



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

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

**CLONACIÓN, SOBREEXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y  
ESTRUCTURAL DE LA ENZIMA AMINOALDEHÍDO DESHIDROGENASA PA5312  
(PaKauB) DE *Pseudomonas aeruginosa***

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**Química Industrial YUDY VANESA CARDONA CARDONA**

**Tutora: Doctora ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO DE 2017**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

CLONACIÓN, SOBREEXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y  
ESTRUCTURAL DE LA ENZIMA AMINOALDEHÍDO DESHIDROGENASA PA5312  
(PaKauB) DE *Pseudomonas aeruginosa*

T E S I S  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Química Industrial YUDY VANESA CARDONA CARDONA



Posgrado  
Ciencias  
Químicas

Ciudad de México, Junio 2017.

## **JURADO**

**PRESIDENTE** Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

**VOCAL** Dr. José Ignacio Regla Contreras

**VOCAL** Dr. Horacio Reyes Vivas

**VOCAL** Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig

**SECRETARIO** Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha

Tutor principal

**Dra. Rosario A. Muñoz Clares**

---

Sustentante

**Q. I. Yudy Vanesa Cardona Cardona**

---

## EVENTOS ACADÉMICOS

XXXI CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA. “Cloning, Expression and Kinetics of the Enzyme Amino Aldehyde Dehydrogenase PA5312 of *Pseudomonas aeruginosa*”. Sesión de cartel: 07/11/2016. Aguascalientes, México.

XI COLOQUIO INVERNAL DE INVESTIGACIÓN. “Especificidad de sustrato de la enzima KauB de *Pseudomonas aeruginosa*”. Sesión ponencia: 12/01/2017. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a la Facultad de Química y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por la formación académica brindada.

Al Programa de Apoyo al Posgrado y la Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), UNAM, por el apoyo financiero otorgado en el proyecto IN220317.

A la Facultad de Química, UNAM, por el apoyo económico otorgado a través del proyecto PAIP (5000-9119)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de posgrado otorgada bajo el número de becario 583716, así como por el apoyo económico otorgado a través del proyecto de infraestructura 212513.

A la Red de Estructura, Función y Evolución de Proteínas (REFEP) por el apoyo económico al asistir al “XXXI Congreso Nacional de Bioquímica” en Aguascalientes, Aguascalientes.

A la Unidad de Servicios para la Industria y la Investigación (USAII), Facultad de Química, UNAM, y a la M. en C. Rosa Isela del Villar Morales por los servicios de RMN prestados.

Al sincrotrón Advanced Photon Source, Argonne, Illinois, EUA, por el acceso a sus instalaciones

A la Dra. Rosario Muñoz Clares, por permitirme hacer parte de su grupo de investigación, por su apoyo y sus enseñanzas durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado, por las observaciones y sugerencias para mejorar la versión final del documento.

Al Biol. Carlos Mújica Jiménez, por su valioso apoyo y asesoría técnica en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Lilian González Segura, por la determinación de la estructura cristalográfica de la enzima.

Al Dr. José Ignacio Regla y al Dr. Alfonso Sebastián Lira, por su ayuda con la síntesis de los aldehídos.

Al M. en C. Javier Carrillo Campos, por su ayuda y enseñanza en la parte de biología molecular de este trabajo.

A los compañeros del Laboratorio de Estructura, Función y Evolución de Proteínas (LEFEP), por su ayuda y sus comentarios en la realización de este proyecto y, sobre todo, por los momentos compartidos y por hacerme sentir como en casa.

**DEDICATORIA**

*A mis padres, Gerardo Cardona L. y María Doris Cardona V., a mi hermana,  
Yina Maritza Cardona C., a mi sobrino, Gabriel Morales Cardona y a mi  
querido Julián Hernández Herrera.*

*Gracias por su amor y confianza.*



## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>15</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>17</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>19</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>21</b>
<i>II.1 Generalidades de las enzimas aldehído deshidrogenasas (ALDHs) y reacción que catalizan</i>	<b>21</b>
<i>II.2. Mecanismo químico de las ALDHs</i>	<b>24</b>
<i>II.3. Mecanismo cinético de las ALDHs</i>	<b>25</b>
<i>II.4. Relaciones evolutivas de las enzimas aminoaldehído deshidrogenasas (AMADHs)</i>	<b>27</b>
<i>II.5. Especificidad por el sustrato aldehído y la coenzima de las AMADHs</i>	<b>28</b>
<i>II.5.1 Especificidad por el sustrato aldehído</i>	<b>28</b>
<i>II.5.2 Especificidad por la coenzima</i>	<b>30</b>
<i>II.6. Funciones fisiológicas de las AMADHs bacterianas</i>	<b>31</b>
<i>II.7. Estructura tridimensional de las AMADHs bacterianas</i>	<b>33</b>
<i>II.8. Papel fisiológico de la AMADH PaKauB de Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>36</b>
<i>II.9. Generalidades de la bacteria P. aeruginosa</i>	<b>40</b>
<i>II.9.1 Patogenicidad</i>	<b>41</b>
<i>II.9.2 Resistencia a antibióticos</i>	<b>42</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b>	<b>43</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
<i>IV.1. Objetivo general</i>	<b>44</b>
<i>IV.2. Objetivos particulares</i>	<b>44</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>45</b>
<i>V.1. Estrategia experimental</i>	<b>45</b>
<i>V.2. Clonación del gen PA5312 (PakauB)</i>	<b>46</b>
<i>V.3. Sobreexpresión del gen PakauB y producción de la enzima recombinante PaKauB en células de E. coli</i>	<b>49</b>

<i>V.4. Purificación a homogeneidad de la enzima PaKauB</i>	<b>51</b>
<i>V.5. Determinación del estado oligomérico de la enzima PaKauB</i>	<b>52</b>
<i>V.6. Obtención de los aldehídos libres a partir de sus derivados dietilacetálicos</i>	<b>53</b>
<i>V.7. Síntesis del dietilacetal del cloruro de 4-trimetilamoniobutiraldehído</i>	<b>53</b>
<i>V.8. Ensayo de actividad y determinación de los parámetros cinéticos aparentes <math>V</math>, <math>K_m</math> y <math>V/K_m</math> para sustratos aldehídos</i>	<b>54</b>
<i>V.9. Determinación de la estructura tridimensional de la enzima PaKauB por cristalografía y difracción de rayos X</i>	<b>56</b>
<i>V.10. Acoplamiento molecular (“docking”) de los posibles sustratos aldehídos con la enzima PaKauB</i>	<b>58</b>
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>60</b>
<i>VI.1 Clonación del gen PA5312 (PakauB)</i>	<b>60</b>
<i>VI.2. Sobreexpresión del gen PakauB y producción de la enzima recombinante PaKauB en células de E. coli</i>	<b>62</b>
<i>VI.3. Purificación a homogeneidad de la enzima PaKauB</i>	<b>63</b>
<i>VI.4. Determinación del estado oligomérico de la enzima PaKauB</i>	<b>65</b>
<i>VI.5. Determinación de los parámetros cinéticos aparentes <math>V</math>, <math>K_m</math> y <math>V/K_m</math> para sustratos aldehídos</i>	<b>66</b>
<i>VI.6 Determinación del mecanismo cinético de PaKauB usando ABAL como sustrato</i>	<b>71</b>
<i>VI.6.1 Patrones de velocidad inicial</i>	<b>71</b>
<i>VI.6.2 Patrones de inhibición por producto</i>	<b>73</b>
<i>VI.7. Determinación de la estructura tridimensional de la enzima PaKauB por cristalografía y difracción de rayos X</i>	<b>81</b>
<i>VI.8. Acoplamiento molecular (“docking”) de los posibles sustratos aldehídos con la enzima PaKauB</i>	<b>87</b>
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>94</b>
<i>VII.1. Posibles papeles fisiológicos de la enzima PaKauB de acuerdo a los parámetros cinéticos obtenidos con los</i>	

<i>sustratos aldehídos</i>	<b>94</b>
<i>VII.2. El mecanismo cinético de PaKauB usando ABAL como sustrato es el Bi Bi Ordenado en estado estacionario propuesto para otras ALDHs</i>	<b>100</b>
<i>VII.3. La estructura tridimensional de la enzima PaKauB explica la afinidad relativa por sus sustratos</i>	<b>106</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>108</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS</b>	<b>109</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>111</b>
<b>XI. APÉNDICE</b>	<b>131</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura tridimensional de las enzimas ALDHs	<b>35</b>
<b>Figura 2.</b> Rutas metabólicas en las que participa la enzima <i>PaKauB</i>	<b>38</b>
<b>Figura 3.</b> Mapa del vector pET28b(+) en el que se clonó el gen <i>PakauB</i>	<b>48</b>
<b>Figura 4.</b> Gel de agarosa mostrando el resultado de la extracción de DNA genómico de la bacteria <i>P. aeruginosa</i>	<b>60</b>
<b>Figura 5.</b> Gel de agarosa mostrando los productos de la amplificación mediante PCR del gen PA5312 ( <i>PakauB</i> )	<b>61</b>
<b>Figura 6.</b> Gel de agarosa mostrando los productos de la digestión del vector pET28b(+) antes de insertar el gen <i>PaKauB</i> usando las enzimas <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>	<b>62</b>
<b>Figura 7.</b> Gel SDS-PAGE mostrando la producción de la enzima <i>PaKauB</i> recombinante en células de <i>E. coli</i> BL21 Rosetta DE3 transformadas e inducidas	<b>63</b>
<b>Figura 8.</b> Gel SDS-PAGE mostrando el resultado de la purificación de la enzima <i>PaKauB</i>	<b>64</b>
<b>Figura 9.</b> Perfil de elución de la enzima <i>PaKauB</i> de la cromatografía de exclusión molecular	<b>66</b>
<b>Figura 10.</b> Curvas de saturación de la enzima <i>PaKauB</i> con aldehídos como sustrato variable	<b>68</b>
<b>Figura 11.</b> Curvas de saturación de la enzima <i>PaKauB</i> con NAD <sup>+</sup> como sustrato variable	<b>69</b>
<b>Figura 12.</b> Patrones de velocidad inicial de la reacción de la enzima <i>PaKauB</i> con ABAL	<b>72</b>
<b>Figura 13.</b> Patrones de inhibición por NADH con respecto a NAD <sup>+</sup> de la	

enzima <i>PaKauB</i>	75
<b>Figura 14.</b> Patrones de inhibición por NADH con respecto a ABAL de la enzima <i>PaKauB</i>	76
<b>Figura 15.</b> Curvas de saturación de la enzima <i>PaKauB</i> con ABAL a NAD <sup>+</sup> constante	78
<b>Figura 16.</b> Efecto del NADH sobre la inhibición por sustrato de la enzima <i>PaKauB</i> por ABAL	80
<b>Figura 17.</b> Representación como lazos de la estructura tridimensional de la enzima <i>PaKauB</i> obtenida por cristalografía y difracción de Rayos X	83
<b>Figura 18.</b> Sitio activo de la enzima <i>PaKauB</i>	84
<b>Figura 19.</b> Sitio de unión de la coenzima NAD <sup>+</sup> y NADP <sup>+</sup> de la enzima <i>PaKauB</i>	86
<b>Figura 20.</b> Acoplamiento molecular (“docking”) de aldehídos sustratos en el sitio activo de la enzima <i>PaKauB</i>	88
<b>Figura 21.</b> Superposición de la estructura del túnel de entrada del aldehído de la enzima <i>PaKauB</i> con el de enzimas que presentan actividad BADH	91
<b>Figura 22.</b> Simulación de la posición de BAL y TMABAL en el túnel de entrada del aldehído en la enzima <i>PaKauB</i>	92
<b>Figura 23.</b> Rutas metabólicas en las que proponemos que podría participar la enzima <i>PaKauB</i> con base a los resultados obtenidos en este trabajo	98

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Reacción general catalizada por las ALDHs	<b>21</b>
<b>Esquema 2.</b> Mecanismo químico de la reacción catalizada por las enzimas ALDH hidrolíticas	<b>25</b>
<b>Esquema 3.</b> Mecanismo cinético Bi Bi Ordenado en estado estacionario propuesto para las ALDHs	<b>26</b>
<b>Esquema 4.</b> Estrategia experimental utilizada	<b>45</b>
<b>Esquema 5.</b> Mecanismo cinético propuesto para la enzima <i>PaKauB</i> a altas concentraciones de aldehído	<b>104</b>
<b>Esquema 6.</b> Mecanismo alternativo para la enzima <i>PaKauB</i> a altas concentraciones de aldehído	<b>105</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Funciones fisiológicas de las ALDHs	<b>23</b>
<b>Tabla 2.</b> Aldehídos usados como sustratos por enzimas AMADHs bacterianas y su participación en diferentes rutas metabólicas	<b>29</b>
<b>Tabla 3.</b> Resultados de la purificación de la enzima <i>PaKauB</i> mediante cromatografía de afinidad	<b>64</b>
<b>Tabla 4.</b> Parámetros cinéticos aparentes de la enzima <i>PaKauB</i> obtenidos con diferentes aldehídos	<b>70</b>
<b>Tabla 5.</b> Parámetros cinéticos de la enzima <i>PaKauB</i> obtenidos con ABAL como sustrato	<b>73</b>
<b>Tabla 6.</b> Constantes de inhibición por el producto NADH frente a NAD <sup>+</sup> y ABAL de la reacción NAD <sup>+</sup> -dependiente de la enzima <i>PaKauB</i>	<b>77</b>
<b>Tabla 7.</b> Constantes cinéticas aparentes de la enzima <i>PaKauB</i> estimadas en cinéticas de saturación por ABAL en ausencia y en presencia de NADH 100 μM	<b>79</b>
<b>Tabla 8.</b> Estadística de los cristales y del refinamiento del modelo de la estructura tridimensional de la enzima <i>PaKauB</i>	<b>82</b>

ABREVIATURAS

<b>ABAL</b>	4-Aminobutiraldehído
<b>ALDHs</b>	Aldehído deshidrogenasas
<b>AMADHs</b>	Aminoaldehído deshidrogenasas
<b>APAL</b>	3-Aminopropionaldehído
<b>BADH</b>	Betaína aldehído deshidrogenasa
<b>BAL</b>	Betaína aldehído
<b>CTAB</b>	Bromuro de hexadecil trimetilamonio
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>GABAL</b>	Guanidinobutiraldehído
<b>GB</b>	Glicina betaína
<b>GcBADH</b>	Betaína aldehído deshidrogenasa de <i>Gadus callarias</i>
<b>GLUABAL</b>	4-Glutamil-4-aminobutiraldehído
<b>3-HPAL</b>	3-Hidroxipropionaldehído
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>LAL</b>	2-hidroxipropionaldehído (lactaldehído)
<b>LB</b>	Medio Luria Bertani
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PaBADH</b>	Betaína aldehído deshidrogenasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PakauB</b>	Gen PA5312 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PaKauB</b>	Aminoaldehído deshidrogenasa codificada por el gen PA5312 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>SaBADH</b>	Betaína aldehído deshidrogenasa de <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>SoBADH</b>	Betaína aldehído deshidrogenasa de <i>Spinacia oleracea</i>
<b>PAL</b>	Propionaldehído
<b>pET28b(+)-PakauB</b>	Vector de expresión conteniendo el gen Pa5312 ( <i>PakauB</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio



## ABREVIATURAS

<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
<b>SEC</b>	Cromatografía de exclusión molecular
<b>TMABAL</b>	4-Trimetilaminobutiraldehído
<b>YdcW</b>	Aminoaldehído deshidrogenasa de <i>E. coli</i>

## RESUMEN

Las aminoaldehído deshidrogenasas catalizan la reacción de oxidación irreversible dependiente de  $\text{NAD(P)}^+$  de aldehídos que tienen un grupo amino primario o un grupo trimetilamino cuaternario. Filogenéticamente, estas enzimas están agrupadas en cinco familias: ALDH9, ALDH10, ALDH25, ALDH26 y ALDH27. El patógeno humano oportunista *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 tiene tres enzimas ALDH27, una de las cuales está codificada por el gen PA5312 (*PakauB*). Por análisis genómicos se ha encontrado que esta enzima está involucrada en el catabolismo de arginina y de poliaminas; sin embargo, aún no ha sido caracterizada cinética o estructuralmente. En este trabajo de tesis, clonamos y sobreexpresamos el gen *PakauB*. Obtuvimos la enzima recombinante *PaKauB*, la purificamos y determinamos que es un homotetrámero. Su caracterización cinética mostró que utiliza  $\text{NAD}^+$  como coenzima y que no puede usar a la betaína aldehído como sustrato. Del resto de los sustratos probados, el trimetilaminobutiraldehído es el mejor, seguido por el 4-aminobutiraldehído, 3-aminopropionaldehído, 2-hidroxiopropionaldehído (lactaldehído) y propionaldehído, en este orden. Estos resultados sugieren la participación de esta enzima en las rutas de degradación reportadas y probablemente en la ruta de degradación del metilglioxal y en una nueva ruta de degradación de lisina. Los estudios de velocidad inicial y de inhibición por producto mostraron que el mecanismo cinético de la *PaKauB* es Bi Bi ordenado en estado estacionario. Se determinó la estructura tridimensional de la enzima y con ella se realizaron estudios de acoplamiento molecular con los diferentes sustratos aldehídos. Se predice que el residuo aromático Phe467 ayuda a la unión del aminoaldehído mediante interacciones catión- $\pi$  con su grupo amino. El residuo Asp459 situado en el túnel de entrada del aldehído está expuesto al solvente estorbando la entrada al sitio activo de

## RESUMEN

betaína aldehído, lo que explica que este aldehído no sea sustrato de *PaKauB*, que si puede oxidar el trimetilaminobutiraldehído que tiene una cadena alifática más larga. En cuanto a la coenzima usada, los residuos de Glu194 y Tyr223 le confieren especificidad por el  $\text{NAD}^+$ , impidiendo que pueda unir a  $\text{NADP}^+$ .

### I. INTRODUCCIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista humano que constituye un grave problema de salud debido a las infecciones que produce especialmente en pacientes de fibrosis quística y en pacientes inmunodeprimidos (revisado en Mesaros *et al.*, 2007; Savoia, 2014). Debido a la alta resistencia a antibióticos que posee, se hacen necesarios nuevos fármacos contra esta bacteria, razón por la cual ha sido puesta en la lista elaborada por la Organización Mundial de la Salud sobre aquellas bacterias resistentes a los fármacos que representan la mayor amenaza para la salud humana.

