (Fig. 2A), mientras que en el resto de las ALDHs [45], y en la generalidad de las deshidrogenasas dependientes de NAD(P)^+ [45-48], esta inhibición es competitiva. El hallazgo del componente incompetitivo de la inhibición por el nucleótido reducido, que no puede eliminarse a saturación del nucleótido oxidado, llevó a la propuesta de que el mecanismo cinético ordenado de las BADHs era de naturaleza Iso, como define Cleland [49]. En este tipo de mecanismos el último producto liberado de la enzima se une a una forma de ésta diferente a la que une al primer sustrato de la reacción. En el caso de las BADHs, el nucleótido oxidado y el reducido se unirían a formas diferentes de la enzima que estarían en equilibrio (Fig. 2B).

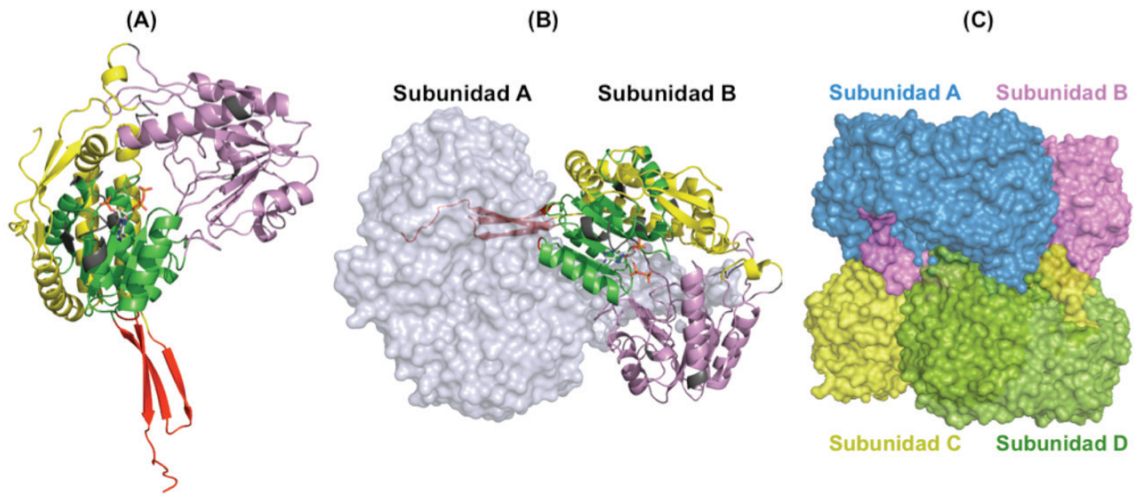
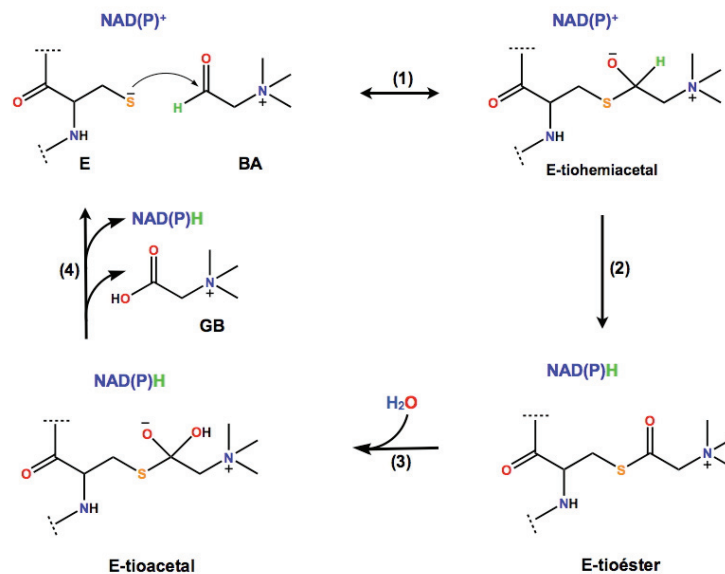


Figura 1. Estructura tridimensional de la PaBADH. (A) monómero, mostrando el dominio de unión al nucleótido (verde), el dominio catalítico (violeta) y el dominio de oligomerización (rojo). (B) Dímero, mostrando la forma en que se asocian dos subunidades por medio de sus dominios de oligomerización. (C) Tetrámero, que es la unidad funcional de esta enzima. La figura se hizo con PyMOL [67] usando las coordenadas cristalográficas del 2ve5.pdb [43].



Esquema 3. Mecanismo químico de la reacción catalizada por las BADHs. Paso (1) *Acilación*: Después de que se han unido el NAD(P)^+ y la betaína aldehído (BA) al sitio activo de la enzima, ocurre un ataque nucleofílico del grupo tiolato de la cisteína catalítica sobre el carbono carbonílico del aldehído, formándose un intermediario tetraédrico covalente (tiohemiacetal). (2) *Transferencia del hidruro*: en este paso se produce la oxidación del sustrato por la transferencia del hidruro del tiohemiacetal al C4 del NAD(P)^+ , formándose un intermediario tetraédrico trigonal (tioéster). (3) *Desacilación*: una molécula de agua realiza un ataque nucleofílico sobre el tioéster formando un nuevo intermediario tetrahédrico (tioacetal). (4) *Liberación de los productos*: La ruptura del enlace S-C permite la liberación de la glicina betaína (GB) seguida de la del NAD(P)H .