*P. aeruginosa* es capaz de crecer en una variedad de compuestos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía tales como colina y sus precursores (Nagasawa *et al.* 1976), arginina (Jann *et al.*, 1988) y algunas poliaminas (agmatina, putrescina, espermidina) (Jann *et al.*, 1988; Chou *et al.*, 2008; Chou *et al.*, 2013). En la degradación de colina participa la enzima betaina aldehído deshidrogenasa (BADH), perteneciente a la familia ALDH9 de las AMADHs que produce glicina betaína (GB), un eficiente osmoprotector que ayuda a la bacteria a contrarrestar las pérdidas de agua cuando *Pseudomonas* se encuentra en ambientes de alta osmolaridad (Velasco-García *et al.*, 2000, 2006; Wargo, 2013), como sucede en los tejidos que infecta (Rennick, B.R. 1981; Pesin y Candia, 1982; Wright y Clements, 1987), en los que además hay abundancia de colina o precursores de colina (Lisa *et al.*, 1974; Kilbourn, 1978 ). La enzima BADH ya ha sido caracterizada cinética y estructuralmente (Nagasawa *et al.* 1976; Velasco-García *et al.* 1999, 2000, 2003, 2006; González-Segura *et al.*, 2009) e incluso se han reportado inhibidores de su actividad (Velasco-García *et al.*, 2003; Zaldívar-Machorro *et al.*, 2011). Estudios recientes en nuestro grupo de investigación han

## INTRODUCCIÓN

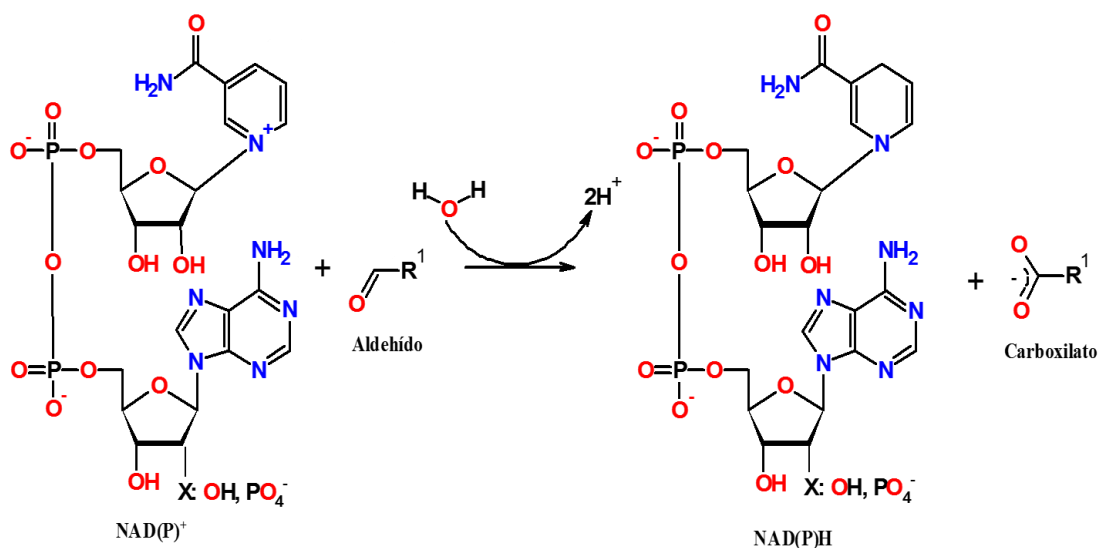
mostrado que la mutación nula de esta enzima no impide el crecimiento de *P. aeruginosa* en colina, lo que sugiere que pudiera existir otra AMADH capaz de oxidar a la betaína aldehído (BAL).

*P. aeruginosa* posee otras tres enzimas AMADHs, pertenecientes a la familia ALDH27, una de ellas codificada por el gen PA5312 (*PakauB*), la cual por estudios genómicos se ha encontrado que participa en el catabolismo de arginina y de poliaminas (putrescina, agmatina, espermidina) oxidando el 4-aminobutiraldehído (ABAL), 4-glutamilaminobutiraldehído (4-GLUABAL) y guanidinobutiraldehído (4-GABAL) (Jann *et al.*, 1988; Chou *et al.*, 2008; Chou *et al.*, 2013). Dada la importancia de estas rutas, consideramos que la enzima *PaKauB* es importante para la defensa y supervivencia de la bacteria y que, incluso, podría ser un blanco potencial de fármacos. Además, esta enzima pudiera oxidar a BAL, permitiendo así el uso de colina por la bacteria. Por todo ello, puesto que a la fecha *PaKauB* no ha sido caracterizada cinética ni estructuralmente, en este trabajo de tesis nos propusimos obtenerla en forma recombinante, realizar su caracterización cinética y estructural, para así determinar su especificidad por el sustrato aldehído y las bases estructurales de esta especificidad, e inferir su relevancia fisiológica.

II. ANTECEDENTES

*II.1 Generalidades de las enzimas aldehído deshidrogenasas (ALDHs) y reacción que catalizan*

Las enzimas aldehído deshidrogenasas (ALDHs, EC 1.2.1) participan en la oxidación de aldehídos a sus ácidos carboxílicos correspondientes utilizando el nucleótido de nicotinamida y adenina (NAD<sup>+</sup>) o el nucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (NADP<sup>+</sup>) como coenzima (Jakoby, 1963), aunque la mayoría de las caracterizadas hasta el momento son NAD<sup>+</sup> dependientes (González-Segura *et al.*, 2015). La reacción que catalizan se ilustra en el Esquema 1:



Esquema 1. Reacción general catalizada por las ALDHs.

## ANTECEDENTES

Estas enzimas oxidan una amplia variedad de aldehídos endógenos y exógenos; algunas de ellas poseen una especificidad muy amplia para sustratos aldehídos, mientras que otras presentan una especificidad reducida (Riveros-Rosas *et al.*, 2013). Las ALDHs son enzimas importantes en procesos metabólicos y de detoxificación en los organismos vivos, ya que la mayoría de los aldehídos son tóxicos incluso a niveles bajos debido a su alta reactividad química (Schauenstein *et al.*, 1977; Wood *et al.*, 2007).

De acuerdo a la diversidad de aldehídos alifáticos, aromáticos y/o funcionalizados que estas enzimas usan como sustratos, se conocen varias funciones fisiológicas importantes en las que pueden participar. La Tabla 1 muestra algunos ejemplos de estas funciones fisiológicas.

## ANTECEDENTES

**Tabla 1. Funciones fisiológicas de las ALDHs**

Sustrato	Función fisiológica	Familia	Ref.
Retinaldehído	Síntesis de ácido retinoico	ALDH1 ALDH8	Zhao <i>et al.</i> 1996; Sima <i>et al.</i> , 2009
11-Hidroxitromboxano B2	Catabolismo del tromboxano	ALDH	Westlund <i>et al.</i> , 1994
2-Hidroximuconato semialdehído	Catabolismo de naftaleno	ALDH	Nordlund y Shingler, 1990
Acetaldehído	Catabolismo de etanol	ALDH2	Weiner y Wang, 1994; Ho y Weiner, 2005
4-Hidroxi-2,3-(E)-nonenal Aldehídos aromáticos y alifáticos	Destoxificación de lipoperóxidos	ALDH3	Luckey y Petersen. 2001
$\gamma$ -Glutamato-semialdehído	Conversión de glutamato a prolina y síntesis de prolina	ALDH4 ALDH19	Valle <i>et al.</i> , 1979; Kramer <i>et al.</i> , 1988
Succinato semialdehído	Degradación de ácido aminobutírico (GABA)	ALDH5	Cozzani <i>et al.</i> , 1980
Metilmalonato semialdehído	Catabolismo de valina y pirimidina	ALDH6	Chambliss <i>et al.</i> , 2000.
$\alpha$ -aminoadípico semialdehído	Catabolismo de lisina y del ácido pipercolico	ALDH7	Mills <i>et al.</i> , 2006; Brocker <i>et al.</i> , 2010
Betaína aldehído	Catabolismo de colina y síntesis de glicina betaína	ALDH9 ALDH10	Nagasawa, <i>et al.</i> , 1976; Hanson <i>et al.</i> , 1985; Arakawa <i>et al.</i> , 1987; Weretilnyk and Hanson, 1989; Falkenberg y Strøm, 1990; Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994; Boch <i>et al.</i> , 1997; Velasco-García <i>et al.</i> , 1999, 2000, 2006; Mandon, <i>et al.</i> , 2003;
Trimetilaminobutiraldehído	Degradación de lisina y síntesis de carnitina	ALDH9 ALDH10 ALDH27	Vaz <i>et al.</i> , 2000; Strijbis <i>et al.</i> , 2010; Wargo, 2013
3-aminopropanal	Síntesis de $\beta$ -alanina	ALDH9 ALDH10 ALDH27	White <i>et al.</i> , 2003
Gliceraldehído-3-fosfato	Catabolismo de carbohidratos	ALDH11	Brunner <i>et al.</i> , 1998
$\Delta$ -1-pirrolina-5-carboxilato	Conversión de prolina y arginina a glutamato	ALDH12	Brocker <i>et al.</i> , 2012

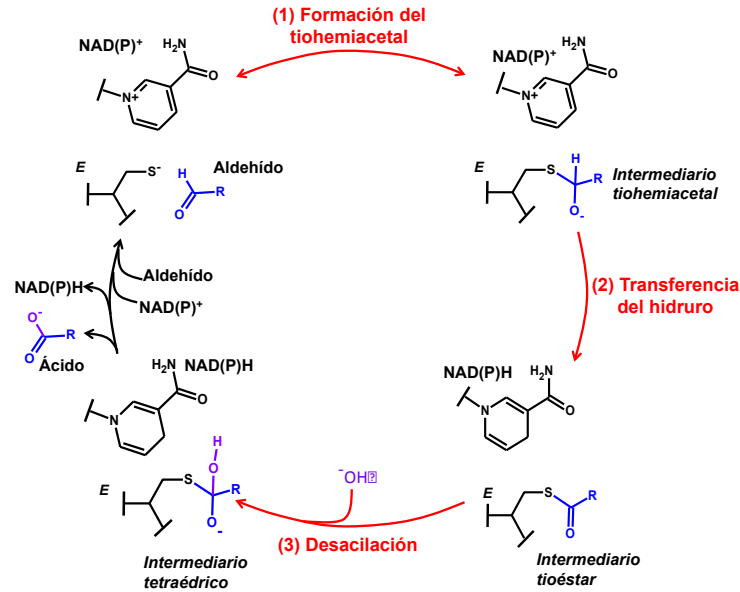
La superfamilia de las ALDHs incluye enzimas ubicuas como lo sugiere su presencia en los genomas de archaeas, eubacterias y eucariontes (Sophos y Vasiliou, 2003; Black y Vasiliou, 2009; Jackson *et al.*, 2011) y pueden presentar comúnmente una estructura tridimensional dimérica o tetramérica, aunque hay algunos casos que reportan estructuras hexaméricas como las  $\Delta$ -pirrolin-5-carboxilato deshidrogenasas bacterianas (Luo *et al.*, 2013). Las ALDHs pueden clasificarse en hidrolíticas, acilantes o fosforilantes, dependiendo de si es una molécula de agua, el grupo tiol de la coenzima A o una molécula de fosfato,



respectivamente, el que realice el ataque nucleofílico al intermediario tioéster que se forma durante la reacción y que es común a los tres tipos de enzimas. El mecanismo químico propuesto para las ALDHs hidrolíticas se describe a continuación:

### *II.2. Mecanismo químico de las ALDHs*

Una vez que se han unido el nucleótido oxidado y el aldehído al sitio activo de la enzima, el mecanismo químico propuesto para la reacción catalizada por las ALDHs hidrolíticas (Feldman y Weiner, 1972, y revisado en Muñoz-Clares *et al.* 2010, y Muñoz-Clares *et al.*, 2011) consiste en una catálisis covalente y ácido-básica que consta de tres pasos principales (Esquema 2): el primero es la formación de un enlace covalente entre la enzima y el aldehído: la cisteína catalítica realiza un ataque nucleofílico al carbono del carbonilo y forma un intermediario tiohemiacetal tetraédrico; en el segundo paso sucede la transferencia del hidruro desde el intermediario tiohemiacetal al nucleótido ( $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ ) cuando el par de electrones del oxianión regenera la hibridación  $\text{sp}^2$  del carbono carbonílico para formar el intermediario tioéster. El tercer paso es una desacilación, en el que se hidroliza el tioéster por un ataque nucleofílico de un ión hidroxilo, proveniente de una molécula de agua catalítica, que libera el grupo tiol de la Cys catalítica y el producto ácido de la reacción. Finalmente, ocurre la liberación de los productos en forma ordenada: primero el ácido y después el nucleótido reducido, regenerándose la enzima libre.



Esquema 2. Mecanismo químico de la reacción catalizada por las enzimas ALDH hidrolíticas.

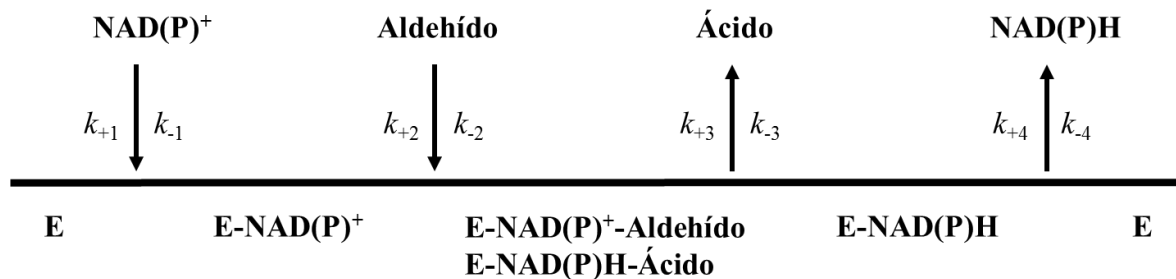
Adaptado de Muñoz-Clares *et al.*, (2011).

### II.3. Mecanismo cinético de las ALDHs

El mecanismo cinético descrito para la mayoría de las ALDHs es un Bi Bi ordenado en estado estacionario (Esquema 3), es decir, el primer sustrato en unirse a la enzima es el NAD(P)<sup>+</sup> y el último producto en disociarse es el NAD(P)H (Feldman y Weiner, 1972, y revisado en Muñoz-Clares *et al.*, 2010). En las BADHs de hojas de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993) y de riñón de cerdo (Figuroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000) se ha propuesto el mismo mecanismo ordenado pero con carácter *Iso*, es decir, después de liberarse el nucleótido reducido se ha propuesto que existe un paso de isomerización de la enzima libre antes de que pueda iniciarse un nuevo ciclo catalítico. Pero aún no se conoce en qué consiste ese paso de isomerización. También, se ha reportado un mecanismo *Ping Pong* para las enzimas BADH del hongo *Cylindrocarpon didymum* (Mori *et al.*, 1980) y de la

## ANTECEDENTES

bacteria *Escherichia coli* (Falkenberg y Strøm, 1990). En este tipo de mecanismo se une el primer sustrato a la enzima que transfiere un grupo a la enzima formando así el primer producto que se libera antes de que entre el segundo sustrato, el que recibe de la enzima el grupo que le transfirió el primer sustrato y se forma así el segundo producto. Sin embargo, este mecanismo cinético no es consistente con el mecanismo químico reportado para las ALDHs en general.



**Esquema 3. Mecanismo cinético Bi Bi Ordenado en estado estacionario propuesto para las ALDHs.** En este esquema se indican las constantes de velocidad asociadas a los pasos de unión y de liberación de sustratos y productos. No se indican las constantes de velocidad asociadas a los pasos químicos de la reacción..

Para varias ALDHs se ha reportado la inhibición de su actividad enzimática por altas concentraciones del sustrato aldehído. Se han propuesto varios mecanismos de inhibición, algunos de los cuales contemplan la formación de un complejo ternario abortivo E-NADH-aldehído del cual se puede liberar el NADH a una velocidad menor que la que se libera del complejo E-NADH (Vojtechová *et al.*, 1997). Otros proponen la unión no productiva del sustrato al sitio de unión de la coenzima (Jang *et al.*, 2015) y otros la unión del aldehído a una región del sitio activo en la cual no puede llevarse a cabo la catálisis (Chen *et al.*, 2014)

### ***II.4. Relaciones evolutivas de las enzimas aminoaldehído deshidrogenasas (AMADHs)***

Con base en la identidad de las secuencias de aminoácidos, la súperfamilia de las ALDHs se divide en familias de proteínas (Yoshida *et al.*, 1998; Sophos y Vasiliou, 2003). Las enzimas que pertenecen a una familia ALDH tienen al menos el 40% de identidad entre ellas y se considera que pertenecen a la misma subfamilia cuando su secuencia es idéntica en un 60% o más.

Varias de las familias ALDH se pueden encontrar en más de un organismo, sin embargo, algunas familias se encuentran exclusivamente en un grupo de organismos (Julián-Sánchez *et al.*, 2007). Esto se puede atribuir a la producción de diferentes aldehídos en diferentes organismos, o quizás a las diferencias en las vías de detoxificación (Vasiliou *et al.*, 2000).

Hasta la fecha, se han numerado a 27 familias de proteínas ALDH, de las cuales se han encontrado cinco que poseen actividad aminoaldehído deshidrogenasa (AMADH) demostrada experimentalmente (Julián-Sánchez *et al.*, 2007; Riveros-Rosas *et al.*, 2013), es decir, incluyen enzimas que catalizan la oxidación irreversible de  $\omega$ -amino aldehídos a ácidos carboxílicos usando como coenzima NAD(P)<sup>+</sup>. Estas son la familia ALDH9, que incluye enzimas de animales, bacterias y hongos; la familia ALDH10 que incluye enzimas de plantas, algunas de bacterias y hongos; y las familias ALDH25, ALDH26 y ALDH27 que incluyen solo enzimas bacterianas (Perozich *et al.*, 1999; Julián-Sánchez *et al.*, 2007; Riveros-Rosas *et al.*, 2013). De acuerdo con esta clasificación, se puede decir que la actividad AMADH apareció antes de que se diera la separación de procariotas y eucariotas ya que estas

familias incluyen secuencias de ambos organismos, lo que sugiere que la actividad AMADH es una de las más antiguas en la súperfamilia de las ALDHs (Julián-Sánchez *et al.*, 2007).

### ***II.5. Especificidad por el sustrato aldehído y la coenzima de las AMADHs***

#### *II.5.1 Especificidad por el sustrato aldehído*

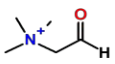
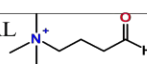
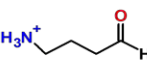
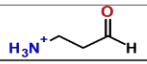
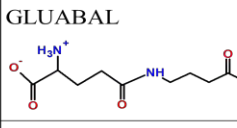

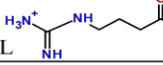
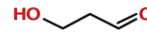
Los aldehídos utilizados por las AMADHs como sustratos pueden tener un grupo amonio cuaternario, un grupo amino primario o un grupo guanidino, aunque también se ha reportado actividad con un derivado de aminoaldehídos que contiene un grupo glutamilo (Tabla 2). Estos sustratos son intermediarios metabólicos importantes en todos los organismos procariontes y eucariotes. Algunos de los aminoaldehídos fisiológicamente más relevantes son: betaína aldehído (BAL), formado en la ruta de oxidación de colina (Rothschild y Guzman-Barron, 1954; Nagasawa *et al.*, 1976; Boch *et al.*, 1997; Díaz-Sánchez *et al.*, 2012), 3-aminopropionaldehído (APAL), formado en el catabolismo de espermina (Seiler, 2004), 4-aminobutiraldehído (ABAL), formado en el catabolismo de espermidina y putrescina (Samsonova *et al.*, 2005), que a su vez son intermediarios en el catabolismo de arginina (Jann *et al.*, 1988) cuando se lleva a cabo por la ruta de la descarboxilación, 4-guanidinobutiraldehído (GABAL), un intermediario en el catabolismo de arginina cuando se lleva a cabo por la ruta de deshidrogenación (Jann *et al.*, 1988), 4-glutamilaminobutiraldehído (GLUABAL), un intermediario del catabolismo de putrescina (Chou *et al.*, 2008) y, por lo tanto, también en el catabolismo de arginina, 4-trimetilaminobutiraldehído (TMABAL) producido en una reacción de rompimiento del aldol del 3-hidroxi-N-6-trimetil-lisina en la biosíntesis de carnitina en animales (Strijbis *et al.*,

## ANTECEDENTES

2010),  $\beta$ -alanina betaína aldehído formado en la degradación de homocolina exógena (Mohamed-Ahmeda *et al.*, 2015) y el 2-aminopropionaldehído (2-APAL) (De Azevedo *et al.*, 2002) que es un intermediario de la degradación de isopropilamina. Además, se ha encontrado que algunas AMADHs pueden oxidar sustratos aldehídos que en lugar del grupo amino poseen un grupo hidroxilo como el 3-hidroxiopropionaldehído (3-HPAL) que proviene de la degradación del glicerol (Subramanian *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2015).