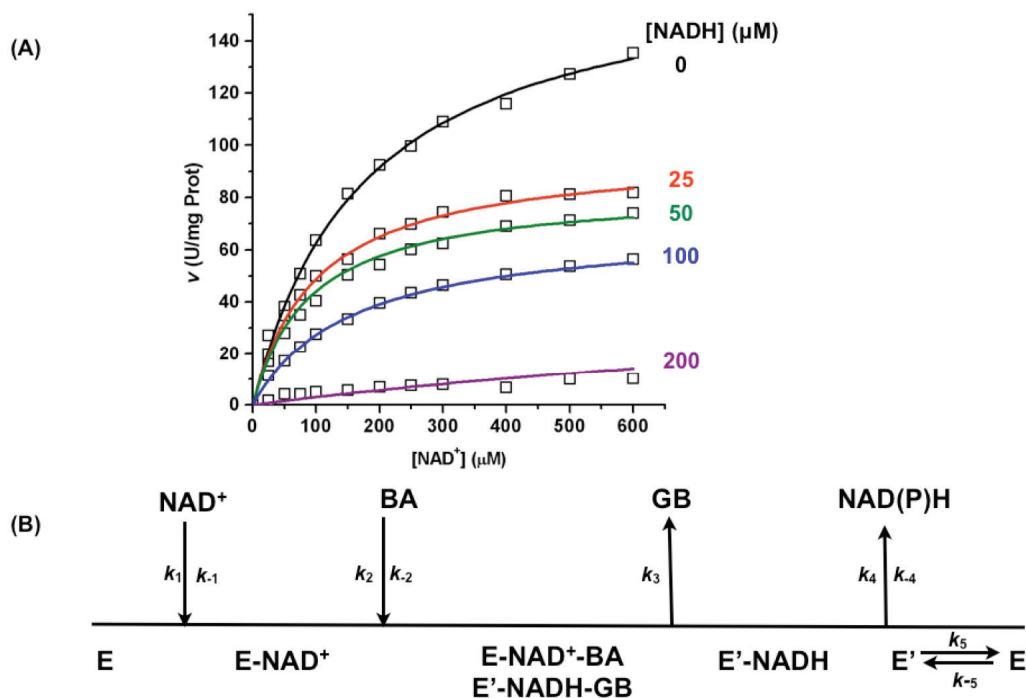


Figura 2. Inhibición mixta del NADH frente al NAD^+ en las BADHs. (A) Patrón de inhibición obtenido con la PaBADH. (B) Esquema del mecanismo Iso Bi Bi ordenado en estado estacionario propuesto para las BADHs de cloroplasto [27] y de riñón [19]. La forma de la enzima libre que resulta después de liberarse el nucleótido reducido (E') se isomeriza a la forma de la enzima libre que une al nucleótido oxidado (E) antes de que empiece un nuevo ciclo catalítico.

Otra peculiaridad interesante de la cinética de las BADHs bacteriana y de plantas estudiadas en nuestro grupo de investigación es que se inactivan reversiblemente si se preincuban con el nucleótido reducido bajo condiciones no catalíticas, es decir en ausencia de los sustratos NAD^+ y BA. La inactivación es un proceso dependiente del tiempo y de la concentración del nucleótido (Fig. 3A). Con una cinética de inactivación bifásica en la que primera fase es muy rápida (Fig. 3B). La inactivación es un proceso adicional a la inhibición que éstos nucleótidos producen (Fig. 3C). La enzima de cloroplasto también se inactiva parcial y reversiblemente si se preincuba con BA bajo condiciones no catalíticas, es decir en ausencia de NAD^+ [C. Mújica-Jiménez, A.G. Díaz-Sánchez, C. Montiel y R.A. Muñoz-Clares, resultados no publicados]. La cinética de estos procesos de inactivación es consistente con un cambio conformacional de la enzima con una modificación química de ésta inducida por el nucleótido o por la BA, que ocurre en forma más lenta que la unión rápida del ligando al sitio activo.

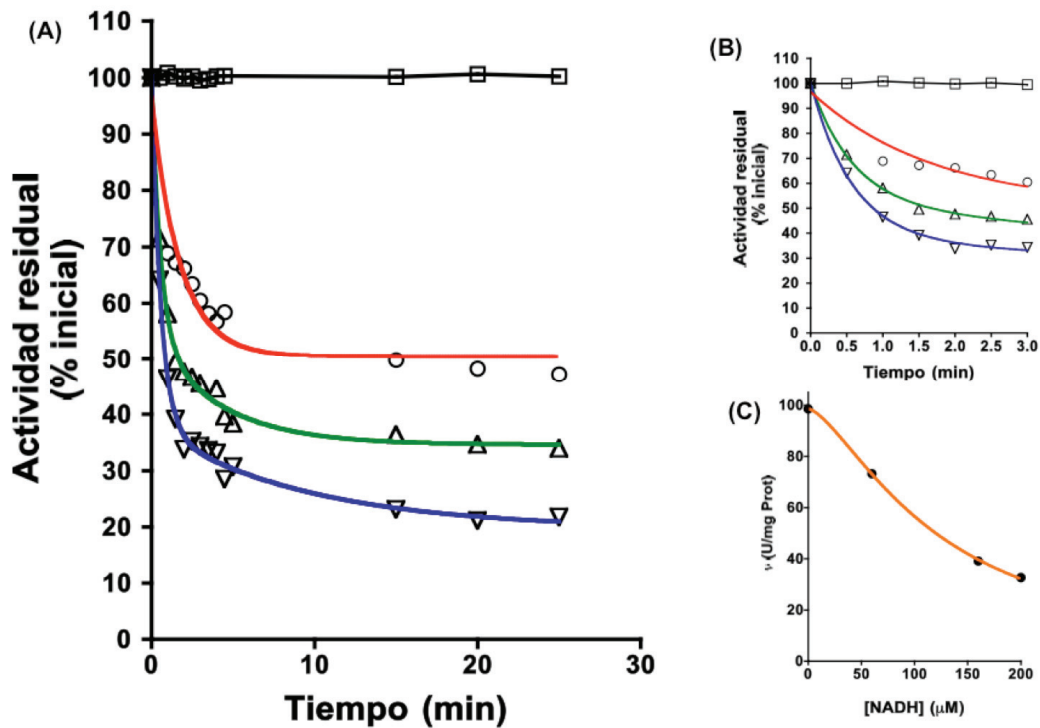


Figura 3. Inactivación de la PaBADH por incubación con NADPH. (A) Cinética bifásica de inactivación observada por la preincubación de la enzima en presencia de NADPH a 60 (○), 120 (△) y 200 μM (▽). (B) Fase rápida de la inactivación observada a los tiempos cortos. (C) Inhibición por el NADH determinada como la actividad al tiempo cero de incubación en presencia de las concentraciones del nucleótido indicadas. Este valor es el considerado como 100% en la gráfica de la inactivación. Las determinaciones de actividad se hicieron en presencia de la misma concentración de NADPH que se usó en la preincubación. Las líneas son teóricas, resultado del mejor ajuste a una doble exponencial (A y B) o a una hipérbola (C).

Y finalmente, pero igualmente interesante, las BADHs estudiadas por nosotros se inactivan rápidamente durante el curso de la reacción por el NAD(P)H producido en ésta (Fig. 4A) [A.G. Díaz-Sánchez, C. Montiel y R.A. Muñoz-Clares, resultados no publicados]. A concentraciones de NAD(P)⁺ cercanas a la saturación sólo se consume aproximadamente un 10% del sustrato. El que no se trata de una inhibición total por el NAD(P)H producido en la reacción se demuestra porque (1) La adición de NAD(P)⁺ y/o BA frescos al medio de reacción una vez que la enzima se ha inactivado no permite que se reinicie la actividad (Fig. 4A) y (2) la concentración del nucleótido reducido no es capaz de inhibir totalmente a la enzima, si se añade al inicio de una reacción que se lleva a cabo con concentraciones de sustratos iguales a las que quedan cuando la reacción se detiene (Fig. 4B). La inactivación, sin embargo, se debe al NAD(P)H formado durante la reacción, puesto que se puede revertir si se elimina éste por dilución en un medio de ensayo fresco, llegándose de nuevo a una segunda inactivación cuando se alcanza una concentración de nucleótido reducido similar a la alcanzada en la primera reacción (Fig. 4C). El grado de avance de la reacción, es decir el porcentaje del sustrato que se consume antes de que se produzca la inactivación, es menor cuanto más altas sean las concentraciones iniciales de cualquiera de los dos sustratos (Fig. 4D). El que el grado de avance de la reacción dependa en forma hiperbólica pero inversa de la concentración de los sustratos es consistente con que esta inactivación sea el resultado de una reacción colateral que convierte a un intermediario del ciclo catalítico, E-NAD(P)H, en un complejo abortivo, E*-NAD(P)H (Esquema

4). La enzima atrapada en la especie E^* -NAD(P)H sólo puede reincorporarse al ciclo catalítico por disociación del NAD(P)H, el cual de acuerdo a nuestros resultados no puede ser desplazado de este complejo ni por $NAD(P)^+$ ni por BA. Este mecanismo difiere del mecanismo Iso propuesto anteriormente en que las especies E^* -NAD(P)H y E^* no forman parte del ciclo catalítico.

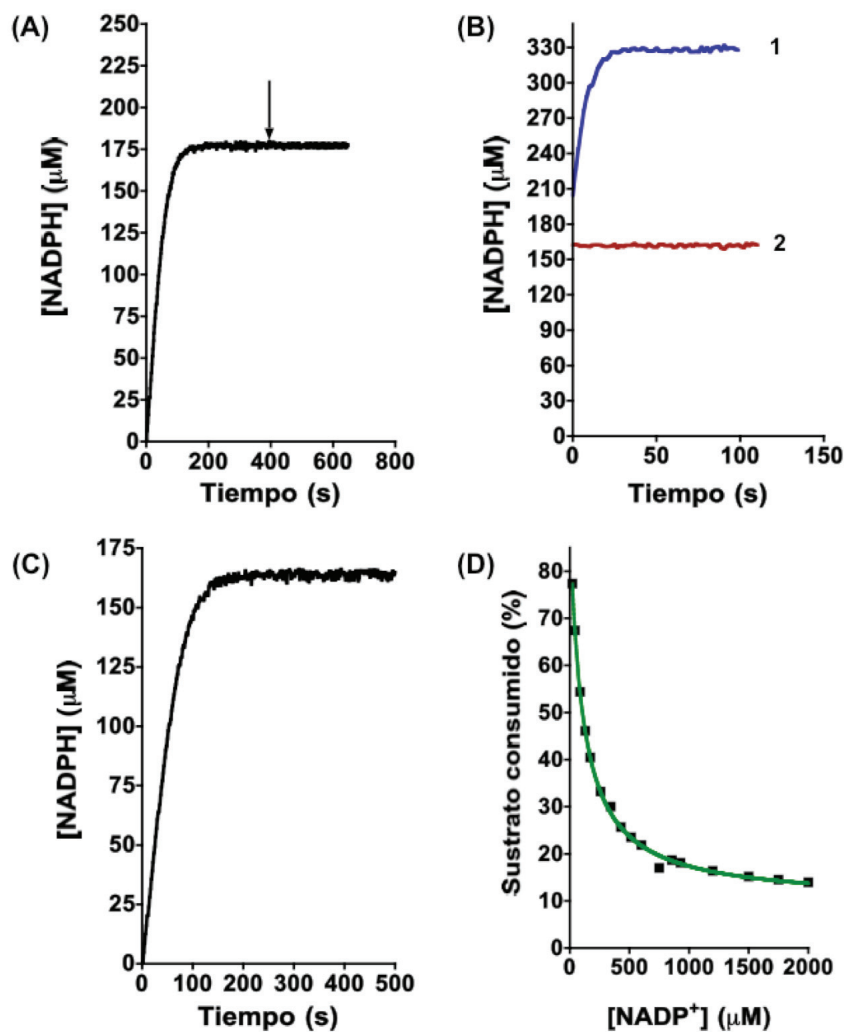
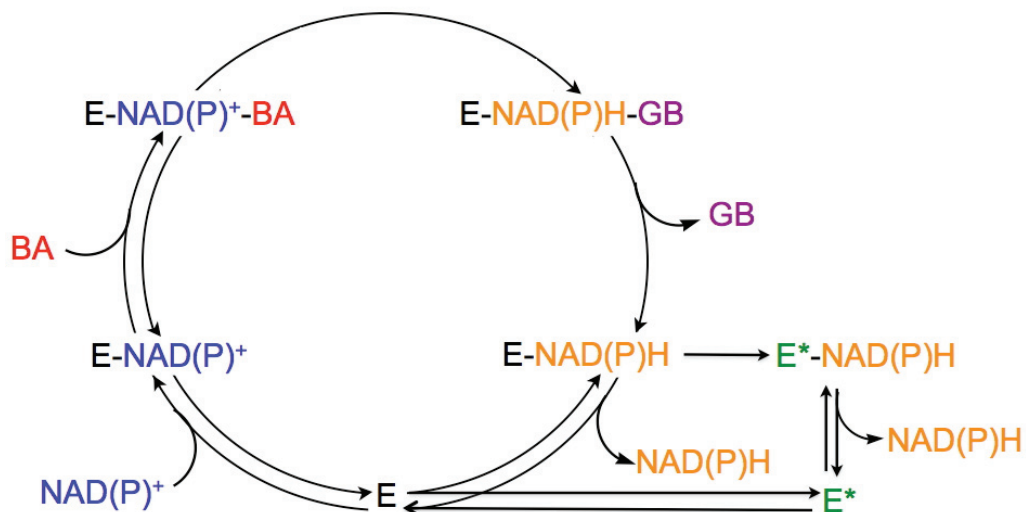


Figura 4. Inactivación de la PaBADH durante la reacción. (A) Curso temporal de la reacción obtenido usando una concentración de sustratos saturante (2 mM NAD^+ y 2 mM BA). La reacción se detiene cuando sólo se ha consumido el 10% del $NADP^+$. La flecha indica la adición de $NADP^+$ y BA a una concentración final en el medio de ensayo igual a la que había al tiempo cero de la reacción. (B) Reversibilidad de la inactivación. Cuando una enzima que se ha inactivado en la reacción se diluye 500 veces en un medio de ensayo fresco, se recupera la actividad si éste no contiene NADPH (línea 1), pero no recupera actividad si contiene NADPH a la misma concentración que se produjo cuando la reacción se detuvo (línea 2). (C) La concentración de NADPH que mantiene inactiva a la enzima después de que la reacción se ha detenido permite una actividad significativa, aunque disminuida, de la enzima si se añade desde el inicio de la reacción. (D). Dependencia del grado de avance que alcanza la reacción antes de detenerse de la concentración inicial de $NADP^+$. La línea teórica es el resultado del mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación de un hipérbola. El grado de avance mínimo estimado en este ajuste es del 10 %.