**Tabla 2. Aldehídos usados como sustratos por enzimas AMADHs bacterianas y su participación**

en diferentes rutas metabólicas.

Tipo de sustrato	Sustrato	Ruta metabólica	Familia	Bacteria	Ref.
$\omega$ -Aminoaldehídos	BAL 	Síntesis de glicina betaína Catabolismo de colina	ALDH9 ALDH25 ALDH26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Xanthomonas translucens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .	Nagasawa, <i>et al.</i> , 1976; Falkenberg y Strom, 1990; Mori <i>et al.</i> , 1992; Boch, <i>et al.</i> , 1997; Mori <i>et al.</i> , 2002; Velasco-García <i>et al.</i> , 2006. Chen, <i>et al.</i> , 2014.
	TMABAL 	Catabolismo de trimetilaminobutanol	ALDH27	<i>Pseudomonas species</i>	Hassan <i>et al.</i> , 2008
	ABAL 	Catabolismo de arginina y poliaminas	ALDH25 ALDH26 ALDH27	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i>	Padmanabhan y Tchen, 1972; Yorifugi <i>et al.</i> , 1986; Vanderbilt <i>et al.</i> , 1975; Fan y Rodwell, 1975; Samsonova <i>et al.</i> , 2005.
	APAL 	Catabolismo de poliaminas		<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Arthrobacter sp.</i>	Tanaka <i>et al.</i> , 2001.
Derivados de $\omega$ -aminoaldehídos	GLUABAL 	Catabolismo de arginina y poliaminas	ALDH27	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kurihara <i>et al.</i> , 2005; Chou <i>et al.</i> , 2013
	2-Amino propionaldehído 	Catabolismo de isopropilamina y síntesis de $\beta$ -alanina		<i>Pseudomonas species</i>	De Azevedo <i>et al.</i> , 2002
$\omega$ -Guanidinoaldehídos	GABAL 	Catabolismo de arginina	ALDH27	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vanderbilt <i>et al.</i> , 1975; Fan y Rodwell, 1975; Jann <i>et al.</i> , 1988.
$\omega$ -Hidroxialdehídos	3-HPAL 	Catabolismo de glicerol	ALDH27	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i>	Jo <i>et al.</i> , 2008; Subramanian <i>et al.</i> , 2010; Luo <i>et al.</i> , 2011; Ko <i>et al.</i> , 2012; Su <i>et al.</i> , 2015.

**BAL:** betaína aldehído; **TMABAL:** trimetilaminobutiraldehído; **ABAL:** aminobutiraldehído; **APAL:** aminopropionaldehído; **GLUABAL:** glutamil-aminobutiraldehído; **GABAL:** guanidinobutiraldehído; **3-HPAL:** 3-hidroxiopropionaldehído

De acuerdo con los resultados reportados por Díaz-Sánchez *et al* (2012) y al estudio hecho por Riveros-Rosas *et al.* (2013), la especificidad por el sustrato de las AMADHs se debe principalmente a tres o cuatro residuos aromáticos del sitio catalítico que forman una “caja de aromáticos” cuyas nubes electrónicas dan estabilidad al grupo amino del aminoaldehído cargado positivamente mediante interacciones *cación- $\pi$* . Además, todas las AMADHs exhiben una superficie de potencial electrostático negativo en el túnel de entrada del aldehído, debido a los grupos carboxilo e hidroxilo de la cadena lateral o los grupos carbonilo de la cadena principal. Por el contrario, las ALDH que usan sustratos no polares o cargados negativamente presentan superficies potenciales electrostáticas neutras o positivas, dando especificidad a las familias de las ALDHs en general.

### II.5.2 Especificidad por la coenzima

En cuanto a la coenzima, se ha encontrado que la mayoría de las AMADHs muestra preferencia por el  $\text{NAD}^+$ , con la excepción de las enzimas ALDH9 de *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976; Velasco-García *et al.*, 2000), *E. coli* (Falkenberg y Strøm, 1990) y *Xanthomonas translucens* (Mori *et al.*, 1992) y la ALDH25 de *Arthrobacter globiformis* (Mori *et al.*, 2002) que pueden usar  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  casi indistintamente. La especificidad por la coenzima se determina por la complementariedad electrostática y geométrica entre la enzima y el mononucleótido de adenina, entre los cuales se establecen numerosos puentes de hidrógeno. González-Segura *et al.* (2015) reportó que la especificidad de la coenzima está determinada, principalmente, por la naturaleza del residuo en la posición 195 (de acuerdo a la numeración de la ALDH2 humana). Las enzimas con glutamato o prolina en 195 prefieren  $\text{NAD}^+$  porque las cadenas laterales de estos residuos repelen electrostáticamente y/o

estéricamente el grupo 2'-fosfato del NADP<sup>+</sup>. Pero contrariamente a la rigidez conformacional de la prolina, la flexibilidad conformacional del glutamato puede permitir la unión de NADP<sup>+</sup> en algunas enzimas desplazando el grupo carboxilo lejos del grupo 2'-fosfato, lo cual es posible si hay un pequeño residuo neutro en la posición 224. De los residuos encontrados en la posición 195, solo el glutamato interactúa con el 2'-OH de la ribosa de la adenosina del NAD<sup>+</sup>; glutamina e histidina en esta posición no interactúan con este hidroxilo ya que su cadena lateral se aleja de la ribosa y de esta forma permiten la unión del NADP<sup>+</sup>. Las cadenas laterales más cortas de otros residuos como aspartato, serina, treonina, alanina, valina, leucina o isoleucina quedarían distantes de la ribosa pero dejan espacio para unirse al grupo 2'-fosfato del NADP<sup>+</sup>. Generalmente, las enzimas que tienen un residuo diferente de glutamato se unen con menos afinidad a NAD<sup>+</sup>, y pueden unirse a NADP<sup>+</sup>, incluso con mayor afinidad.

### ***II.6. Funciones fisiológicas de las AMADHs bacterianas***

Dependiendo del organismo en que se encuentren, las AMADHs bacterianas pueden estar implicadas en varios procesos fisiológicos importantes. Algunas participan en la oxidación de BAL, ya sea para sintetizar GB (Falkenberg y Strøm, 1990; Boch *et al.*, 1997; Velasco-García *et al.*, 1999, 2006; Mandon *et al.*, 2003), un eficiente osmoprotector que es acumulado en altas concentraciones intracelulares cuando la bacteria se encuentra expuesta a estrés osmótico (Yancey *et al.*, 1982; Csonka y Hanson, 1991), o como parte del catabolismo de colina en aquellas bacterias que la usan como fuente de carbono, nitrógeno y energía como es el caso de *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976; Velasco-García *et al.*, 1999, 2006).



## ANTECEDENTES

Las AMADHs bacterianas también participan en el metabolismo de poliaminas (Large, 1992; Seiler, 2004) y arginina (Jann *et al.*, 1988; Zhe y Chung-Dar, 2007). Algunas de las enzimas reportadas en estas rutas son la  $\gamma$ -glutamyl- $\gamma$ -aminobutiraldehído deshidrogenasa *PuuC* (Kurihara *et al.*, 2005) y la  $\gamma$ -aminobutiraldehído deshidrogenasa *YdcW* de *E. coli* (Gruez *et al.*, 2004; Samsonova *et al.*, 2005), la 3-aminopropionaldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas species* (Padmanabhan y Tchen, 1972) y de *Arthrobacter species* (Tanaka *et al.*, 2001) y la guanidinobutiraldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas sp.* (Tricot *et al.*, 1990). Los sustratos usados por estas enzimas son:  $\gamma$ -glutamyl- $\gamma$ -aminobutiraldehído, 4-aminobutiraldehído, 3-aminopropionaldehído y 4-guanidinobutiraldehído, respectivamente. Los productos ácidos de las reacciones catalizadas son transformados en una serie de reacciones posteriores en succinato, que se incorpora al ciclo de Krebs. La L-carnitina es otro osmoprotector que se ha reportado que puede ser sintetizada a partir de trimetilaminobutanol en *Pseudomonas sp.* 13CM (Hassan *et al.*, 2008) dando como intermediario el trimetilaminobutiraldehído, aunque no se conoce la procedencia ni la función fisiológica del trimetilaminobutanol. Además de estos sustratos, se ha reportado que la AMADH de *Arthrobacter sp.* (Tanaka *et al.*, 2001) puede oxidar aldehídos no fisiológicos con sustituyentes alifáticos, como el *N*-[3-aminopropil] -3-aminopropionaldehído, el *N*-[4-aminobutil] -3-aminopropionaldehído y el *N*-[3-aminopropil] -3-aminobutiraldehído y, en el caso de una AMADH de *E. coli* (*YdcW*, ALDH26), esta puede oxidar aldehídos alifáticos de cadena media (Gruez *et al.*, 2004; Samsonova *et al.*, 2005).

Otras rutas metabólicas en las que se ha reportado que participan las AMADHs bacterianas corresponden al catabolismo de glicerol y de isopropilamina. El 3-hidroxiopropionaldehído (Jo *et al.*, 2008; Subramanian *et al.*, 2010) y el 2-amino-

propionaldehído y/o el propionaldehído (De Azevedo *et al.*, 2002) son los sustratos respectivos de estas enzimas en dichas rutas. En el primer caso, el producto ácido 3-hidroxi-propionato (3-HP) es una materia prima valiosa en la síntesis de polímeros que ha despertado especial interés en la industria química y se ha utilizado para su obtención la enzima AMADH de la bacteria *E. coli* K-12 (Jo *et al.*, 2008) y la enzima PuuC de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 (Subramanian *et al.*, 2010), que tiene una identidad del 65 % con la enzima PaKauB (hallado con el programa BLAST del NCBI) y que, por lo mismo, consideramos que es una AMADH de la familia ALDH27. Para el segundo caso, se ha reportado que *Pseudomonas sp.* strain KIE171 es capaz de utilizar la ruta metabólica de isopropilamina catabolizada a L-alaninol para su crecimiento; en esta ruta el L-alaninol puede ser oxidado por una alcohol deshidrogenasa, para producir L-2-aminopropionaldehído y, posteriormente, según la evidencia genética indica, este aldehído es oxidado por una aldehído deshidrogenasa nombrada IpuH (una AMADH de la familia ALDH27) hasta L-alanina, o puede ser convertido en propionaldehído mediante una amonio liasa para finalmente ser oxidado hasta ácido propiónico, por una aldehído deshidrogenasa llamada IpuI, que no pertenece a la familia ALDH27 (De Azevedo *et al.*, 2002).

### ***II.7. Estructura tridimensional de las AMADHs bacterianas***

Algunas de las AMADHs bacterianas, cuya estructura tridimensional se conoce a la fecha, son tetraméricas como la PaBADH (ALDH9, código PDB: 2WME; González-Segura *et al.*, 2009), la YdcW de *E. coli* (ALDH26, código PDB: 1WNB; Gruez *et al.*, 2004), la BADH de *Staphylococcus aureus* (ALDH25, código PDB: 4NEA; Halavaty *et al.*, 2015), la BADH de *Pseudoalteromonas atlantica* T6c (ALDH50, código PDB:3K2W, sin artículo

## ANTECEDENTES

asociado) y la  $\gamma$ -glutamil-  $\gamma$ -aminobutiraldehído deshidrogenasa de *Burkholderia cenocepacia* J2315 (ALDH27, código PDB: 4LIH, sin artículo asociado) que tiene un 64 % de identidad con la PaKauB según el BLAST realizado en la página del NCBI y que, según el criterio enunciado antes, pertenece a la familia ALDH27. Otras AMADHs son diméricas como la enzima BADH de *Agrobacterium tumefaciens* (ALDH9, código PDB: 3R31; sin artículo asociado).

Sin importar su estado de oligomerización, todas estas AMADHs están formadas por monómeros de aproximadamente 500 residuos de aminoácidos. Cada monómero, al igual que el del resto de las ALDHs, tiene un plegamiento similar en el que se pueden reconocer tres dominios:

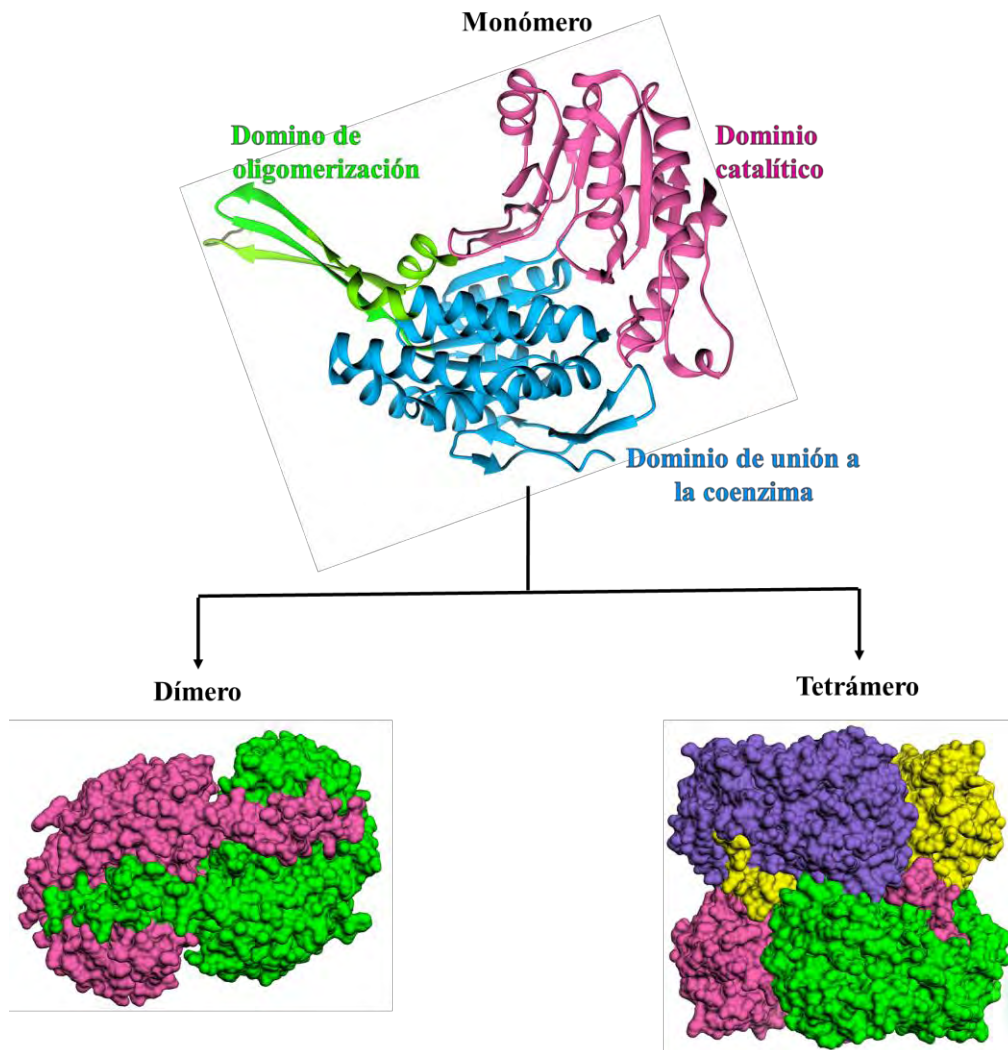
Dominio de unión a la coenzima: localizado en la región N-terminal de la proteína, presenta un plegamiento tipo Rossmann ligeramente diferente al descrito en las alcohol deshidrogenasas (Eklund *et al.*, 1974; Lesk, 1995), debido a que carecen del último motivo  $\alpha\beta$ . En este dominio se une fuertemente la parte de la adenina mononucleótido del NAD(P)<sup>+</sup> fijando al dinucleótido al sitio activo de la enzima, mientras que la parte de la nicotinamida mononucleótido se une al dominio catalítico y posee mayor flexibilidad conformacional (Liu *et al.*, 1997; Steinmetz *et al.*, 1997; Perez-Miller y Hurley, 2003)

Dominio catalítico: En un asa de este dominio se encuentra la cisteína catalítica, por lo que su estructura está conservada en todas las ALDHs con estructura tridimensional conocida (Muñoz-Clares *et al.*, 2017). Otros residuos importantes para la catálisis y que están presentes en este dominio son el glutámico catalítico, que activa la molécula de agua para realizar el ataque nucleofílico al tioéster y la asparagina catalítica, la cual junto con el nitrógeno amídico de la cisteína catalítica forman la cavidad del oxianión estabilizando la carga generada en el intermediario tetraédrico y los residuos que participan en el mecanismo

de descarga del protón (lisina y glutámico) (Wang y Weiner, 1995; Hempel *et al.*, 1999; Mann y Weiner, 1999, Muñoz-Clares *et al.*, 2015).

Dominio de oligomerización: es una extensión del dominio de unión a la coenzima y permite la formación y estabilización de la unidad dimérica.

En la Figura 1 se muestra un ejemplo de la estructura tridimensional de una ALDH tetramérica y de una dimérica, así como la organización en tres dominios de cada subunidad.



**Figura 1.** Estructura tridimensional de las enzimas ALDHs. Monómero en donde se observan los tres dominios típicos del plegamiento de las ALDHs, a partir del cual se forman estructuras

tridimensionales cuya unidad biológica activa puede ser dimérica (aquí ejemplificada con la estructura de la BADH de espinaca *SoBADH*, código PDB: 4A0M) o tetramérica (ejemplificada con la estructura de la BADH de *Pseudomonas aeruginosa* *PaBADH*, código PDB: 2WME).

### ***II.8. Papel fisiológico de la AMADH PaKauB de Pseudomonas aeruginosa***

La enzima *PaKauB* de *P. aeruginosa* codificada por el gen *PA5312* (*PakauB*) pertenece a la familia ALDH27, exclusiva de bacterias. Esta enzima participa en dos rutas del catabolismo de arginina: la ruta de deshidrogenación de D-arginina (Figura 2, Ruta 1) y la ruta de descarboxilación de L-arginina (Figura 2, Ruta 2) (Jann *et al.*, 1988). También participa en dos rutas del catabolismo de putrescina: la ruta de transaminación-deshidrogenación (Figura 2, Ruta 2) (Jann *et al.*, 1988; Chou *et al.*, 2008) y la ruta de glutamilación (Figura 2, Ruta 3) (Zhe y Chung-Dar, 2007; Yao *et al.*, 2011). La putrescina es una poliamina que puede ser sintetizada a partir de agmatina exógena mediante las enzimas agmatina desiminasa y N-CP amidohidrolasa, o a partir de arginina mediante la reacción de arginina descarboxilasa seguida de las mismas reacciones que convierten la agmatina en putrescina. De igual forma, por análisis genómicos (de eliminación de genes) se ha visto que la enzima *PaKauB* participa en el metabolismo de espermidina produciendo diaminopropano y, posteriormente, 3-aminopropionaldehído (APAL) como intermediario, el cual es oxidado por *PaKauB* hasta  $\beta$ -alanina para, finalmente, producir acetil coenzima A (Figura 2, Ruta 4) (Yao *et al.*, 2011). Los productos de estos catabolismos se incorporan al ciclo de Krebs y son usados por la bacteria como fuente de carbono y energía. La eliminación o mutación del gen *PakauB* hace incapaz a *P. aeruginosa* de crecer en un medio con putrescina, agmatina, diaminopropano, o 2-cetoarginina como única fuente de carbono y nitrógeno (Jann *et al.*,

## ANTECEDENTES

1988), lo que refleja el carácter indispensable de la proteína en el catabolismo de dichas fuentes de carbono y nitrógeno. Consistente con estos resultados, el gen *PakauB* es inducido por los mismos compuestos (Jakoby y Fredericks, 1959; Zhe y Chung-Dar, 2007; Yao *et al.*, 2011). La degradación de poliaminas es importante, debido a que estos compuestos policatiónicos están presentes en todos los organismos vivos, desde arqueas hasta eucariontes (Tabor y Tabor, 1985; Morimoto *et al.*, 2010; Moschou *et al.*, 2012) y están implicados en una gran e importante variedad de funciones fisiológicas como la síntesis de DNA, RNA y proteínas (revisado en Jastrzab *et al.*, 2017).