Esquema 4. Mecanismo propuesto para la formación de la especie inactiva E^* -NAD(P)H. La especie E -NAD(P)H, que es un intermediario del ciclo catalítico, puede producir la enzima libre o la especie abortiva E^* -NAD(P)H, la que se va acumulando durante el transcurso de la reacción hasta que toda la enzima queda atrapada en forma de esta especie abortiva y la reacción se detiene. Si se elimina el NAD(P)H del medio en que está la enzima, se produce la disociación del NAD(P)H y la isomerización de E^* a E , reactivándose de esta forma la enzima.

Bases estructurales de las propiedades cinéticas de las betaína aldehído deshidrogenasas

Los nicotinamín adenín dinucleótidos (o nucleótidos de piridina), tanto en su forma oxidada como reducida, se unen en un dominio de las deshidrogenasas que posee una estructura característica conocida como plegamiento Rossmann [50]. En el caso de las ALDHs este plegamiento (Fig. 5A) es ligeramente diferente al clásico descrito para las alcohol deshidrogenasas (Fig. 5B) [51]. Se ha propuesto [52] que esta estructura atípica del plegamiento Rossmann permite al nucleótido unido a las ALDHs el poseer una gran flexibilidad conformacional, necesaria para la catálisis. Efectivamente, las estructuras tridimensionales de diferentes ALDHs obtenidas sin y con el nucleótido unido han mostrado que la unión de éste no induce un cambio conformacional importante en el sitio activo, sólo el rearrreglo de algunas cadenas laterales de residuos catalíticos [44]. Es el nucleótido el que cambia de conformación durante el ciclo catalítico—al pasar de $NAD(P)^+$ a $NAD(P)H$ —para permitir que la reacción prosiga [53]. La porción de la nicotinamida del nucleótido reducido debe moverse en el sitio activo una vez que se reduce (Fig. 5C) para permitir el acceso de la molécula de agua hidrolítica al enlace tioéster que se va a romper y así liberar el producto ácido. Ello tiene como consecuencia importantes diferencias entre el $NAD(P)^+$ y el $NAD(P)H$ con respecto a la forma en que su porción nicotinamida interacciona con los residuos catalíticos de las ALDHs, así como con los intermediarios de la reacción catalizada por estas enzimas. Pero a pesar de estas diferencias, puesto que sólo existe un dominio de unión al nucleótido por sitio activo de las deshidrogenasas, el nucleótido reducido tiene que unirse al mismo sitio que el nucleótido oxidado y por tanto la unión de ambos debe ser mutuamente excluyente. De acuerdo con esto, el nucleótido reducido debe ser un inhibidor competitivo del nucleótido oxidado, el que al saturar a la enzima debe eliminar la inhibición, en el caso de deshidrogenasas que catalizan reacciones reversibles.

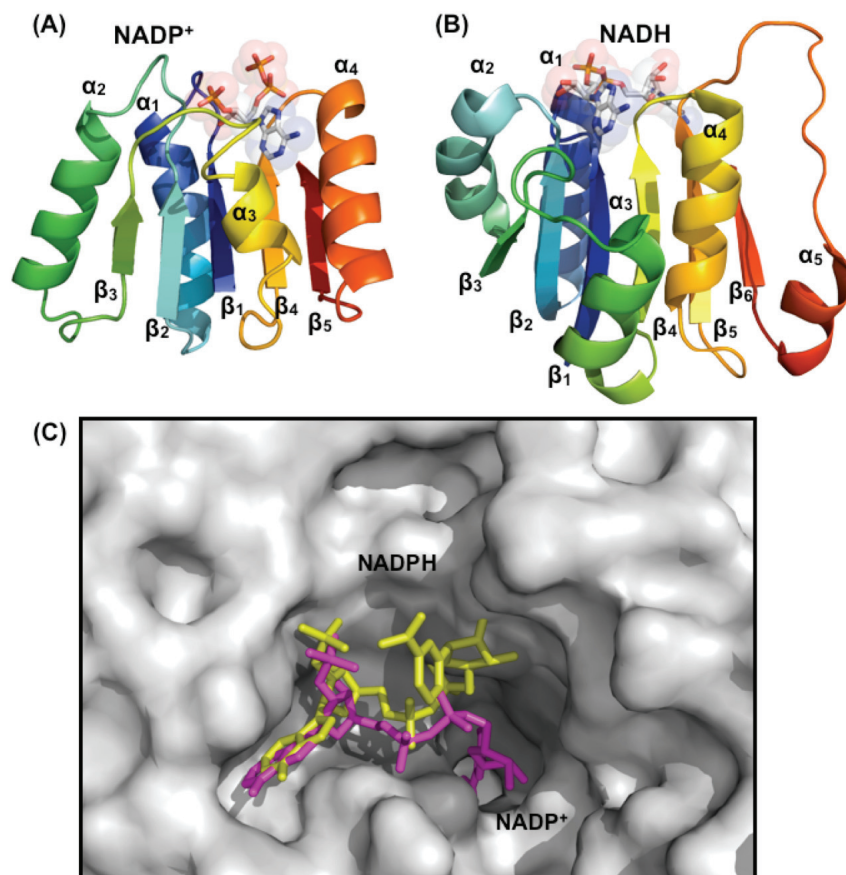


Figura 5. Sitio de unión del dinucleótido a deshidrogenasas dependientes de nicotinamín adenín dinucleótidos y conformaciones de éstos. (A) Plegamiento Rossmann modificado de las alcohol deshidrogenasas (ADHs) obtenido en la PaBADH [43]. (B) Plegamiento Rossmann clásico de las ADHs obtenido en la ADH de hígado de caballo [65]. (C) Sitio de unión del nucleótido mostrando la conformación adoptada por el NADP⁺ observada en la 10-formiltetrahydrofolato deshidrogenasa de humano [54] y la conformación del NADPH observada en la lactaldehído deshidrogenasa de *E. coli* [66]. La figura se hizo con PyMOL [67] usando las coordenadas cristalográficas de 2ve5.pdb (A); de 2ohx.pdb (B); 2o2q.pdb (NADP⁺) y 2ilu.pdb (NADPH) (C).