# ANTECEDENTES

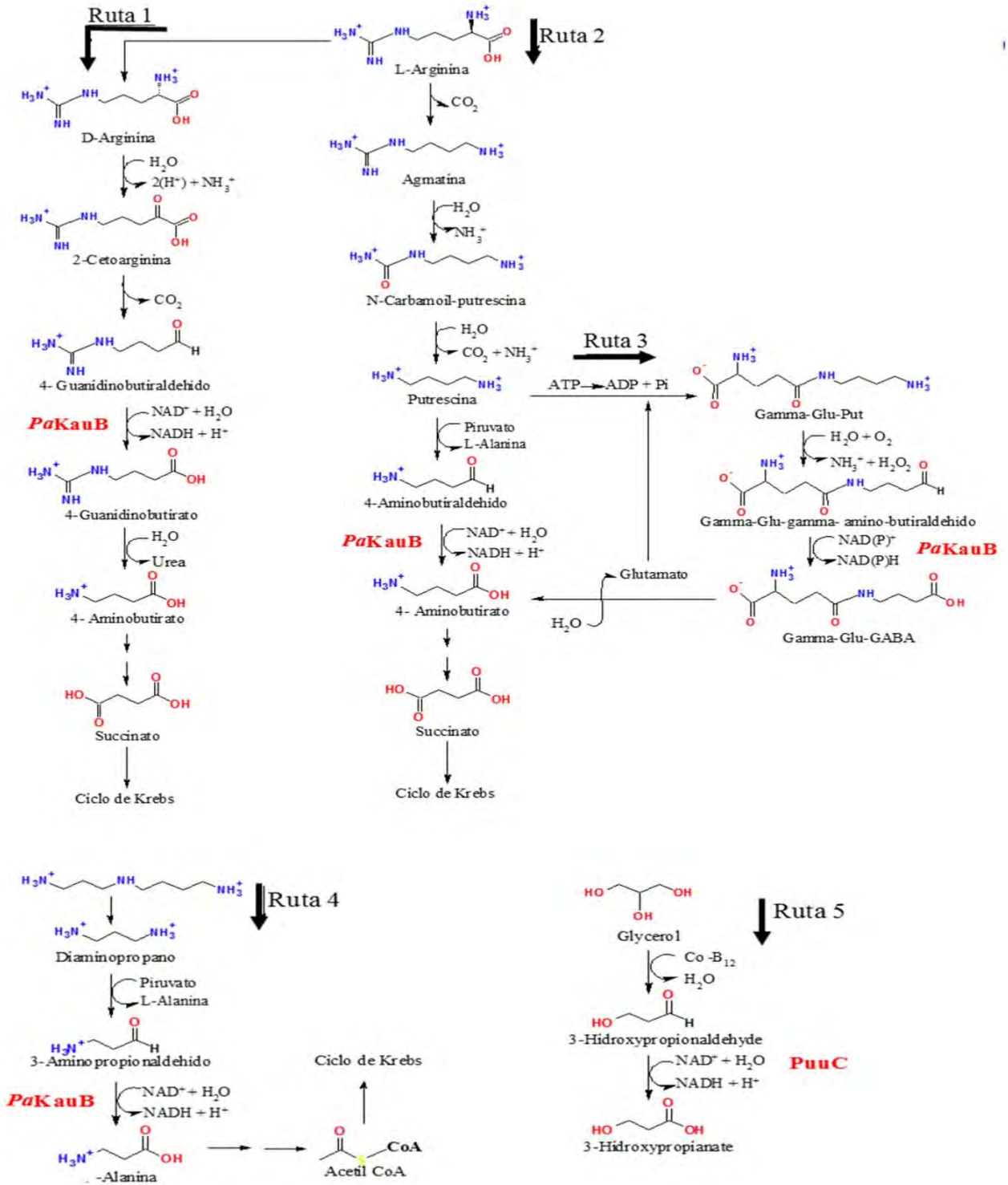


Figura 2. Rutas metabólicas en las que participa la enzima PaKauB.

## ANTECEDENTES

Otro metabolismo en el que podría participar la enzima *PaKauB* es la degradación del glicerol, un compuesto en el que *P. aeruginosa* es capaz de crecer como única fuente de carbono (Siegel y Phibbs, 1979; McCowen *et al.*, 1981), ya que se ha reportado que una ALDH de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* participa en el catabolismo de glicerol (Subramanian *et al.*, 2010), y encontramos que *PaKauB* tiene un porcentaje de identidad de 64.78% con esta enzima, la cual por tanto también es una ALDH27.

Aún no se tiene muy claro si la expresión del gen *PakauB* es constitutiva o solamente inducible, ya que aunque su región promotora une a un represor transcripcional llamado *PauR* (codificado por *PA5301* en el genoma de PAO1), parece que este represor no es esencial para la expresión del gen puesto que una cepa mutante nula de *pauR* no mostró ningún defecto de crecimiento aparente con ninguna de las poliaminas ensayadas (Chou *et al.*, 2013). Además, este regulador no se encuentra en contexto genómico con el gen *PakauB*. Por otro lado, se ha reportado que el gen *PakauB* se expresa cuando la bacteria crece en un medio con glutamato como única fuente de carbono y nitrógeno (Chou *et al.*, 2008) pero no hay reportada ninguna ruta metabólica del glutamato en la que participe *PaKauB* lo que sugiere que *PakauB* puede ser un gen constitutivo y que la enzima está disponible para catalizar la oxidación de aldehídos en diferentes rutas catabólicas, convirtiéndose en una enzima de amplia especificidad por el sustrato.

Inicialmente *PaKauB* fue identificada como 4-guanidinobutiraldehído deshidrogenasa en la utilización de 2-cetoarginina razón por la cual se le asignó el nombre de *KauB* (de ketoarginine catabolism) y como  $\gamma$ -glutamyl- $\gamma$ -aminobutiraldehído deshidrogenasa en la degradación de putrescina en *E. coli* (Kurihara *et al.*, 2005), razón por la cual también la han nombrado *PuuC* (de putrescine catabolism). Estudios más recientes la nombran *PauC* haciendo referencia a la enzima de *P. aeruginosa* homóloga de *PuuC* en la



ruta de degradación de poliaminas reportada para *E. coli* (poliamines utilization). Posteriores estudios la han propuesto como la única enzima que cataliza la reacción de oxidación de los diferentes aldehídos (ABAL, APAL, GLUABAL) intermediarios del metabolismo de poliaminas (putrescina, cadaverina, diaminopropano) sin otras enzimas redundantes, aunque por medio de alineamientos de secuencia de aminoácidos se ha encontrado que en *P. aeruginosa* existen homólogos de *PaKauB* con similitud de secuencia muy alta entre sí (Chou *et al.*, 2013).

### ***II.9. Generalidades de la bacteria P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* es una bacteria gram-negativa, con forma de varilla, monoflagelada. Tiene un aspecto verde y olor a uva, debido a la 2-aminoacetofenona producida en las etapas tempranas de ciclo de crecimiento de la bacteria, o a tortilla característico de las etapas tardías del ciclo de crecimiento. La bacteria crece bien desde 25 °C hasta 37 °C, y su capacidad de crecer a 42 °C ayuda a distinguirla de muchas otras especies de *Pseudomonas*. Su genoma consiste en un único cromosoma circular con un tamaño entre 5.5 - 7 Mb, con alto contenido de G/C (65-67%). Debido al tamaño de su genoma, *P. aeruginosa* codifica un gran número de enzimas para diversas vías metabólicas, lo que le confiere una alta versatilidad nutricional. Además, alrededor del 8% de su genoma codifica genes reguladores, lo que permite a la bacteria adaptarse a ambientes de crecimiento complejos y muy diversos (Wu *et al.*, 2015).

### *II.9.1 Patogenicidad*

*P. aeruginosa* es un microorganismo ubicuo que tiene la capacidad de sobrevivir bajo una variedad de condiciones ambientales. Produce enfermedades en plantas y animales, ya que codifica numerosos factores de virulencia como los homopolímeros de proteínas *pili*, o los oligosacáridos de LPS que se unen a las células epiteliales del hospedero para iniciar la infección. También tiene sistemas de secreción de toxinas y exoenzimas como la proteinasa alcalina, la exotoxina A, raminolípido, elastasa y fosfolipasa C que contribuyen a la virulencia de la bacteria permitiéndole establecer diversas infecciones. Además, ha desarrollado una red reguladora complicada para controlar la expresión temporal de los factores de virulencia apropiados para obtener el beneficio de su entorno para la supervivencia bacteriana (Wu *et al.*, 2015).

En humanos, esta bacteria causa serias infecciones urinarias, de córnea, piel o pulmón, particularmente en enfermos de fibrosis quística conllevando a la muerte, y es una causa importante de morbilidad en pacientes con quemaduras graves o inmunodeprimidos como aquellos con SIDA o con cáncer bajo quimioterapia (revisado en Mesaros *et al.*, 2007, y en Savoia, 2014).

La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* producen uno o más pigmentos, incluyendo piocianina (azul-verde), pioverdina (amarillo-verde y fluorescente), y piorubina (rojo-marrón). Se ha sugerido que la piocianina no solo contribuye a la persistencia de la bacteria en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística, sino que también interfiere con muchas funciones de células de mamíferos, incluyendo la respiración celular, el movimiento ciliar, el crecimiento de células epidérmicas, y la liberación de prostaciclina de células endoteliales

del pulmón. Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular preciso mediado por la piocianina (Wu *et al.*, 2015).

### *II.9.2 Resistencia a antibióticos*

*P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a varios antibióticos debido a la baja permeabilidad de su membrana externa, la expresión constitutiva de varias bombas de expulsión y la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos (por ejemplo, cefalosporinasas) (Sanders y Sanders, 1986). Además, tiene una notable capacidad para desarrollar o adquirir nuevos mecanismos de resistencia a los antibióticos. Esto puede estar relacionado con el gran tamaño y la versatilidad de su genoma. Estos mecanismos a menudo están presentes al mismo tiempo, confiriendo múltiples formas de resistencia a la bacteria (revisado en Mesaros *et al.*, 2007, y en Savoia, 2014).

Por otro lado se ha reportado que cuando la cepa PA1 de *P. aeruginosa*, la cual tiene alto grado de similitud con el genoma de la cepa PAO1, se infecta con un fago llamado PAP1, la expresión de varios genes que codifican proteínas usadas en el metabolismo de aminoácidos se ven modificados. Uno de los metabolismos afectados es el de arginina, donde al parecer la proteína *PaKauB* aumenta su actividad, pues la concentración del 4-aminobutirato (GABA), el producto de oxidación del ABAL, se incrementa (Zhao *et al.*, 2015). Este resultado sugiere que la enzima *PaKauB* es importante para la defensa y supervivencia de la bacteria frente a la infección por un fago, ya que se ha reportado que en *P. aeruginosa*, si se añade GABA al medio de crecimiento, aunque se reduce la formación de biopelículas, se incrementa la producción de cianuro de hidrógeno y la virulencia (Dagorn *et al.*, 2013).

### III. HIPÓTESIS

Además de la participación de la enzima *PaKauB* en las rutas de degradación de arginina y poliaminas, oxidando aldehídos intermediarios de estas rutas, pudiera también oxidar otros aldehídos y de esta forma participar en otras rutas metabólicas, lo que estaría facilitado porque el gen que la codifica no está asociado a ningún operón.

### IV. OBJETIVOS

#### *IV.1. Objetivo general*

Estudiar la especificidad de la enzima *PaKauB* por distintos aldehídos para inferir su posible participación en diversas rutas metabólicas

#### *IV.2. Objetivos particulares*

**IV.2.1** Obtener la enzima *PaKauB* de forma recombinante y purificarla a homogeneidad.

**IV.2.2.** Sintetizar aquellos aldehídos que se hayan reportado como sustratos y que no estén disponibles comercialmente.

**IV.2.3.** Estudiar la especificidad de la enzima *PaKauB* para los aldehídos reportados como sustratos, bajo concentraciones fisiológicas del nucleótido determinando los parámetros cinéticos aparentes ( $V$ ,  $K_m$  y  $V/K_m$ ) para aquellos aldehídos que puedan ser oxidados por esta enzima.

**IV.2.4.** Determinar el mecanismo cinético de la enzima con el aldehído sustrato que se considere de interés.

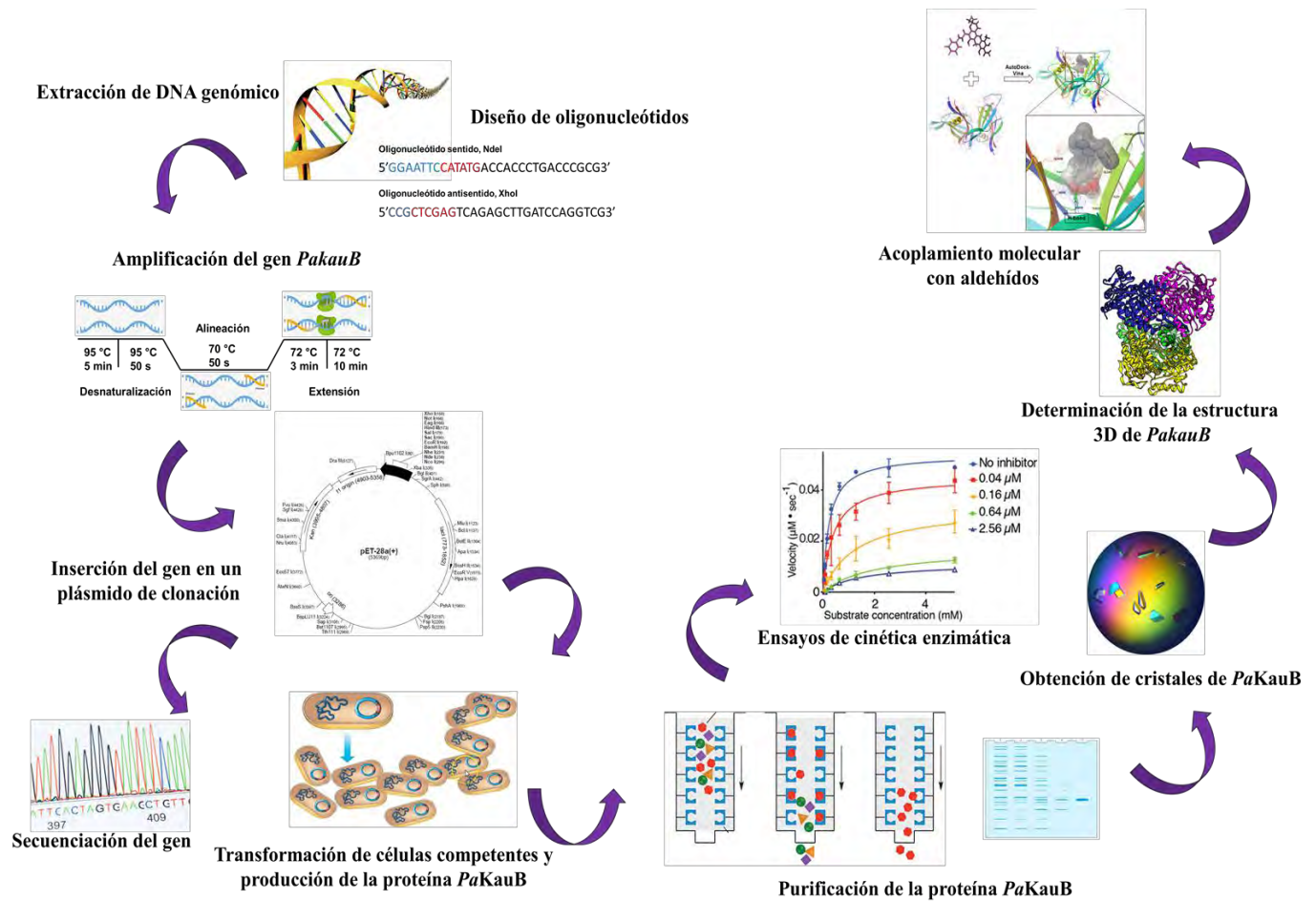
**IV.2.5.** Obtener la estructura tridimensional de *PaKauB*

**IV.2.6.** Realizar estudios de acoplamiento molecular (“docking”) de los aldehídos usando la estructura tridimensional de la enzima *PaKauB* para explicar la especificidad de la enzima por los aldehídos probados.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Estrategia experimental

En el Esquema 4 se muestran los pasos experimentales que se siguieron para cumplir uno a uno los objetivos propuestos en esta tesis y cuyos métodos se describen a continuación.



Esquema 4. Estrategia experimental utilizada.

### V.2. Clonación del gen PA5312 (*PakauB*)

La secuencia del gen PA5312 (*PakauB*) que codifica la enzima *PaKauB* de *P. aeruginosa* se obtuvo de la base de datos *GenBank* (Benson *et al*, 2005) (*Gene ID*: AAG08697.1). Los oligonucleótidos sentido y antisentido para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) construidos con base en esta secuencia fueron:

5'-GGAATTCCATATGACCACCCTGACCCGCG-3' y

5'-CCGCTCGAGTCAGAGCTTGATCCAGGTCG-3', respectivamente.

El oligonucleótido sentido contiene una secuencia para el sitio de restricción *NdeI* (doble subrayado), un codón de iniciación (ATG), una secuencia de anclaje para que la enzima de restricción se una mejor al sitio de reconocimiento (punteado) y una secuencia de codificación para seis residuos de aminoácidos de la *PaKauB*. El oligonucleótido antisentido contiene un sitio de restricción *XhoI* (doble subrayado), una secuencia de anclaje (punteado) y una secuencia de codificación para siete residuos de aminoácidos de la *PaKauB*.

El DNA genómico de *P. aeruginosa* PAO1 se utilizó como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la preparación del DNA genómico se cultivaron células de la cepa PAO1 en medio líquido LB durante 16 h a 37 °C y 200 rpm. Luego de este tiempo se tomaron alícuotas de 1.5 mL y se centrifugaron durante 4 min a 9,000 rpm; se desechó el sobrenadante y se adicionaron 567 µL de amortiguador TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0), 30 µL de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10 % y 3 µL de *Proteinase K* (Sigma Aldrich, EUA) a una concentración de 20 mg/mL. La mezcla se incubó por 1 h a 37 °C. Posteriormente, se agregaron 100 µL de NaCl 5 M y 80 µL de una mezcla de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 10 % (p:v) / NaCl 0.7 M; se mezcló todo fuertemente y se incubó por otros 10 min a 65 °C. A continuación, se agregó un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 9,000 rpm.