Recientemente se determinó la estructura tridimensional de la BADH de *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) con NADPH unido [A.G. Díaz-Sánchez, L. González-Segura, E. Rudiño-Piñera, A. Martínez-Vázquez y R.A. Muñoz-Clares, resultados no publicados], lo que nos permitió conocer que este nucleótido forma un aducto con el grupo tiol de la cadena lateral de la cisteína catalítica (Fig. 6A), con las características que se muestran en la Fig. 6B. Este hallazgo confirmó los resultados de estudios espectroscópicos realizados en nuestro laboratorio [A.G. Díaz-Sánchez y R.A. Muñoz-Clares, resultados no publicados] que mostraban un cambio en la región UV del espectro de absorción del NAD(P)H cuando estaba en presencia de la enzima (Fig. 6C). Con anterioridad se había encontrado en otra ALDH un aducto formado entre la cisteína catalítica y el NADP⁺ [54] (Figs. 6D y E), aducto que también presenta espectros de absorción característicos que nos han permitido detectarlo en la PaBADH (Fig. 6F). De hecho, se conocía de tiempo atrás que el C4 de la nicotinamida del NAD⁺ era capaz de reaccionar con compuestos tioles de bajo peso molecular [55] y con tioles de proteínas [56], formando el tipo de aducto que

se muestra en la Fig. 6E. Pero en el caso de la nicotinamida reducida del NAD(P)H el C4 ya no es reactivo, por lo que el aducto debe formarse o en el C2 o en el C5 como se muestra en la Fig. 6A y B. La estructura cristalográfica mostró claramente que es el C2 de la nicotinamida del NADPH el que forma el aducto con el tior de la cisteína catalítica de la PaBADH (Fig. 6A).

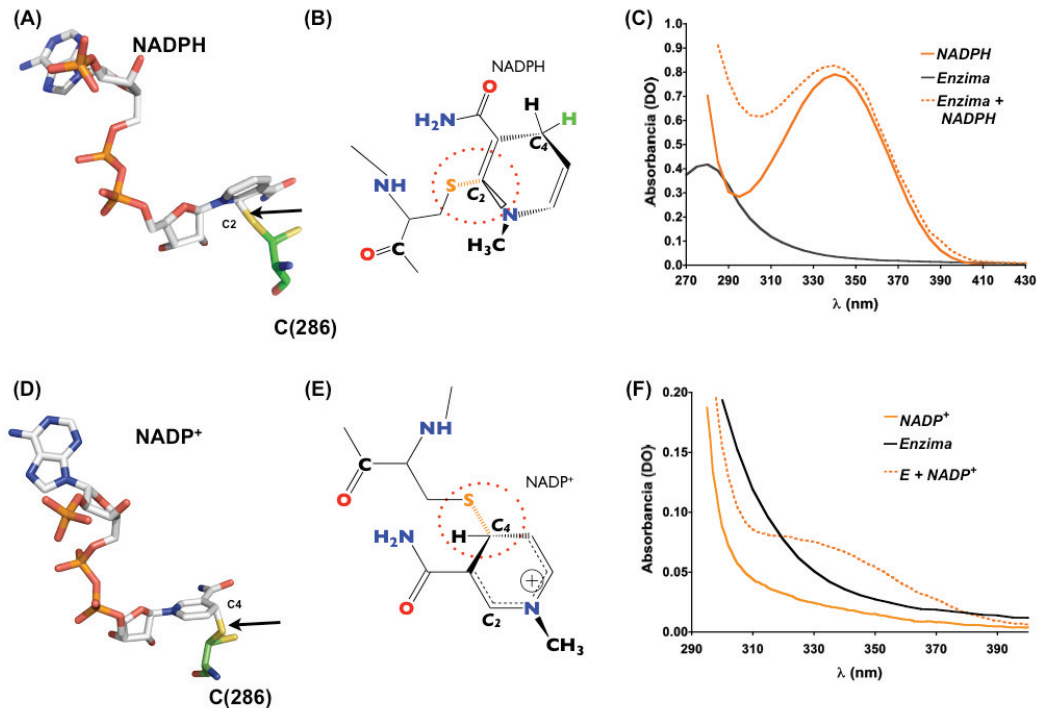


Figura 6. Aductos cisteína catalítica-NAD(P)H en las ALDHs. (A) Estructura del aducto encontrado en el cristal de la PaBADH en complejo con NADPH [A.G. Díaz-Sánchez, L. González-Segura, E. Rudiño-Piñera, A. Martínez-Vázquez y R.A. Muñoz-Clares, resultados no publicados]. El enlace covalente entre la cisteína catalítica en la conformación de descanso y el C2 del anillo reducido de la nicotinamida está indicado con una flecha. (B) Esquema de la estructura del aducto PaBADH-NADPH. (C) Cambios en los espectros de absorción UV de la PaBADH por la unión del NADPH indicativos de la formación del aducto. (D) Estructura del aducto encontrado en el cristal de la 10-formiltetrahydrofolato deshidrogenasa de humano en complejo con NADP⁺ [54] El enlace covalente entre la cisteína catalítica en la conformación de ataque y el C4 del anillo oxidado de la nicotinamida está indicado con una flecha. (E) Esquema de la estructura del aducto PaBADH-NADH. (F) Cambios en los espectros de absorción UV de la por la unión del NADP⁺ indicativos de la formación del aducto. Las figuras A y D se hicieron con PyMOL [67] usando las coordenadas cristalográficas de la PaBADH en complejo con NADPH y 2o2q.pdb, respectivamente.

Este hallazgo es de gran interés porque constituye la primera demostración de que los adenín nicotinamín dinucleótidos reducidos pueden formar aductos con el grupo tior de cisteínas de las proteínas, pero, sobre todo, porque sugiere las bases moleculares del mecanismo de la inactivación reversible por el NAD(P)H—que habíamos observado cuando incubábamos a las BADHs estudiadas en nuestro laboratorio con estos nucleótidos reducidos—y el de la inactivación durante el curso de la reacción. Esto es porque encontramos que el aducto con el NADPH se forma cuando la cisteína está en la conformación que hemos llamado de “descanso” (Fig. 6A), mientras que está en la conformación que llamamos de “ataque” en el aducto encontrado por otro grupo de investigación con NADP⁺ [54] (Fig. 6D). La BA una vez que se une

al sitio activo es capaz de romper el aducto formado por el NAD(P)^+ con la cisteína en la posición de “ataque” [54]. Probablemente éste sea un paso obligatorio de la reacción, dado que el mecanismo cinético consiste en la unión ordenada del nucleótido oxidado seguido de la unión del aldehído y el aducto se forma muy rápidamente, en un tiempo inferior a 3 ms. Pero la BA no puede romper el enlace del aducto formado por el NAD(P)H con la cisteína en la posición de “descanso”, ya que este enlace está alejado de su sitio de unión. En cuanto al NAD(P)^+ , aunque pudiera romperlo formaría otro aducto que también sería inactivo porque mantendría a la cisteína catalítica en la posición de “descanso” impidiendo así la formación del tiohemiacetal con el BA.