## MATERIALES Y MÉTODOS

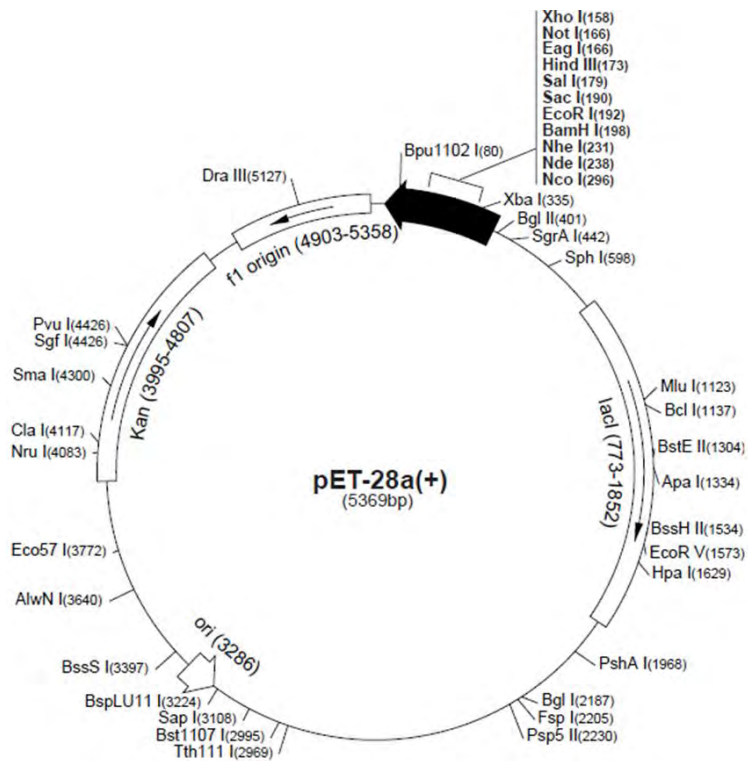
El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio al que se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se mezcló suavemente hasta que el DNA precipitó. El precipitado se transfirió a un tubo limpio y se hicieron repetidos lavados con 1 ml de etanol al 70 % (v:v), centrifugando a 9,000 rpm por 5 min, desechando el sobrenadante, finalmente, se reconstituyó el DNA genómico con agua estéril.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó como molde el DNA genómico de *P. aeruginosa* a una concentración de 10 ng/ $\mu$ L y la enzima *Pfu* DNA polimerasa (Thermo Scientific, EUA); la amplificación se hizo en 30 ciclos. Cada ciclo constó de 5 min de desnaturalización a 95 °C, 50 s de apareamiento a 70 °C, 3 min de extensión a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C. El producto de PCR con la longitud de DNA esperada (1,491 pb) se purificó utilizando el *GeneJet PCR Purification Kit* (Thermo Scientific, EUA) y se digirió con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* a una temperatura de 37 °C, durante 16 h. El producto de la digestión se clonó en un vector de expresión pET28b(+) (Novagen, Alemania) (Figura 3), que contiene una región de múltiples sitios de restricción en donde se hizo la inserción del gen *PakauB* usando las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. Este vector también posee un promotor y un terminador transcripcional para la RNA polimerasa T7, que produce altos niveles de transcripción en diferentes cepas de *E. coli* como la cepa BL21 Rosetta (DE3), así como un gen que confiere resistencia a kanamicina, que se usa como marcador de selección de las bacterias transformadas. La ligación del vector pET28b(+) con el gen *PakauB* se realizó a una temperatura de 22 °C, por 16 h, usando *T4 DNA Ligase Kit* (Thermo Scientific, EUA). La construcción resultante, designada como pET28b(+)-PakauB, se usó para transformar células de *E. coli* de la cepa XL10-Gold por choque térmico. Las células transformadas se crecieron en placa de manera selectiva por medio del factor de resistencia a kanamicina (que se añadió al medio de crecimiento a una



## MATERIALES Y MÉTODOS

concentración de 0,1 mg/mL) contenido en el plásmido. Las colonias que crecieron se resembraron en medio líquido LB que contenía kanamicina (0,1 mg/mL) y se incubaron por 16 h a 37 °C. De este medio se extrajo el plásmido pET28b(+)-*PakauB* utilizando *GeneElute Kit* (Sigma Aldrich, EUA) y se envió a secuenciar mediante el método de Sanger (Sanger y Coulson, 1975) a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT, UNAM.



**Figura 3: Mapa del vector pET28b(+)** en el que se clonó el gen *PakauB*.

Para comprobar la amplificación del gen *PaKauB* y la digestión del vector pET28b(+) con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, los productos respectivos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v). Cada gel se preparó por disolución de agarosa en amortiguador TAE que contenía Tris 4 mM, acetato de sodio 8 mM, EDTA 100  $\mu$ M, a pH 7.5 ajustado con ácido acético glacial. Posteriormente, se adicionó bromuro de etidio 0.05  $\mu$ g/mL. Antes de la

## MATERIALES Y MÉTODOS

aplicación de las muestras en el gel, estas se mezclaron en una relación 1:10 con un amortiguador de carga que contenía azul de bromofenol 0.25 %, xilencianol 0.25 % y glicerol 50 % (v/v). La electroforesis se corrió en una cámara de electroforesis horizontal Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, EUA) que contenía amortiguador TAE. Las bandas de DNA en los geles se observaron bajo luz UV.

### *V.3. Sobreexpresión del gen PakauB y producción de la enzima recombinante PaKauB en células de E. coli*

Luego de comprobar que se contaba con el gen PA5312 (*PakauB*) clonado en el vector de expresión, se transformaron con él células competentes de *E. coli* de la cepa BL21 Rosetta (DE3) (Novagen, Alemania) por medio de choque térmico. Para ello, primero se prepararon células competentes creciendo bacterias de la cepa BL21 Rosetta (DE3) en 10 mL de medio LB líquido durante 16 h a 37 °C y 200 rpm. De este cultivo se tomó una alícuota de 1.5 mL para inocular 50 mL de medio de LB y se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar un valor de densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 0.6 unidades de absorbancia. Posteriormente, el cultivo de células se mantuvo a 4 °C en un baño de hielo durante 20 min, tras lo cual se centrifugó a 6,000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se decantó y la pastilla de células se resuspendió en 10 mL de una solución de  $CaCl_2$  100 mM, estéril y fría. La mezcla se colocó nuevamente en un baño de hielo durante 20 min y luego se centrifugó a 6,000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y la pastilla de células se resuspendió en 2 mL de cloruro de calcio 100 mM. Finalmente, se adicionó glicerol hasta obtener una concentración final de 20 % (v:v) y se hicieron alícuotas de 50  $\mu$ L que se almacenaron a -80 °C para su posterior uso.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el paso de transformación, se tomó una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de las células competentes previamente preparadas y se añadieron 5  $\mu\text{L}$  del plásmido pET28b(+)-PakauB (156 ng/ $\mu\text{L}$ ); la mezcla se dejó en hielo durante 30 min. Luego de este tiempo, el tubo conteniendo la mezcla se pasó a un baño térmico a 42 °C durante 40 s e inmediatamente se pasó al hielo por 2 min más. Posteriormente, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de medio líquido LB estéril y la mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C y 200 rpm. Transcurrido este tiempo, las células cultivadas se centrifugaron a 3,000 rpm por 2 min,  $\frac{3}{4}$  partes del sobrenadante se desecharon y con la parte restante se resuspendió la pastilla de células que quedó. Con esta solución se sembraron placas con agar LB que contenían kanamicina a una concentración final de 0.1 mg/mL. Las placas se incubaron durante 16 h a 37 °C. De las colonias que crecieron se tomaron muestras que se cultivaron en medio LB líquido en presencia de kanamicina (0.1 mg/mL) a 37 °C y 200 rpm. El crecimiento bacteriano se siguió midiendo el cambio en la densidad óptica a 600 nm ( $\text{DO}_{600}$ ) hasta que alcanzó un valor entre 0.5 y 0.7 unidades de absorbancia. En ese momento se indujo la síntesis de la enzima *PaKauB* con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.1 mM, y se continuó la incubación por 4 horas más. El nivel de producción de la enzima se evaluó por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), siguiendo el método de Laemmli (1970). Para ello, el cultivo de células transformadas se centrifugó a 5,000 rpm por 15 min. Se separó el sobrenadante del precipitado de células y a este último se le adicionó un volumen de amortiguador igual al volumen de sobrenadante recuperado. Posteriormente, en los carriles del gel de poliacrilamida se aplicó un volumen igual de la solución que contenía el precipitado que de la que contenía el sobrenadante.

### ***V.4. Purificación a homogeneidad de la enzima PaKauB***

El plásmido pET28b(+)-PakauB permitió producir la proteína PaKauB con una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, lo que facilita su purificación en una columna de afinidad a iones níquel. La enzima recombinante PaKauB se purificó a homogeneidad en un solo paso mediante cromatografía de afinidad usando una columna Protino® Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel, EUA), que se basa en la interacción específica y reversible entre la enzima obtenida con una etiqueta de histidinas y el níquel soportado en la resina. Para ello, las bacterias, crecidas como se describió anteriormente, se centrifugaron a 6,000 rpm durante 5 min, a 10 °C, desechando el sobrenadante. El sedimento de células obtenida se resuspendió en 10 mL de un amortiguador de HEPES/KOH 50 mM, KCl 50 mM, glicerol 10 % (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM a pH 7.0 (amortiguador de extracción) y se obtuvo el extracto crudo por ruptura de las células por ultrasonido en intervalos de 45 s encendido y 45 s apagado para completar un tiempo total de 15 min de sonicación a una amplitud de 21 %. Posteriormente, la solución se centrifugó a 6,000 rpm por 15 min y el sobrenadante se pasó a través de la columna de afinidad de 10 mL de volumen de cama, previamente equilibrada y lavada con 200 mL del amortiguador en el que se rompieron las células (amortiguador de extracción). La elución se realizó con imidazol 150 mM en 150 mL de este amortiguador. Durante la elución se recogieron fracciones de 10 mL a las que se le determinó la concentración de proteína por absorción a  $\lambda = 280$  nm y su grado de pureza por SDS-PAGE usando un gel de poliacrilamida al 12 %. La actividad enzimática de las fracciones se determinó espectrofotométricamente a 30 °C, observando la aparición del producto NADH a  $\lambda = 340$  nm, de acuerdo al procedimiento descrito en Velasco-García *et al.* (2000). La reacción se inició por adición de 10  $\mu$ L de la preparación de enzima a 490  $\mu$ L de una mezcla de reacción

## MATERIALES Y MÉTODOS

que estaba constituida por un amortiguador de fosfato de potasio 100 mM a pH 8.0,  $\text{NAD}^+$  1 mM y 4-aminobutiraldehído 1.5 mM. Definimos una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un  $\mu\text{mol}$  de NADH por minuto.

Se unieron aquellas fracciones puras que presentaron mayor actividad enzimática, tras lo cual se hicieron lavados repetitivos con el amortiguador en el que se rompieron las células usando un filtro Ultra 30 (Millipore, Alemania) para disminuir la concentración de imidazol. La actividad específica de la preparación de la enzima *PaKauB* pura se calculó una vez determinada su concentración de proteína, lo que se llevó a cabo espectrofotométricamente midiendo su absorción a  $\lambda = 280$  nm y usando el coeficiente de extinción molar  $1.272 \text{ g/L}$  ó  $68,660 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  calculado con base a la secuencia de la proteína en el portal de recursos bioinformáticos *Expasy* mediante la herramienta *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>). Esta herramienta usa el método descrito por Gill y von Hippel (1989), que se basa en la absorción a esta longitud de onda de los residuos aromáticos de la proteína. Finalmente, se hicieron alícuotas de 1 mL de la preparación de enzima pura y se almacenaron a  $-80$  °C para su posterior uso.

### ***V.5. Determinación del estado oligomérico de la enzima PaKauB***

El estado de asociación de la enzima se determinó por cromatografía de exclusión molecular (SEC) en una columna Superdex 200 HR-10/30 (Pharmacia Uppsala, Suecia) acoplada a un equipo de HPLC (Waters Milford, EUA). La columna se equilibró y se eluyó a temperatura ambiente con el amortiguador de extracción a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. Previamente a la cromatografía, la solución de proteína se pasó por un filtro de membrana hidrofílica de PVDF no estéril para jeringa con un poro de  $0.22 \mu\text{m}$  de diámetro

(Millipore, Millex-GV, Alemania). La elución se monitoreó siguiendo la absorbancia a 280 nm. El estándar *Gel Filtration Standard* (Bio-Rad, EUA) utilizado para la calibración de la columna de filtración en gel contenía las proteínas: tiroglobulina de bovino, 670,000 Da;  $\gamma$ -globulina de bovino, 158,000 Da; ovoalbúmina de pollo, 44,000 Da; mioglobina de caballo, 17,000 Da y vitamina B12, 1,350 Da.

### ***V.6. Obtención de los aldehídos libres a partir de sus derivados dietilacetálicos***

Los dietilacetales de APAL y ABAL, y el  $\text{NAD}^+$  se obtuvieron de Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V. (Toluca, México). El dietilacetal de TMABAL se sintetizó siguiendo el método descrito abajo. APAL, ABAL y TMABAL se prepararon hidrolizando las correspondientes derivados dietilacetálicos siguiendo el método descrito por Flores y Filner (1985). La concentración exacta de los aldehídos libres resultantes se determinó en cada experimento midiendo la cantidad de NADH producida después de su completa oxidación en la reacción catalizada por PaKauB en presencia de un exceso de  $\text{NAD}^+$ .

### ***V.7. Síntesis del dietilacetal del cloruro de 4-trimetilamoniobutiraldehído***

Esta síntesis se llevó a cabo con la colaboración del M. en C. Manuel López y del Dr. Ignacio Regla del Laboratorio de Síntesis de Fármacos de la FES Zaragoza, UNAM. La pureza de los compuestos sintetizados se confirmó por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  llevados a cabo por la Unidad de Servicios para la Industria y la Investigación (USAII), Facultad de Química, UNAM.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En un reactor de acero inoxidable de 80 mL, se adicionaron 30 mL de acetonitrilo, 1.7 g (12.3 mmoles) de carbonato de potasio, 500 mg (3.1 mmoles) de 4-aminobutiraldehído dietilacetal y 1.6 g (31 mmoles) de cloruro de metilo. El reactor se cerró con un manómetro y se calentó a 50 °C por aproximadamente 4 horas, observando una presión máxima de 15 psi. El término de la reacción se verificó por cromatografía en capa fina (CCF) usando como fase móvil la mezcla diclorometano-metanol (DCM/MeOH) en una relación 9:1. Finalmente, la mezcla de reacción, sin ningún paso adicional de purificación, se concentró hasta sequedad en un rotavapor y se secó con alto vacío a temperatura ambiente. Se obtuvieron 650 mg (67.5 %) del dietilacetal del cloruro de 4-trimetilamonibutiraldehído completamente puro, verificado por resonancia magnética nuclear. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ (ppm) 4.59 (t, J= 5.5 Hz, 1H), 3.75 - 3.42 (m, 5H), 3.29 - 3.17 (m, 2H), 1.86 - 1.65, (m, 2H), 1.61 - 1.51 (m, 2H), 1.10 (t, J= 7.1 Hz, 6H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ(ppm) 100.06 (O-CH-O, C-5), 63.72 (CH<sub>2</sub>, C-8), 60.70 (CH<sub>2</sub>, C-2), 50.54 (CH<sub>3</sub>, C-9), 50.46 (CH<sub>3</sub>, C-10), 50.40 (CH<sub>3</sub>, C-11), 27.49 (CH<sub>2</sub>, C-6), 15.50 (CH<sub>2</sub>, C-1,4), 12.05 (CH<sub>3</sub>, C-7)

### ***V.8. Ensayo de actividad y determinación de los parámetros cinéticos aparentes $V$ , $K_m$ y $V/K_m$ para sustratos aldehídos***

Los ensayos de velocidad inicial ( $v_0$ ) se realizaron espectrofotométricamente a 30 °C, siguiendo la aparición del producto NADH a 340 nm ( $\epsilon = 6,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) en mezclas de 0,5 mL constituidas por diferentes concentraciones de los sustratos aldehídos y la coenzima NAD<sup>+</sup> en un amortiguador de fosfato de potasio 100 mM a pH 8,0, como se describió en Velasco-García *et al.* (2000). La reacción se inició con la adición de la enzima. Tanto los ensayos como las cinéticas de saturación se hicieron por duplicado, utilizando alícuotas de

## MATERIALES Y MÉTODOS

enzima proveniente de dos purificaciones diferentes. Cada punto de la curva se midió por duplicado en cada ensayo. En los estudios de saturación por un aldehído a concentración fija del  $\text{NAD}^+$ , o viceversa, los datos de velocidad inicial se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1), o a la ecuación de Michaelis-Menten que contempla la inhibición por sustrato (Ecuación 2):

$$v_0 = V [S]/(K_m + [S]) \quad (\text{Ecuación 1}),$$

$$v_0 = V [S]/\{K_m + [S](1 + [S]/K_{iS})\} \quad (\text{Ecuación 2})$$

en las que  $[S]$  es la concentración del sustrato variable,  $K_m$  es la concentración del sustrato a la que se tiene la mitad de la velocidad máxima, y  $K_{iS}$  es la constante de inhibición del sustrato variable.

En los estudios para obtener los patrones de velocidad inicial, los datos de velocidad inicial ( $v_0$ ) obtenidos se ajustaron de forma global a la ecuación correspondiente a un mecanismo Bi-Bi ordenado en estado estacionario (Ecuación 3).

$$v_0 = V [A] [B] / (K_{ia} K_b + K_a [B] + K_b [A] + [A] [B]) \quad (\text{Ecuación 3}),$$

en la que  $v_0$  es la velocidad inicial determinada experimentalmente,  $V$  es la velocidad máxima estimada,  $[A]$  es la concentración de  $\text{NAD}^+$ ,  $[B]$  es la concentración del aldehído,  $K_a$  y  $K_b$  son las constantes de Michaelis-Menten para  $\text{NAD}^+$  y el aldehído, respectivamente, y  $K_{ia}$  es la constante de disociación del complejo E- $\text{NAD}^+$ .

Para obtener los patrones de inhibición del producto NADH frente al  $\text{NAD}^+$  a concentración fija del aldehído, los datos de velocidad inicial se ajustaron en forma global a



la ecuación de inhibición competitiva (Ecuación 4). Para obtener los patrones de inhibición del producto NADH frente a ABAL a concentración fija de la coenzima NAD<sup>+</sup>, los datos de velocidad inicial se ajustaron en forma global a la ecuación de inhibición incompetitiva (Ecuación 5).

$$v_0 = V[A]/\{K_m(1 + [I]/K_{ic}) + [A]\} \quad \text{(Ecuación 4),}$$

$$v_0 = V[A]/\{K_m + [A](1 + [I]/K_{ii})\} \quad \text{(Ecuación 5),}$$

en las que [I] es la concentración de NADH,  $K_{ic}$  es su constante de inhibición competitiva frente al NAD<sup>+</sup> y  $K_{ii}$  es su constante de inhibición incompetitiva frente a ABAL.

En todos los casos, para los ajustes de los datos de velocidad inicial, se usó el programa de cómputo comercial Origin versión 5.0, formulado con el algoritmo de regresión no lineal de Marquardt (1963). Para efectos de visualización, con los parámetros cinéticos estimados con los ajustes a las respectivas ecuaciones, se construyeron gráficas de dobles recíprocos.

### ***V.9. Determinación de la estructura tridimensional de la enzima PaKauB por cristalografía y difracción de rayos X***

Para su cristalización, la enzima PaKauB pura se concentró a 20 mg/mL usando un filtro Ultra 30 (Millipore, Millex-GV, Alemania), y se hicieron lavados exhaustivos con un amortiguador de HEPES/KOH 50 mM, pH 7.0, conteniendo 50 mM de KCl, 0,2 mM de EDTA, 1 % (v/v) de glicerol y DTT 5 mM. Los cristales de la enzima PaKauB se obtuvieron utilizando el método de difusión de vapor en la modalidad de gota colgante en condiciones

## MATERIALES Y MÉTODOS

anaerobias, empleando la condición 22 del kit Cryo (Hampton Research, EUA) que contiene acetato de sodio 0.17 M, Tris-HCl 0.085 M a pH 8.5 como amortiguador, glicerol 15 % (v:v) y polietilenglicol 4,000 (PEG-4000) 25.5 % (p:v). Las gotas se formaron con 3  $\mu$ l de la solución de proteína más 3  $\mu$ l de solución precipitante. Las pruebas de cristalización se incubaron a 18 °C durante aproximadamente 2 semanas hasta que los cristales, que aparecieron en un período de 4 días, alcanzaron su dimensiones máximas. Posteriormente, los cristales se congelaron bajo corriente de nitrógeno y los datos de difracción de rayos X se obtuvieron en la línea 19ID del Advanced Photon Source, Argonne, Illinois, EUA.

Los datos obtenidos en el sincrotrón fueron procesados utilizando el programa XDS (Kabsch, 2010). El escalamiento de los datos se continuó con el paquete de programas de CCP4 (Collaborative, 1994). La determinación de las fases se realizó mediante reemplazo molecular por medio del programa Phaser (McCoy *et al.*, 2007), usando como modelo inicial la estructura de la  $\gamma$ -glutamil- $\gamma$ -aminobutiraldehído de *Burkholderia cenocepacia* J2315 (código PDB 4LIH). Los diferentes ciclos de afinamiento se realizaron usando Phenix (Adams *et al.*, 2010). La inspección visual y las correcciones manuales de la estructura se realizaron con el programa Coot (Emsley y Cowtan, 2004).

Estos experimentos se realizaron con la colaboración de la Dra. Lilian González Segura, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, quien realizó la colecta de los datos, la determinación de la estructura y los ciclos de afinamiento.

### ***V.10. Acoplamiento molecular (“docking”) de los posibles sustratos aldehídos con la enzima PaKauB***

Para realizar el acoplamiento molecular de los aldehídos al sitio activo de la proteína PaKauB se utilizó el programa AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010) asociado al software Chimera (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>). Para ello, se utilizó la estructura cristalográfica de la proteína PaKauB como receptor y se mantuvo rígida durante el acoplamiento molecular. Los ligandos utilizados correspondían a las estructuras de diferentes aldehídos (ABAL, APAL, LAL, PAL) que contenían los átomos pesados (C, N) y los hidrógenos (H). Todas las estructuras de los aldehídos estaban en formato PDB, para ello se dibujaron las estructuras utilizando el programa ChemSketch (<http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>), teniendo cuidado de poner las respectivas cargas cuando era necesario, luego se usó la opción *3D Optimization* para tener las estructuras en forma tridimensional. Los archivos con las estructuras se convirtieron al formato PDB usando el programa PyMOL (<https://www.pymol.org/>). Posteriormente, mediante la opción *Surface/Binding Analysis* de la pestaña *Tools* del software Chimera, se ingresaron las coordenadas de la cisteína catalítica de la enzima (177.41, 58.83, 31.73) que correspondía al centro de la caja que cubría el sitio de unión seleccionado para los ligandos con un tamaño de 15x15x15 Å. Las opciones de optimización para el receptor y para el ligando dadas por el programa no se modificaron. Finalmente se analizaron las 10 poses entregadas por el programa y se seleccionó aquella que mostraba mayor concordancia con lo reportado en la literatura sobre el mecanismo químico de las ALDHs (revisado en Muñoz-Clares *et al.*, 2010; Muñoz-Clares *et al.*, 2011).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el caso de BAL y TMABAL no se usó el programa AutoDock Vina, sino que se hicieron superposiciones con la estructura de la AMADH de *E. coli*. (código PDB: 1WNB) que tiene una molécula de BAL en el túnel de entrada hacia el sitio activo de la enzima. Todas las figuras del análisis de la estructura de la proteína y los acoplamientos moleculares se hicieron con el software Chimera (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>).

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Clonación del gen PA5312 (*PakauB*)

El gen PA5312 (*PakauB*) constituido por 1,491 pares de bases codifica un polipéptido de peso molecular de 53.3 kDa que corresponde a la secuencia de 497 residuos de amino ácidos de una subunidad de la enzima aminoaldehído deshidrogenasa *PaKauB* de *P. aeruginosa*. El gen se clonó a partir del DNA genómico, extraído de la bacteria usando la técnica de PCR, y los oligonucleótidos diseñados con base en la secuencia del gen reportada en la base de datos NCBI, tal como se describió en la sección de Materiales y Métodos. La concentración del DNA genómico extraído se determinó espectrofotométricamente a una  $\lambda=260$  nm y su presencia se confirmó por electroforesis en gel de agarosa (Figura 4). La amplificación del gen *PakauB* a partir del DNA genómico de la bacteria se confirmó por electroforesis en gel de agarosa (Figura 5), en el que se observaron bandas de aproximadamente 1,500 pb, que es el valor esperado para este gen.

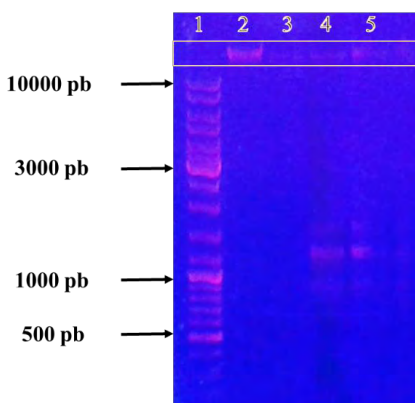
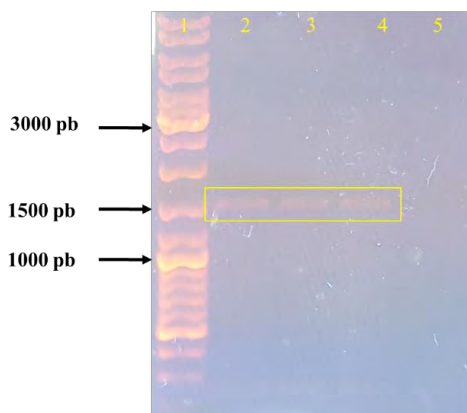


Figura 4. Gel de agarosa mostrando el resultado de la extracción de DNA genómico de la bacteria *P. aeruginosa*. Carriles: 1, marcadores de peso molecular; 2 a 4, DNA genómico obtenido

## RESULTADOS

de la bacteria en diferentes extracciones (bandas enmarcadas en amarillo); 5, control negativo de la PCR que contenía todas las soluciones y sustratos de la reacción menos el DNA genómico de la bacteria.

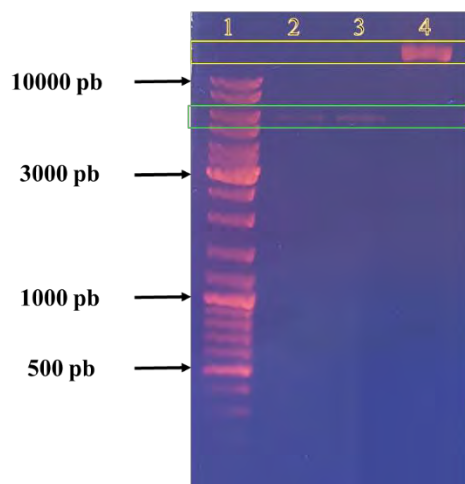


**Figura 5. Gel de agarosa mostrando los productos de la amplificación mediante PCR del gen PA5312 (*PakauB*).** Carriles: 1, marcadores de peso molecular; 2 a 4, producto amplificado (bandas con un tamaño aproximado de 1500 bp enmarcadas en amarillo); 5, control negativo de la PCR en el que la mezcla de reacción contenía todas las soluciones y sustratos menos el DNA genómico de la bacteria.

El resultado de las digestiones del vector pET28b(+) antes de insertar el gen *PakauB* se muestra en el gel de agarosa de la Figura 6. Luego de comprobar que las digestiones fueron exitosas, se procedió a insertar el gen *PakauB* en el vector pET28b(+) de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y métodos. Con el plásmido construido, denominado pET28b(+)-*PakauB*, se transformaron células competentes de *E. coli* XL10-Gold por medio de choque térmico. Se extrajo de ellas el plásmido y se envió a secuenciar, todo ello como se describió en la sección de Materiales y métodos. Los resultados de la secuenciación

## RESULTADOS

confirmaron que el inserto estaba en marco de lectura y que era el gen *PakauB* reportado en la base de datos NCBI (Gene ID: 877979) sin ningún cambio.



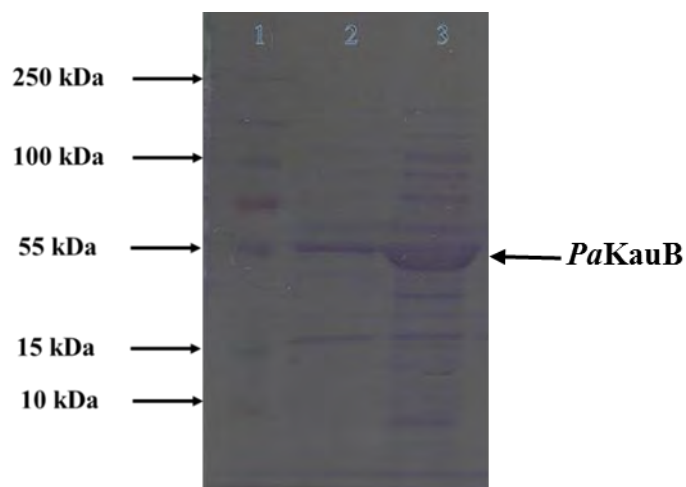
**Figura 6: Gel de agarosa mostrando los productos de la digestión del vector pET28b(+)** antes de insertar el gen *PaKauB* usando las enzimas *NdeI* y *XhoI*. Carriles: 1, marcadores de masa molecular; 2 y 3, plásmido digerido a una concentración de 12 o 17 ng/μL, respectivamente (bandas con un tamaño aproximado de 6,000 bp enmarcadas en verde); 4, plásmido sin digerir a una concentración de 148 ng /μL (banda enmarcada en amarillo). Se puede observar el diferente corrimiento del DNA del vector pET28b(+) sin digerir en la conformación súper enrollada (carril 4) de la conformación lineal del vector digerido (carriles 2 y 3).

### ***VI.2. Sobreexpresión del gen *PakauB* y producción de la enzima recombinante *PaKauB* en células de *E. coli****

El plásmido pET28b(+)-*PakauB*, que consiste en el vector de clonación pET28b(+) con el gen *PakauB* insertado, se usó para transformar células de la cepa *E. coli* BL21 Rosetta (DE3), las que produjeron la proteína *PaKauB* de forma soluble con alto rendimiento (Figura

## RESULTADOS

7, carriles 2 y 3). Los marcadores de masa molecular permitieron identificar la banda de la enzima en una posición que corresponde a una masa molecular aproximada de 55 kDa, un valor muy próximo al teórico de 53.3 kDa. Tras la purificación de la *PaKauB* a partir de las células de *E. coli* BL21 Rosetta (DE3) transformadas, la cantidad de proteína pura obtenida por litro de cultivo de células fue de 27 mg.



**Figura 7.** Gel SDS-PAGE mostrando la producción de la enzima *PaKauB* recombinante en células de *E. coli* BL21 Rosetta DE3 transformadas e inducidas. Carriles: 1, marcadores de masa molecular. 2 y 3, precipitado y sobrenadante, respectivamente, del extracto crudo de estas células.

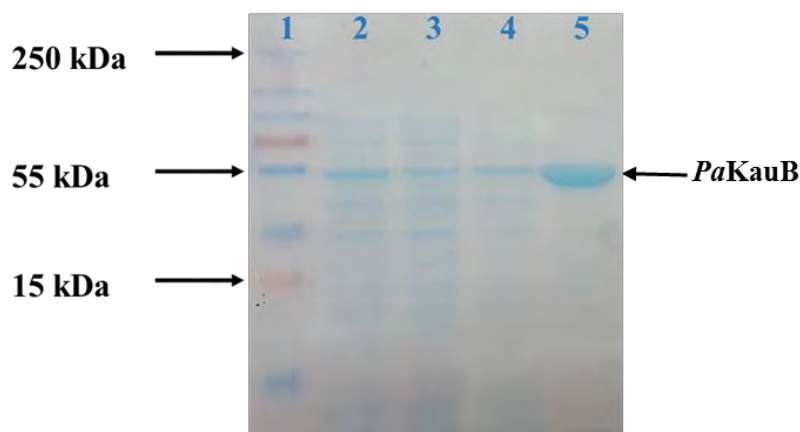
### ***VI.3. Purificación a homogeneidad de la enzima PaKauB***

La purificación se llevó a cabo en un solo paso, una cromatografía de afinidad a Ni, como se describió en la sección de Materiales y métodos. Tras la cromatografía de afinidad, la pureza de la enzima *PaKauB* eluida de la columna se comprobó al observar una única banda de proteína en SDS-PAGE (Figura 8). La actividad específica de la enzima *PaKauB*



## RESULTADOS

pura fue 21.2 U/mg de proteína usando el ABAL (1.5 mM) como sustrato y NAD<sup>+</sup> (0.8 mM) como coenzima (Tabla 3).



**Figura 8. Gel SDS-PAGE** mostrando el resultado de la purificación de la enzima *PaKauB*.

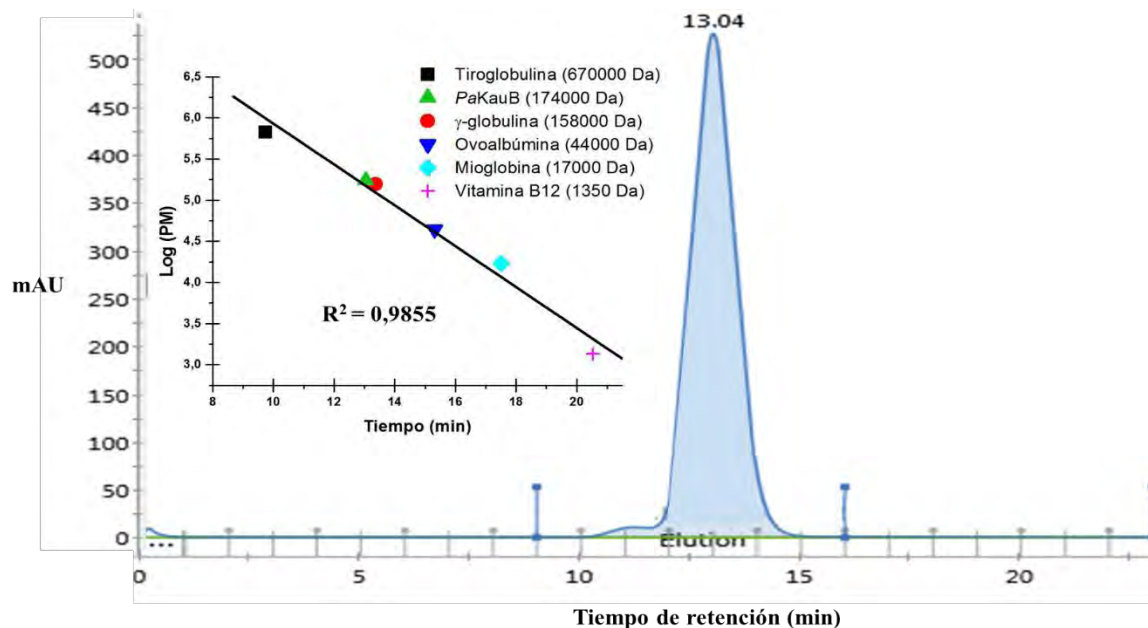
Carriles: 1, marcadores de masa molecular; 2, sobrenadante del extracto crudo (17 µg de proteína total aplicados); 3, fracción de proteína no unida a la columna de afinidad (18 µg de proteína total aplicados); 4, fracción obtenida tras el lavado de la columna de afinidad (7 µg de proteína total aplicados); 5, fracciones 1, 2, 3 y 4 eluidas de la columna de afinidad y reunidas (7 µg de proteína total aplicados).

**Tabla 3. Resultados de la purificación de la enzima *PaKauB* mediante cromatografía de afinidad.** Se inició con 2 L del cultivo de bacterias en fase estacionaria.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (Unidades)	Actividad específica (U/mg de proteína)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1441	4013	3	1.0	100
Cromatografía de afinidad	87	1841	21.2	7	46

***VI.4. Determinación del estado oligomérico de la enzima PaKauB***

La cromatografía de exclusión molecular de la enzima recombinante *PaKauB* pura mostró dos picos (Figura 9), el primero en un tiempo de retención de 11 min con una masa molecular de 519 kDa, con mucha menor área respecto al segundo pico que aparece en un tiempo de retención de 13.04 min y que es muy simétrico, lo que indica la pureza de la proteína que eluye en este pico. De acuerdo a la curva de calibración utilizada (Figura 9, inserto), este segundo pico es el de una proteína de 174 kDa, lo que con base a la masa molecular del monómero (53.3 kDa) puede corresponder a un trímero o a un tetramero. Sin embargo, no hay a la fecha reportado un cristal de una ALDH que presente una estructura cuaternaria trimérica, la que además no es consistente con el arreglo de dímeros o dímero de dímeros que presentan estas enzimas. Si se conoce que algunas ALDHs tetraméricas presentan este patrón de elución anormal en SEC (Mori *et al.*, 1980; Falkenberg y Strøm, 1990; Velasco-García *et al.*, 1999), por lo que asumimos que la enzima es tetramérica, lo que se confirmó luego al obtener su estructura cristalográfica. El pico de mayor área presentó una actividad específica de 21.2 U/mg, mientras que el primer pico no presentó actividad, indicando que estos agregados de proteína son inactivos.