Por medio de la formación de este aducto el NAD(P)H disminuye la concentración de sitios activos de la enzima y produce el efecto inhibitorio sobre la V_{max} observado como el componente incompetitivo de la inhibición por estos nucleótidos. En los estudios de inhibición realizados *in vitro* esta disminución de sitios activos puede ocurrir rápidamente al inicio de la reacción en el momento en que el NAD(P)H añadido se une a la enzima. En los ensayos de actividad realizados en ausencia de NAD(P)H añadido en los que observamos inactivación durante el curso de la reacción, la disminución de sitios activos, es decir la inactivación, ocurriría a medida que la reacción transcurre y se va produciendo NAD(P)H , lo que llevaría a la progresiva acumulación del aducto—la especie que hemos nombrado como $\text{E}^*\text{NAD(P)H}$ —y a la completa inactivación de la enzima cuando toda ella se encuentre como esta especie.

De esta forma se convierte un inhibidor que debe ser competitivo por razones estructurales en uno mixto que posee un importante componente incompetitivo; es decir, en un inhibidor que no sólo disminuye la afinidad aparente de la enzima por su sustrato (aumenta la K_m) sino que también disminuye la V_{max} . Sin embargo, es importante resaltar que aunque el efecto de la formación del aducto se percibe en los estudios cinéticos de velocidad inicial como el componente incompetitivo de la inhibición mixta, no es ni mecanística ni cinéticamente equivalente. A diferencia de los inhibidores incompetitivos clásicos que son muy efectivos sólo a altas concentraciones de sustrato—lo que no permitiría disminuir significativamente la velocidad de la reacción cuando el NAD^+ se esté agotando—este mecanismo es también efectivo a bajas concentraciones de NAD^+ , puesto que se basa en la inactivación de una parte de la enzima, lo que depende solamente de la concentración del inhibidor y de la proporción de enzima libre que exista en la conformación correcta para formar el aducto con él.

Relevancia fisiológica de las propiedades cinéticas de las betaina aldehído deshidrogenasas

Las inusuales propiedades cinéticas de los dos tipos de BADHs estudiados por nosotros tienen en común dos cosas: (1) que en ambas enzimas el nucleótido reducido es más eficiente en reducir la velocidad de la reacción—ya sea por el componente incompetitivo de la inhibición mixta o por inactivación reversible de la enzima—que si se tratara de un inhibidor competitivo, y (2) que estos efectos inhibitorios o inactivantes del NAD(P)H no pueden ser revertidos por el NAD(P)^+ .

Pero ¿qué importancia fisiológica puede tener el que el NAD(P)H sea un buen inhibidor y que NAD^+ no pueda eliminar su inhibición? La respuesta está probablemente en que cualquier reacción irreversible que use un compuesto de suma importancia para el metabolismo como es el NAD^+ o el NADP^+ supone un peligro potencial para la célula y debe disponer de mecanismos para su control efectivo a corto plazo. Todas las ALDHs no fosforilantes catalizan reacciones irreversibles, pero en general están participando en la destoxicación de aldehídos que se encuentran en pequeñas cantidades, ya sean de origen endógeno, es decir producidos por el metabolismo, o exógeno, es decir contaminantes ambientales o resultado del metabolismo de fármacos. Por ello no representan un peligro real para la célula. Sin embargo, las funciones fisiológicas de las BADHs que participan en la síntesis del osmoprotector glicina betaina o en la degradación de la colina—cuando ésta es la única fuente de carbono, nitrógeno y energía para la

bacteria—implican un consumo elevado de su sustrato aldehído y con el del nucleótido oxidado. Esto puede llevar a una disminución importante de las concentraciones de NAD(P)^+ , o incluso a su agotamiento, si la reacciones que regeneran a los nucleótidos oxidados a partir de sus formas reducidas poseen, en conjunto, una velocidad inferior a la de la BADH. Particularmente en el caso del NAD^+ esta situación sería extremadamente peligrosa. Es por ello de suma importancia que las BADHs tengan mecanismos que frenen su actividad en condiciones en las que exista el riesgo de llegar a una concentración de NAD^+ tan baja que pueda comprometer la viabilidad de la célula. La inhibición o inactivación por NADH es el freno más importante que se le puede poner a esta reacción irreversible para evitar el agotamiento del NAD^+ , ya que el otro producto de la reacción, la GB, no inhibe aun a concentraciones muy elevadas [19,27,33]. La incapacidad del producto ácido de inhibir la reacción catalizada por las BADHs es una característica común de las ALDHs [57-59], cuyas bases estructurales aún no están claras.

Las concentraciones de NADH reducido en la mayoría de las células son sólo un porcentaje pequeño de las de NAD^+ [60,61], por lo que a no ser que la afinidad de la enzima por el NADH sea mucho mayor que por el NAD^+ —lo que no ocurre en las BADHs [62]—no podría funcionar como un inhibidor muy efectivo hasta que la concentración de NAD^+ disminuyera hasta niveles que serían peligrosos. Es necesario evitar esta posibilidad, por lo que se requiere que el NADH sea capaz de inhibir en forma efectiva si su concentración aumenta aun cuando la del NAD^+ siga siendo alta y, sobre todo, es necesario que el NADH sea capaz de detener la reacción si ésta está ocurriendo a una velocidad muy alta. Esto es especialmente importante para el caso de la PaBADH cuya k_{cat} es de las más altas de las ALDHs estudiadas hasta la fecha [33]. Este objetivo se logra por medio de los dos mecanismos descritos, la inhibición incompetitiva y la inactivación de la enzima durante la reacción cuando los sustratos están cercanos a la saturación.

Las condiciones fisiológicas en las que la actividad de las BADHs de *P. aeruginosa* y del cloroplasto se desarrolla son bastante diferentes y ello exige diferencias en la regulación de su actividad. Como discutiremos a continuación, nuestros estudios hasta el momento nos han permitido conocer y entender en parte cómo las propiedades funcionales y estructurales de estas enzimas se modifican y adaptan para que aun catalizando la misma reacción se integren a diferentes contextos metabólicos.

En el caso de la reacción NAD^+ -dependiente de la PaBADH, el componente incompetitivo de la inhibición del NADH frente al NAD^+ así como inactivación producida por NADH probablemente no tengan lugar bajo condiciones aeróbicas normales en las que haya un aporte suficiente de oxígeno, dado que la bacteria puede regenerar el NAD^+ vía cadena respiratoria. Pero pueden constituir una importante válvula de seguridad cuando la regeneración del NAD^+ esté comprometida por escasez de oxígeno —que obliga a la bacteria a usar una cadena de transporte de electrones más lenta— o por una velocidad muy alta de la reacción. En cuanto a la reacción NADP^+ -dependiente no existe tal riesgo y como además los niveles de NADP^+ y NADPH son muy similares en células procarióticas [63], el NADPH puede ser un inhibidor efectivo de la reacción. Es quizás por estas razones el que en la PaBADH la inhibición del NADPH es competitiva con respecto al NADP^+ [33]. Es interesante que esta enzima tiene una afinidad por el NADP^+ , medida por la K_d , dos veces superior a la que tiene por el NAD^+ , por lo que aun cuando la concentración del NADP^+ sea menor que la del NAD^+ , la reacción NADP^+ -dependiente puede llegar a constituir una proporción significativa de la NAD^+ -dependiente.