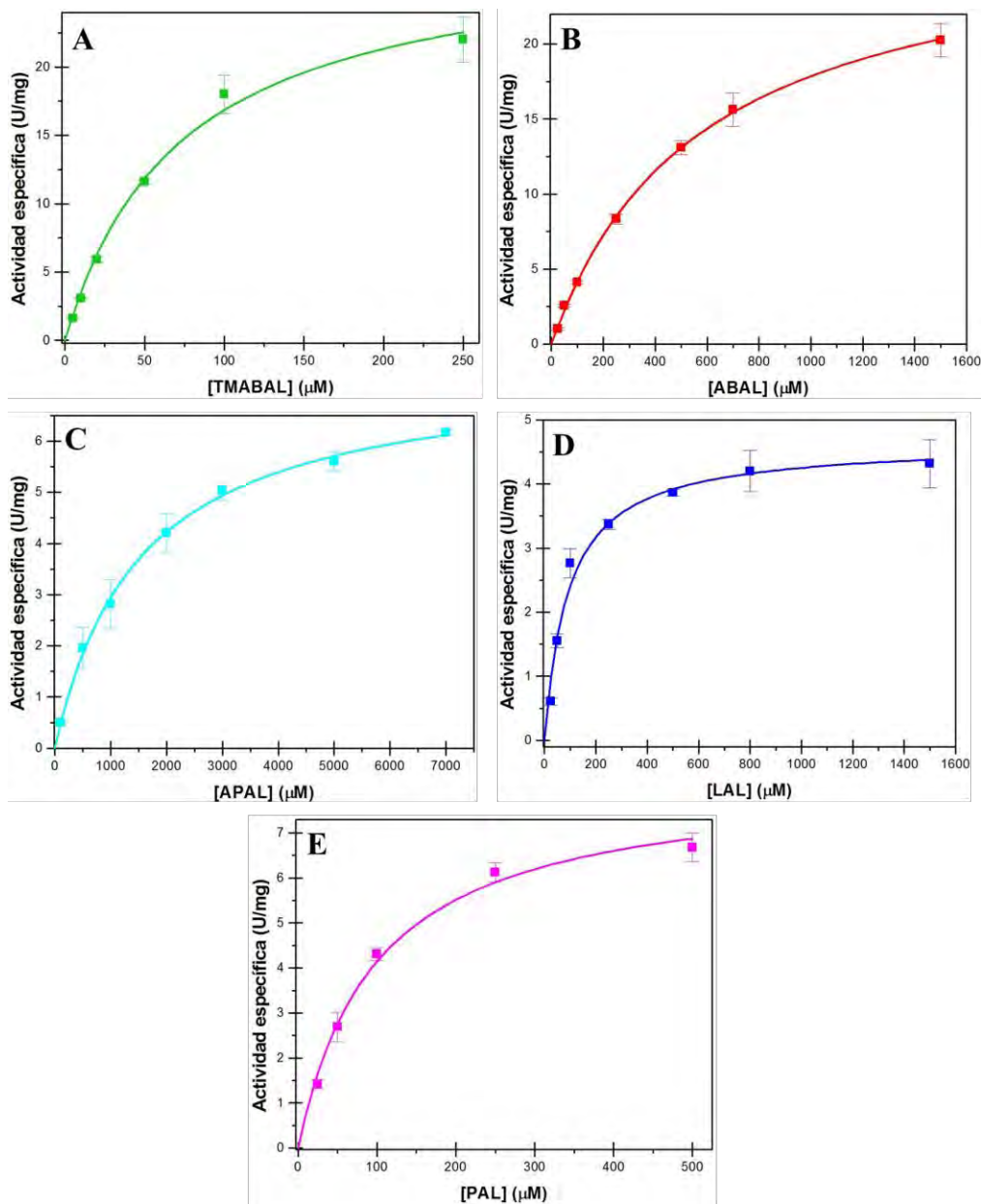
**Figura 9. Perfil de elución de la enzima PaKauB de la cromatografía de exclusión molecular.** Inserto: curva de calibración de los estándares de masa molecular. La cantidad de proteína total aplicada fue 5 mg. La absorbancia a 280 nm está dada en miliunidades de absorbancia (mAU).

***VI.5. Determinación de los parámetros cinéticos aparentes  $V$ ,  $K_m$  y  $V/K_m$  para sustratos aldehídos***

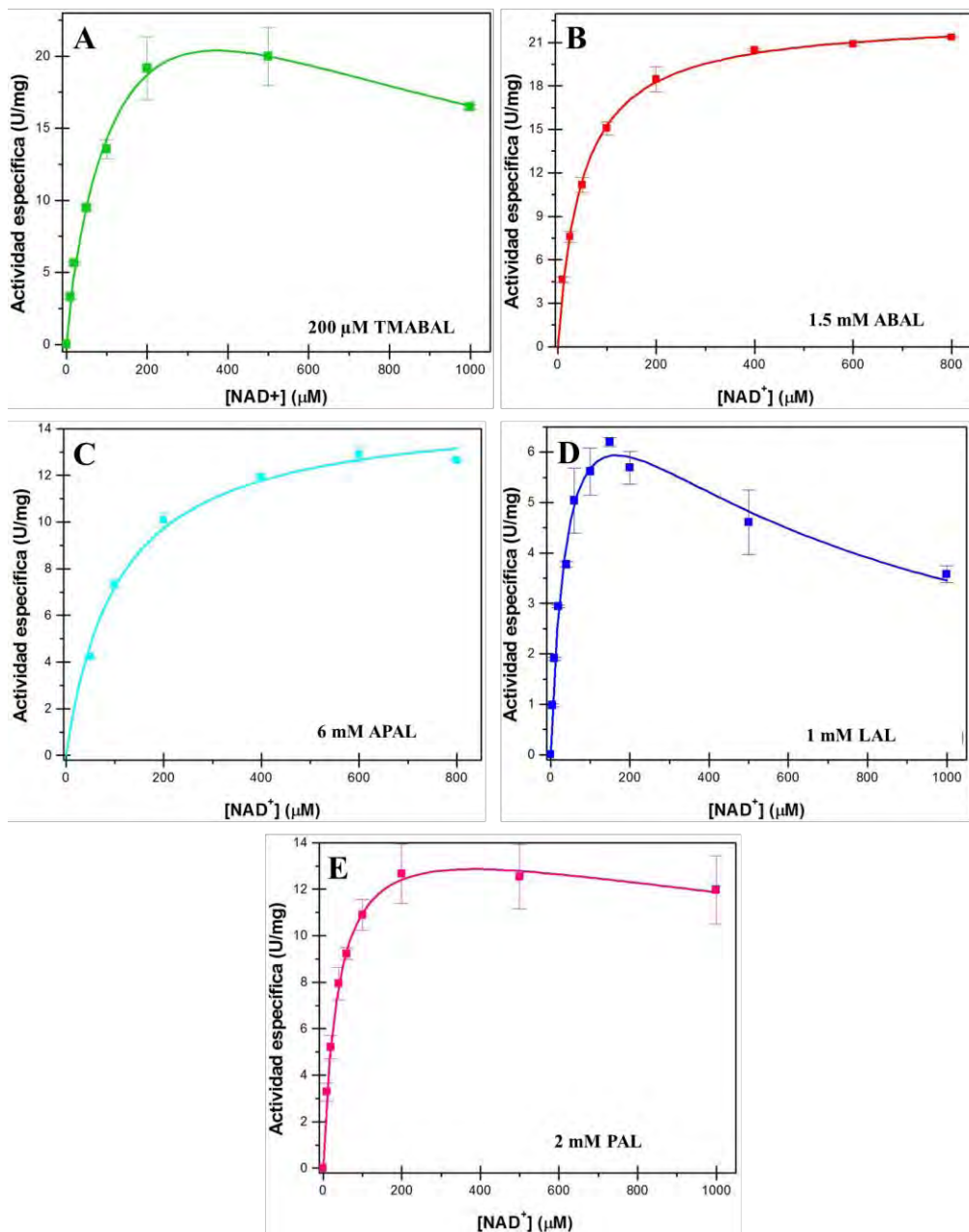
Después de obtener pura la forma recombinante de la enzima PaKauB se estudió su especificidad para tratar de conocer cuál o cuáles aldehídos son los sustratos fisiológicos usados por la enzima. Para ello, se usaron aquellos aldehídos que han sido reportados en la literatura como sustratos de la enzima PaKauB: ABAL (Jann *et al.*, 1988) y TMABAL (Hassan *et al.*, 2008); aldehídos que han sido reportados como sustratos de otras enzimas AMADHs bacterianas: 3-APAL (Tanaka *et al.*, 2001), BAL (Nagasawa *et al.*, 1976; Velasco-García *et al.*, 2006); o aldehídos que son usados por ALDHs de baja especificidad LAL (Baldoma y Aguilar, 1987; Watanabe *et al.*, 2008) y PAL (Ho y Weiner, 2005). También se

## RESULTADOS

hicieron ensayos cinéticos para determinar cuál es la preferencia de la *PaKauB* por la coenzima, encontrándose que no usa  $\text{NADP}^+$  como coenzima. Tampoco usa a BAL como sustrato; el resto de los sustratos probados si fueron oxidados por la enzima. Las cinéticas de saturación por estos aldehídos a una concentración fija de  $\text{NAD}^+$  de 0.6 mM, que es la estimada fisiológica en *E. coli* (Zhou *et al.*, 2011) se muestran en la Figura 10 y los parámetros cinéticos aparentes estimados a partir de estos datos se incluyen en la Tabla 4. Igualmente, se hicieron cinéticas de saturación por  $\text{NAD}^+$  a concentraciones fijas subinhibitorias de los aldehídos. Los resultados se muestran en la Figura 11 y en la Tabla 4. Las constantes de especificidad aparentes para los aldehídos y para la coenzima se expresan como  $V/K_m^{\text{aldehído}}$  y  $V/K_m^{\text{dinucleótido}}$ . Las cinéticas de saturación se realizaron como se describió en la sección de Materiales y métodos.



**Figura 10. Curvas de saturación de la enzima *PaKauB* con los aldehídos como sustrato variable. TMABAL (A), ABAL (B), APAL (C), LAL (D) Y PAL (E) como sustratos variables dejando la concentración de  $\text{NAD}^+$  constante a  $600 \mu\text{M}$ . En las gráficas, los puntos son el promedio de los valores experimentales obtenidos; las líneas trazadas son las calculadas a partir del mejor ajuste global de estos datos a la Ecuación 1 mediante regresión no lineal. Las barras verticales indican la desviación estándar del valor promedio de los datos.**



**Figura 11.** Curvas de saturación de la enzima *PaKauB* con  $\text{NAD}^+$  como sustrato variable dejando la concentración de los aldehídos constante y subinhibitoria, TMABAL 200  $\mu\text{M}$  (A), ABAL 1.5 mM (B), APAL 6 mM (C), LAL 1 mM (D) y PAL 2 mM (E). En las gráficas, los puntos son el promedio de los valores experimentales obtenidos; las líneas trazadas son las calculadas a partir del mejor ajuste global de estos datos a la Ecuación 1 (B y C) y a la Ecuación 2 (A, D y E) mediante

## RESULTADOS

regresión no lineal. Las barras verticales indican la desviación estándar del valor promedio de los datos.

**Tabla 4. Parámetros cinéticos aparentes de la enzima *PaKauB* obtenidos con diferentes aldehídos.** Los valores de los parámetros cinéticos se obtuvieron por el ajuste de los datos experimentales mostrados en las Figuras 10 y 11. El símbolo  $\pm$  indica el error (desviación estándar) de los valores estimados.

Sustrato variable	Sustrato fijo	$V$ ( $\mu\text{mol. min}^{-1}$ , $\text{mg proteína}^{-1}$ )	$K_m^{\text{aldehído}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V/K_m^{\text{aldehído}}$	$K_m^{\text{dinucleótido}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V/K_m^{\text{dinucleótido}}$
TMABAL	NAD <sup>+</sup> (600 $\mu\text{M}$ )	29.1 $\pm$ 1.6	73 $\pm$ 10	0.40		
NAD <sup>+</sup>	TMABAL (200 $\mu\text{M}$ )	34.3 $\pm$ 4.4			125 $\pm$ 29	0.3
ABAL	NAD <sup>+</sup> (600 $\mu\text{M}$ )	28.1 $\pm$ 0.5	574 $\pm$ 25	0.05		
NAD <sup>+</sup>	ABAL (1.5 mM)	22.7 $\pm$ 0.3			49 $\pm$ 3	0.5
APAL	NAD <sup>+</sup> (600 $\mu\text{M}$ )	7.5 $\pm$ 0.2	1528 $\pm$ 103	0.005		
NAD <sup>+</sup>	APAL (6 mM)	14.9 $\pm$ 0.5			107 $\pm$ 13	0.14
LAL	NAD <sup>+</sup> (600 $\mu\text{M}$ )	4.6 $\pm$ 0.2	93 $\pm$ 22	0.05		
NAD <sup>+</sup>	LAL (1 mM)	9.1 $\pm$ 0.7			44 $\pm$ 7	0.21
PAL	NAD <sup>+</sup> (600 $\mu\text{M}$ )	8.2 $\pm$ 0.4	99 $\pm$ 14	0.08		
NAD <sup>+</sup>	PAL (2 mM)	15.4 $\pm$ 0.3			38 $\pm$ 2	0.4

De acuerdo con los valores de  $V/K_m^{\text{aldehído}}$  aparentes de la Tabla 4, el TMABAL parece ser con mucho el mejor sustrato para *PaKauB* bajo condiciones de concentración de coenzima fisiológicas, seguido de ABAL, PAL, LAL y por último APAL, el que tiene un valor de  $V/K_m^{\text{aldehído}}$  dos órdenes de magnitud por debajo de aquel para TMABAL y un orden de magnitud por debajo de aquel para ABAL.

### ***VI.6 Determinación del mecanismo cinético de PaKauB usando ABAL como sustrato***

El mecanismo cinético de la enzima *PaKauB* se investigó determinando los patrones de velocidad inicial de las reacciones con ABAL y los patrones de inhibición por el producto NADH *versus* NAD<sup>+</sup> y *versus* ABAL.

#### *VI.6.1 Patrones de velocidad inicial*

Los patrones de velocidad inicial para ABAL (Figura 12) se obtuvieron a concentraciones fijas variables del aldehído y subsaturantes para evitar la inhibición por sustrato que se presenta a concentraciones altas de este; la concentración de NAD<sup>+</sup> se varió en un intervalo de 0 a 800  $\mu$ M, en donde se empezaba a observar la saturación por la coenzima. Cuando los datos se graficaron como dobles recíprocos se observó que las líneas se cruzan a la izquierda del eje de ordenadas y debajo del eje de abscisas, es decir en el tercer cuadrante, lo que indica que el mecanismo es secuencial, como se ha descrito para la mayor parte de las ALDHs cuyo mecanismo cinético ha sido estudiado (Feldman y Weiner, 1972; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993; Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000). Los datos obtenidos se ajustaron bien a la ecuación correspondiente a un mecanismo cinético Bi Bi ordenado en estado estacionario (Ecuación 1) en el que consideramos que NAD<sup>+</sup> es el primer sustrato que se une a la enzima seguido por el aldehído, igualmente como se ha descrito para otras ALDHs (Feldman y Weiner, 1972; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993; Velasco-García *et al.*, 2000). Los parámetros cinéticos estimados se incluyen en la Tabla 5. Las



constantes de especificidad para la coenzima y para el aldehído se expresan como  $k_{cat}/K_a$  y  $k_{cat}/K_b$ , respectivamente.

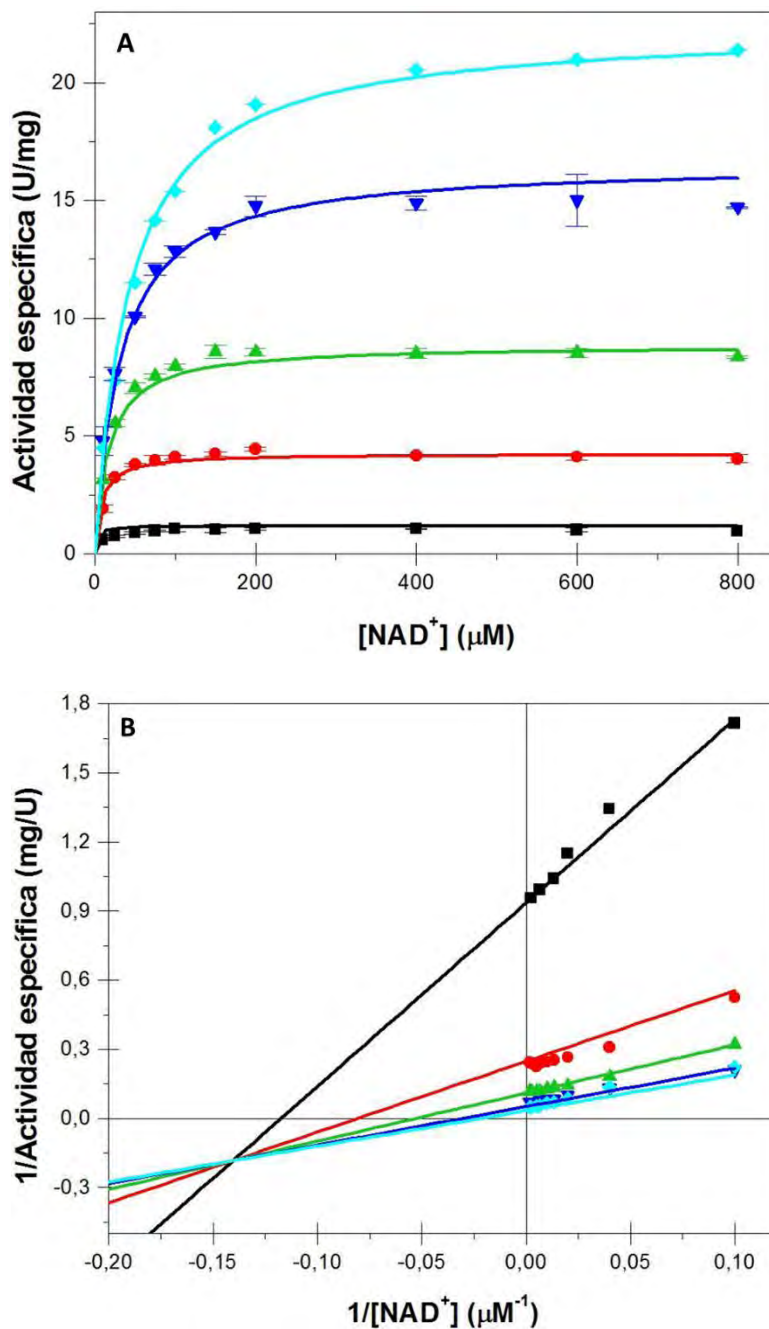


Figura 12. Patrones de velocidad inicial de la reacción de la enzima *PaKauB* con ABAL. A. Gráfica directa. B. Gráfica de dobles recíprocos. La coenzima NAD<sup>+</sup> se varió en el intervalo de 10 a

## RESULTADOS

800  $\mu\text{M}$  a las concentraciones fijas variables de ABAL  $\blacksquare$  25,  $\bullet$  100,  $\blacktriangle$  250,  $\blacktriangledown$  700 y  $\blacklozenge$  1500  $\mu\text{M}$ . En las gráficas, los puntos son el promedio de los valores experimentales obtenidos; las líneas trazadas son las calculadas a partir del mejor ajuste global de estos datos a la Ecuación 3 mediante regresión no lineal. Las barras verticales indican la desviación estándar del valor promedio de los datos.

**Tabla 5. Parámetros cinéticos de la enzima PaKauB obtenidos con ABAL como sustrato.** Los valores de los parámetros cinéticos se obtuvieron por el ajuste de los datos experimentales mostrados en la Figura 12. El símbolo  $\pm$  indica el error (desviación estándar) de los valores estimados.