En el cloroplasto la poza del par NAD^+/NADH no está en equilibrio con la del par $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, por lo que los niveles de NAD^+ no se pueden regular mediante las reacciones fotosintéticas de asimilación del carbono. Por ello, en las BADHs de cloroplasto sí tiene una gran importancia la regulación a corto plazo por el NADH para evitar el agotamiento del NAD^+ intracloroplástico. Pero el riesgo de inhibir a la chBADH es que se acumule BA—que está siendo producido activamente bajo condiciones de estrés osmótico por la colina monooxigenasa [64]—ya que este aldehído es altamente tóxico para la planta [36]. La regulación a corto plazo de la

actividad de las chBADHs debe ser tal que evite el agotamiento del NAD⁺ y al mismo tiempo evite la acumulación de BA. Probablemente ésta es la razón por la que—además de las peculiares propiedades cinéticas de la BADH bacteriana ya mencionadas—la enzima de cloroplasto presenta una inhibición parcial por su sustrato BA [25] que conlleva una inhibición parcial por el NADH. La inhibición por BA se demostró que se debe al establecimiento de una ruta alterna de liberación del NADH más lenta que la ruta que opera a bajas concentraciones del aldehído [25]. A concentraciones altas, la BA puede unirse al complejo Enzima-NADH formando un complejo ternario no productivo Enzima-NADH-BA del cual puede liberarse el NADH, lo que causa que tanto la inhibición por sustrato como por NADH sea parcial. Creemos que tanto la inhibición parcial por altas concentraciones de BA como la inhibición parcial por NADH son de gran importancia para la enzima de cloroplasto, ya que probablemente en este organelo las reacciones de regeneración del NAD⁺ son más lentas que las que existen en *P. aeruginosa* y se puede por tanto alcanzar concentraciones tan altas de NADH que de no existir la ruta alterna de la reacción producirían una inhibición total y la acumulación de BA, con los efectos tóxicos que esto conllevaría.

Comentarios finales

Los mecanismos de regulación a corto plazo aquí descritos de la actividad de las BADHs por el nucleótido reducido—en conjunción con la regulación por la BA en el caso de la enzima de cloroplasto—no han sido descritos hasta la fecha para otras enzimas. Estos mecanismos se basan en propiedades estructurales que probablemente comparten muchas otras ALDHs. En el caso de las BADHs la regulación a corto plazo responde a claras necesidades metabólicas.

Agradecimientos

Los trabajos de investigación mencionados del grupo al que pertenecen los autores fueron realizados con el apoyo financiero de CONACYT y DGAPA-UNAM a proyectos de RAMC. Los autores agradecen el valioso apoyo técnico de Carlos Mújica-Jiménez en los trabajos de investigación de nuestro grupo aquí descritos.

Referencias

1. Segel, H. I. (1993) *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. Wiley Classics Library Edition, Wiley-Interscience Publication, USA
2. Cornish-Bowden, A. (1999) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. 1st Ed., Portland Press LTD. UK
3. Rothschild, H. A., Guzman-Barron, E. S. (1954) *J. Biol. Chem.* **209**, 511-523
4. Nagasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y., Ogata, K. (1976) *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1743-1749
5. Weretilnyk, E. A., Hanson, A. D. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 56-63
6. Falkenberg, P., Strøm, A. R. (1990) *Biochem. Biophys. Acta*, **1034**, 253- 259
7. Valenzuela-Soto, E. M., Muñoz-Clares, R. A. (1994) *J. Plant Physiol.* **143**, 145-152
8. Guzmán-Partida, A. M., Valenzuela-Soto, E. M. (1998) *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* **119**, 485-491
9. Klein, J. R., Handler, P. (1942) *J. Biol. Chem.* **144**, 537-539
10. Julián-Sánchez, A., Viveros-Rosas, H., Martínez-Castilla, L. P., Velasco-García, R., Muñoz-Clares, R. A. (2007) *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*. Weiner, H. (ed). Indianapolis, USA
11. Petronini, P. G., De Angelis, E. M., Borghetti, P., Borghetti, A. F., Wheeler, K. (1992) *Biochem. J.*, **282**, 69-73
12. Vojtěchová, M., Hanson, A. D., Muñoz-Clares, R. A., (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **337**, 81-88
13. Boch, J., Kempf, B., Schmid, R., Bremer, E. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 5121-5129
14. Smith, L. T., Smith, G. M. (1988) *J. Bacteriol.*, **171**, 4714-4717
15. Velasco-García, R., Villalobos, M. A., Ramírez-Romero M. A., Mújica-Jiménez, C., Iturriaga, G., Muñoz-Clares, R. A. (2006), *Arch. Microbiol.* **185**, 14-22
16. Ambroziak, W., Pietruszko, R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13011-13018

17. Lin, S. W., Chen, J. C., Hsu, L. C., Hsieh, C. L., Yoshida, A. (1993) *Genomics*, **34**, 376-380
18. Vaz, F. M., Fouchier, S. W., Ofman, R., Sommer, M., Wanders, R. J. A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 7390-7394
19. Figueroa-Soto, C. G., Valenzuela-Soto, E. M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 596-603
20. Velasco-García, R., Chacón-Aguilar, V. M., Hervert-Hernández, D., Muñoz-Clares, R. A. (2003) *Chem. Biol. Interact.* **143-144**, 149-158
21. Valenzuela-Soto, E. M., Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Gaviria-González, L. L., Muñoz-Clares, R. A. (2003) *Chem. Biol. Interact.* **143-144**, 139-148
22. Muñoz-Clares, R. A., González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C., Contreras-Díaz, L. (2003) *Chem. Biol. Interact.* **143-144**, 129-137
23. Muñoz-Clares, R. A., Mújica-Jiménez, C. (2001) *Chem. Biol. Interact.* **130-132**, 71-80
24. Legaria, J., Rajsbaum, R., Muñoz-Clares, R. A., Villegas-Sepúlveda, N., Simpson, J., Iturriaga, G. (1998) *Gene* **218**, 69-76
25. Vojtechová, M., Rodríguez-Sotres, R., Valenzuela-Soto, E. M., Muñoz-Clares, R. A. (1997) *Biochim. Biophys. Acta.* **1341**, 49-57
26. Muñoz-Clares, R. A., Vojtechová, M., Mújica-Jiménez, C., Rodríguez-Sotres, R. (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.* **414**, 261-268
27. Valenzuela-Soto, E. M., Muñoz-Clares, R. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23818-23823. Erratum in: *J. Biol. Chem.* (1994) **269**, 4692
28. Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G., Muñoz-Clares R. A. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 1292-1300
29. González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C., Muñoz-Clares, R. A. (2009) *Chem. Biol. Interact.* **178**, 64-69
30. Velasco-García, R., Zaldívar-Machorro, V. J., Mújica-Jiménez, C., González-Segura, L., Muñoz-Clares, R. A. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 408-415
31. González-Segura, L., Velasco-García, R., Rudiño-Piñera, E., Mújica-Jiménez, C., Muñoz-Clares, R. A. (2005) *Biochimie.* **87**, 1056-1064
32. González-Segura, L., Velasco-García, R., Muñoz-Clares, R. A. (2002) *Biochem. J.* **361**, 577-585
33. Velasco-García, R., González-Segura, L., Muñoz-Clares, R. A. (2000) *Biochem. J.* **352**, 675-683
34. Hölstrom, K. O., Somersalo, S. A., Mandal, A., Palva, T. E., Welin, B. (2000) *J. Exp. Bot.* **51**, 177-185
35. Yilmaz, J. L., Bulow, L. (2002) *Biotechnol. Prog.* **18**, 1176-1182
36. Rathinasabapathi, B., McCue, K. F., Gage, D. A., Hanson, A. D. (1994) *Planta* **193**, 155-162
37. Jia, G. X., Zhu, Z. Q., Chang, F. Q., Li, Y. X. (2002) *Plant. Cell. Reports* **21**, 141-146
38. Rontein, D., Basset, G., Hanson, A. D. (2002) *Metabolic. Eng.* **4**, 49-56
39. Li, Q. L., Gao, X. R., Yu, X. H., Wang, X. Z., An, L. J. (2003) *Biotech. Letters* **25**, 1431-1436
40. Mori, N., Yoshida, N., Kitamoto, Y. (1992) *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 352-356
41. Sage, A. E., Vasil, A. I., Vasil, M.L. (1997) *Mol. Microbiol.* **23**, 43-56.
42. Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jörnvall, H., Eklund, H. (1998) *Protein Sci.* **7**, 2106-2117
43. González-Segura, L., Rudiño-Piñera, E., Muñoz-Clares, R. A., Horjales, E. (2009) *J. Mol. Biol.* **385**, 542-557
44. Steinmetz, C.G., Xie, P., Weiner, H., and Hurley, T.D. (1997) *Structure* **5**, 701-711
45. Vallari, R. C., Pietruszco, R. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **212**, 9-19
46. Plapp, B.V. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 1727-1735
47. Plapp, B. V., Mitchell, J. L., Berst, K.B. *Chem. Biol. Interact.* **130**, 445-456
48. Ohshima, T., Misono, H., Soda, K. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 5719-5725.
49. Cleland, W. W. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 104-137
50. Rossmann, M. G., Moras, D., Olsen, K. W. (1974) *Nature* **250**: 194-199
51. 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., Wang, B. C. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 317-326
52. Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, S., Azza, S., Branlant G., Aubry, A. (1999) *J. Mol. Biol.* **290**, 161-173
53. Pérez-Miller, S. J., Hurley, T. D. (2003) *Biochemistry* **42**, 7100-7109
54. Tsybovski, Y., Donato, H., Krupenko, N.I., Davies, C., Krupenko, S.A. (2007) *Biochemistry* **46**, 2917-2929
55. Van Eys, J., Kaplan, N.O. (1957) *J. Biol. Chem.* **228**, 305-314
56. Segal, H., Boyer, P.D. (1953) *J. Biol. Chem.* **204**, 265-281
57. Bradbury, S. L., Jakoby, W. B. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 1834-1840
58. Satya-Narayan, V., Nair, P.M. (1990) *Plant Sci.* **71**, 159-166
59. Feldman, R.I., Weiner, H. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 267-272
60. Igamberdiev, A. U., Bykova, V., Lea, P. J., Gardeström, P. (2001) *Physiol. Plant.* **111**, 427-438
61. Hampp, R., Goller, M., Füllgraf, H. (1984) *Plant Physiol.* **75**, 1017-1021

62. Schafer, F., Buettner, G. (2001). *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1191–212
63. Appleman, J.R., Beard, W.A., Delcamp, T.J., Prendergast, N.J., Freisheim, J.H., Blakey, R.L. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 2740-2748.
64. Burnet, M., Lafontaine, P. J., Hanson, A. D. (1995), *Plant Physiol.* **108**, 581-588
65. Al-Karadaghi, S., Cedergren-Zeppezauer, E.S. (1994) *Acta Crystallogr.* **50**, 793-807
66. Di-Costanzo, L., Gomez, G.A., Christanson, D.W. (2007) *J. Mol. Biol.* **366**, 481-493
67. DeLano, W. L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System on the World Wide Web. <http://www.pymol.org/>

Semblanza de la Dra. Rosario A. Muñoz Clares



Nació en Granada, España, en cuya Universidad realizó sus estudios de licenciatura y doctorado obteniendo las máximas calificaciones. Después de estancias postdoctorales en las universidades de Kent y Manchester, Inglaterra, se incorporó en 1981 al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, en el que actualmente es Profesora Titular C definitiva de tiempo completo. Es nivel “D” del PRIDE, investigadora Nivel III del Sistema Nacional de Investigadores y tuvo el nombramiento de Catedrático UNAM, Nivel II. Ha realizado estancias de investigación en la Universidad Autónoma de Madrid y en la Universidad de Vanderbilt, en Nashville, EUA. Su quehacer científico, que versa sobre la caracterización cinética y molecular de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas, así como

el estudio de la relación estructura-función de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de plantas y bacterias, se ha publicado en 54 artículos científicos internacionales y 9 nacionales. Cuenta con 400 citas a sus publicaciones. Ha presentado 43 trabajos en congresos internacionales y 67 en congresos nacionales. En la Universidad Nacional Autónoma de México ha impartido 79 cursos curriculares de licenciatura y posgrado; además, ha asesorado o está asesorando a 15 alumnos de licenciatura y 23 de posgrado y ha formado parte del Comité Tutoral de 67 alumnos de diferentes posgrados nacionales. La comunidad científica la ha invitado a impartir 19 conferencias en diferentes congresos nacionales e internacionales. Dentro de la UNAM se ha desempeñado o desempeña como Coordinadora de la Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas en la Facultad de Química; Jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química; miembro de la Comisión Dictaminadora y del PRIDE de los Institutos de Ecología, Fisiología Celular, Biotecnología, e Investigaciones Biomédicas y como consejera propietaria del CAABYs por la Facultad de Química. Fuera de la UNAM, ha pertenecido o pertenece a diferentes Comités de Evaluación como la Comisión de Premios de la Academia Mexicana de Ciencias, la Comisión Evaluadora Externa del Centro de Investigación Científica de Yucatán y la Comisión Dictaminadora del Centro de Investigación Científica de Yucatán y del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, y al Comité de Acreditación de Evaluadores del Área VI del CONACYT, entre otros.