Parámetro cinético	Valor estimado
$V$	$32.2 \pm 0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$
$k_{\text{cat}}$	$28.6 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$
$K_{\text{ia}}$	$0.1 \pm 0.0 \mu\text{M}$
$K_{\text{m}}^{\text{NAD}^+}$	$61 \pm 3 \mu\text{M}$
$K_{\text{m}}^{\text{ABAL}}$	$662 \pm 27 \mu\text{M}$
$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{NAD}^+}$	$4.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{ABAL}}$	$4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$V/K_a$	$8.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
$V/K_b$	$8.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

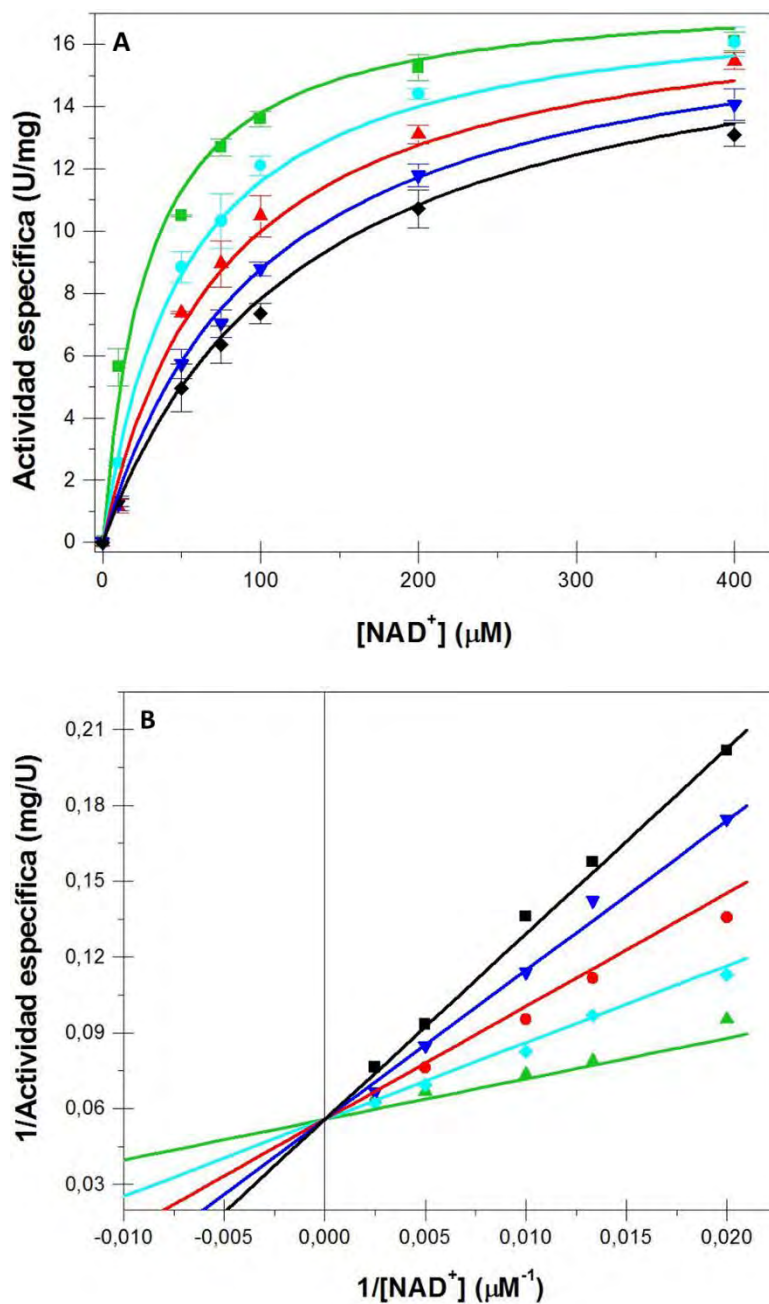
### VI.6.2 Patrones de inhibición por producto

Para investigar más a fondo el mecanismo cinético de la enzima PaKauB, tomando como ejemplo la reacción de oxidación de ABAL, se realizaron estudios de inhibición por el producto NADH frente a  $\text{NAD}^+$  dejando ABAL constante a 700  $\mu\text{M}$ , una concentración que

## RESULTADOS

es aproximadamente igual a su  $K_m$ , así como estudios de inhibición por NADH frente a ABAL dejando  $\text{NAD}^+$  constante a  $60 \mu\text{M}$ , igualmente una concentración que es muy próxima a su  $K_m$  (ver los datos de la Tabla 5). Los parámetros cinéticos estimados a partir de los resultados de velocidad inicial obtenidos se presentan en la Tabla 6. Las constantes de afinidad aparentes para ABAL y  $\text{NAD}^+$  se expresan como  $K_m$  y las constantes de inhibición por NADH se expresan como  $K_i$ . Las cinéticas de saturación se realizaron como se describió en la sección de Materiales y métodos.

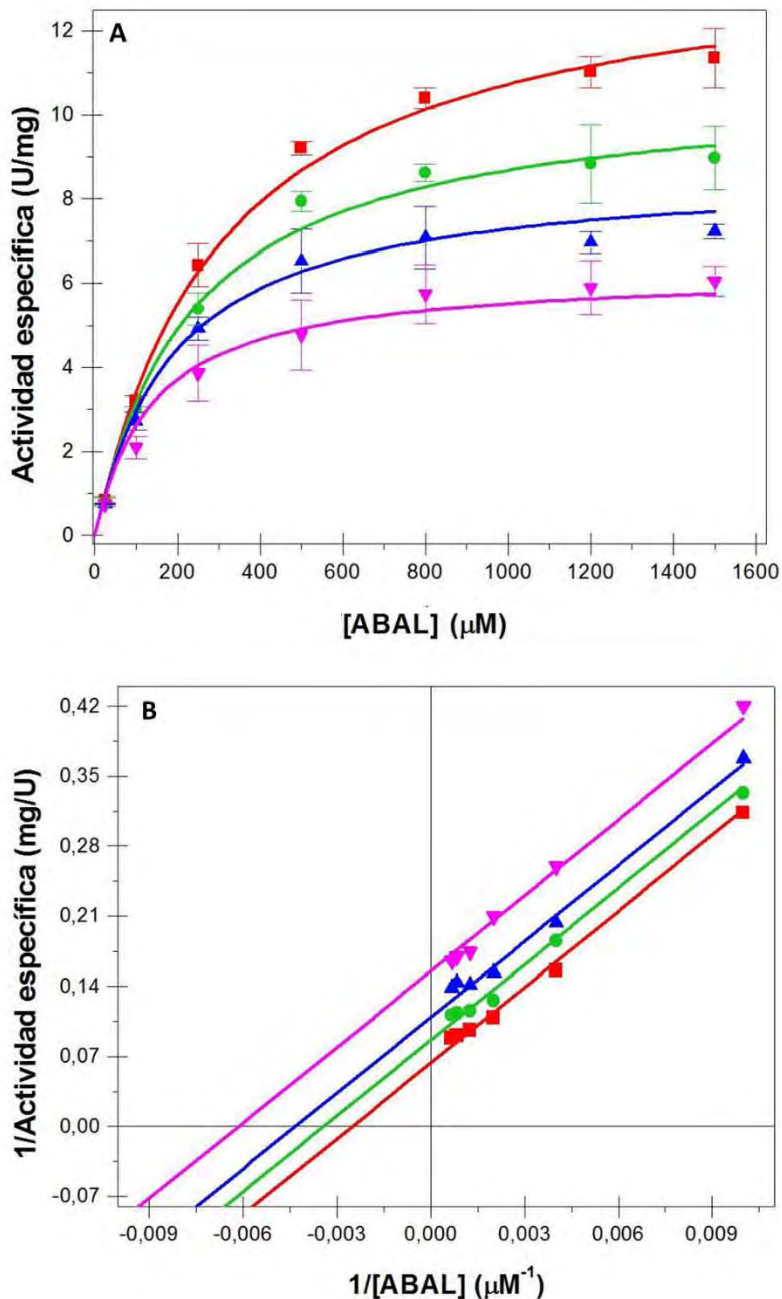
Los datos de los patrones de inhibición de NADH frente a  $\text{NAD}^+$  se ajustaron bien a la Ecuación 4 correspondiente a una inhibición competitiva (Figura 13), indicando que el  $\text{NAD}^+$  y el NADH se unen al mismo subsitio del sitio activo y a la misma forma de la enzima, que consideramos que es la enzima libre. Los datos de inhibición del NADH frente a ABAL se ajustaron a la Ecuación 5 que corresponde a una inhibición incompetitiva (Figura 14), lo que indica que el NADH se une a una forma de la enzima que no está unida por pasos reversibles con la que une al ABAL. En conjunto, estos resultados parecen sugerir que el mecanismo cinético pudiera ser ordenado pero con ABAL uniéndose antes que  $\text{NAD}^+$ , como se discutirá más adelante.



**Figura 13. Patrones de inhibición por NADH con respecto a  $NAD^+$  de la enzima PaKauB.** A. Gráfica directa. B. Gráfica de dobles recíprocos. La coenzima  $NAD^+$  se varió en un intervalo de 10 a 400  $\mu M$  a una concentración fija de ABAL de 700  $\mu M$  y a las concentraciones fijas variables de NADH:  $\blacksquare$  0,  $\bullet$  25,  $\blacktriangle$  50,  $\blacktriangledown$  75,  $\blacklozenge$  100  $\mu M$ . En las gráficas, los puntos son el promedio de los valores experimentales obtenidos; las líneas trazadas son las calculadas a partir del mejor ajuste global de

## RESULTADOS

estos datos a la Ecuación 4 mediante regresión no lineal. Las barras verticales indican la desviación estándar del valor promedio de los datos.



**Figura 14. Patrones de inhibición por NADH con respecto a ABAL de la enzima *PaKauB*. A. Gráfica directa. B. Gráfica de dobles recíprocos. El aldehído ABAL se varió en un intervalo de 25 a 1,500  $\mu\text{M}$  a una concentración fija de  $\text{NAD}^+$  de 60  $\mu\text{M}$  y a las concentraciones fijas variables de**

## RESULTADOS

NADH: ■ 0, ● 25, ▲ 50, ▼ 100  $\mu\text{M}$ . En las gráficas, los puntos son el promedio de los valores experimentales obtenidos; las líneas trazadas son las calculadas a partir del mejor ajuste global de estos datos a la Ecuación 5 mediante regresión no lineal. Las barras verticales indican la desviación estándar del valor promedio de los datos.

**Tabla 6. Constantes de inhibición por el producto NADH frente a  $\text{NAD}^+$  y ABAL en la reacción  $\text{NAD}^+$ -dependiente de la enzima *PaKauB*.** Los valores de los parámetros cinéticos se obtuvieron por el ajuste de los datos experimentales mostrados en las Figuras 13 y 14. Los valores de  $K_m$  son aparentes. El símbolo  $\pm$  indica el error (desviación estándar) de los valores estimados.

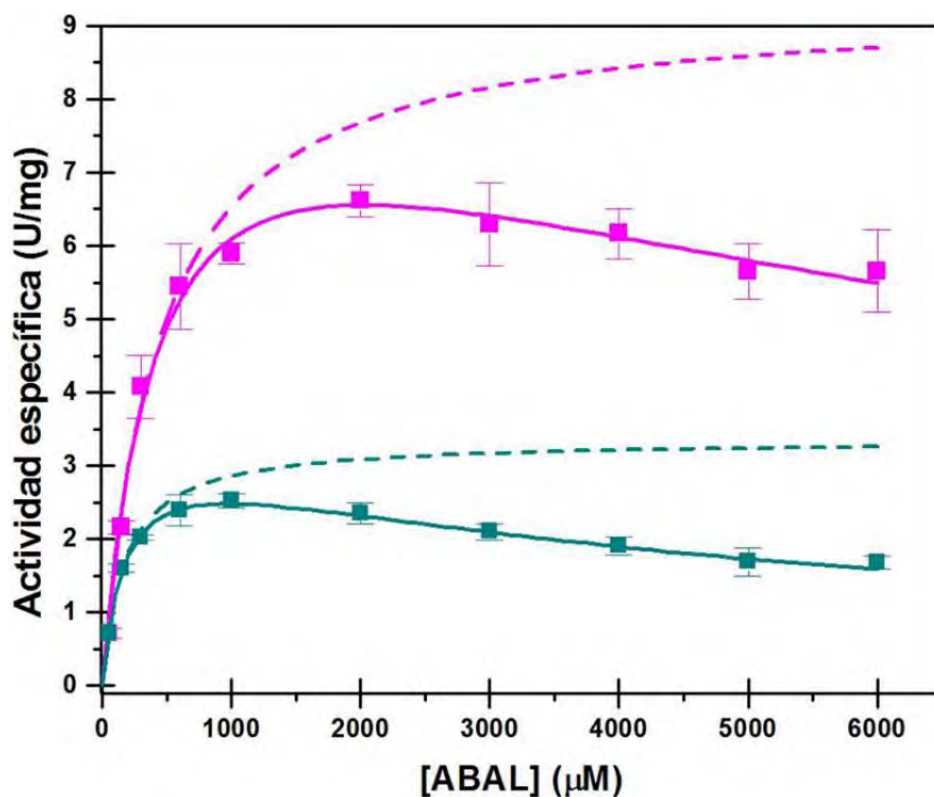
Sustrato variable	Sustrato fijo	Patrón	$V$ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{ic}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{ii}$ ( $\mu\text{M}$ )
$\text{NAD}^+$	4-ABAL (700 $\mu\text{M}$ )	C	$17.9 \pm 0.5$	$28.9 \pm 3.8$	$28.1 \pm 3.7$	
4-ABAL	$\text{NAD}^+$ (60 $\mu\text{M}$ )	I	$15.7 \pm 0.7$	$397 \pm 24$		$69.6 \pm 6.1$

Alternativamente, la inhibición por ABAL que se presenta a altas concentraciones pudiera ser responsable de este comportamiento. Para explorar si esta inhibición se incrementaba en presencia de NADH, se hizo el experimento cuyo resultado se muestra en la Figura 15. Para ello, se hicieron curvas de saturación de la *PaKauB* con ABAL dejando  $\text{NAD}^+$  constante a una concentración de 60  $\mu\text{M}$ , que es una concentración cercana a su  $K_m$  (ver Tabla 5), en ausencia de NADH (curva azul) o en presencia de una concentración constante de NADH de 100  $\mu\text{M}$  (curva verde).

Los parámetros cinéticos estimados a partir de los resultados de velocidad inicial obtenidos se presentan en la Tabla 7. Las constantes de disociación aparente para los sustratos

## RESULTADOS

se expresan como  $K_m$  y la constante de inhibición por sustrato se expresa como  $K_{iS}$ . Las cinéticas de saturación se realizaron como se describió en la sección de Materiales y métodos.



**Figura 15.** Curvas de saturación de la enzima *PaKauB* con ABAL a  $\text{NAD}^+$  constante a una concentración de 60  $\mu\text{M}$ . Los símbolos y la curva magenta muestran la saturación en ausencia de NADH y los símbolos y la curva cian oscuro la saturación en presencia de una concentración constante de NADH de 100  $\mu\text{M}$ . Los puntos son los valores experimentales obtenidos y las líneas trazadas sobre ellos son las calculadas a partir del mejor ajuste de estos datos mediante regresión no lineal a la Ecuación 2. Las barras verticales indican la desviación estándar del promedio de los experimentos. Nótese que antes de alcanzarse la  $V$  la velocidad empieza a disminuir por efecto de la inhibición por altas concentraciones de sustrato. Las líneas punteadas son curvas de saturación simuladas usando la ecuación que no considera inhibición por sustrato (Ecuación 1) y los parámetros  $V$  y  $K_m$  estimados por medio de la Ecuación 2.

## RESULTADOS

**Tabla 7. Constantes cinéticas aparentes de la enzima *PaKauB* estimadas en cinéticas de saturación por ABAL en ausencia y en presencia de NADH 100  $\mu\text{M}$ .** Los valores de los parámetros se obtuvieron por medio de un ajuste de los datos de velocidad inicial mostrados en la Figura 15 a la Ecuación 2, que corresponde a la ecuación de Michaelis-Menten que contempla inhibición por sustrato. El símbolo  $\pm$  indica el error (desviación estándar) de los valores estimados.

[NADH] $\mu\text{M}$	$V$ ( $\mu\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{mg}$ proteína $^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{IS}$ ( $\mu\text{M}$ )
0	$9.3 \pm 0.7$	$426 \pm 66$	$9589 \pm 2155$
100	$3.4 \pm 0.1$	$171 \pm 20$	$5542 \pm 640$

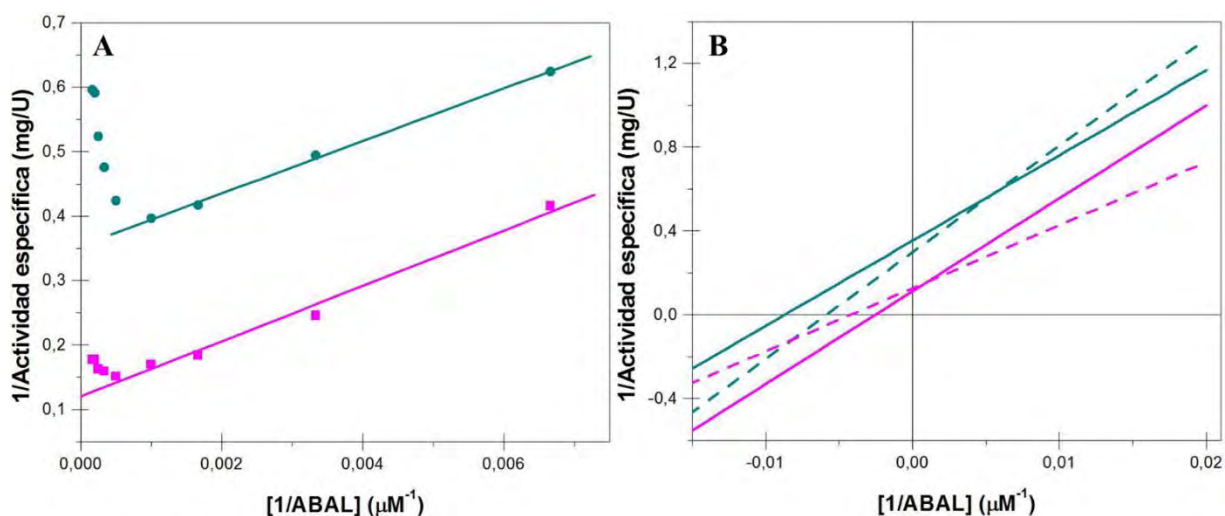
Al comparar las dos curvas de saturación y los parámetros cinéticos estimados, se observa que la inhibición por sustrato aumenta significativamente cuando el ensayo se hace en presencia de NADH y la  $K_m$  aparente para el ABAL disminuye. Esto es consistente con la propuesta de que el mecanismo de inhibición por sustrato de *PaKauB* sea como el propuesto para la BADH de amaranto (Vojtechová *et al.*, 1997), en el que el sustrato se puede unir al complejo E-NADH dando lugar a un complejo no productivo E-NADH-ABAL. Por tanto, la inhibición por sustrato aumenta cuanto mayor es la concentración del complejo E-NADH. Además, este resultado nos ayuda a interpretar los datos del patrón de inhibición de NADH frente a ABAL.

Cuando se dibujan las gráficas de dobles recíprocos utilizando los datos experimentales de la Figura 15 y los parámetros cinéticos estimados, se obtiene un patrón de líneas paralelas (Figura 16A) como corresponde a la inhibición de tipo incompetitiva. Pero si las líneas se dibujan considerando los parámetros cinéticos estimados con los datos experimentales y no teniendo en cuenta la inhibición por sustrato, el patrón que se obtiene es



## RESULTADOS

el intersecante característico de una inhibición mixta (Figuras 16B). Esto apoya nuestra suposición de que, en ausencia de la inhibición por el sustrato aldehído, los patrones de inhibición por NADH frente a ABAL habrían mostrado la inhibición mixta consistente con el mecanismo Bi Bi Ordenado en estado estacionario en el que el  $\text{NAD}^+$  es el primer sustrato en unirse a la enzima y el NADH el último producto en liberarse.



**Figura 16. Efecto del NADH sobre la inhibición por sustrato de la enzima *PaKauB* por ABAL.** Gráfica de dobles recíprocos de los datos de velocidad inicial obtenidos experimentalmente. (A) Los puntos son los valores experimentales mostrados en la Figura 15; las líneas trazadas sobre los puntos son las teóricas obtenidas si el ajuste de los datos de velocidad inicial se hace a la ecuación que contempla la inhibición por sustrato, como en la Figura 15. Nótese la desviación de los puntos experimentales de la recta a altas concentraciones del sustrato, lo que es característico de la inhibición por sustrato. (B) Comparación entre las líneas obtenidas en (A) (líneas continuas) y las líneas que se obtendrían con los parámetros cinéticos estimados y si no se considera la inhibición por sustrato (líneas punteadas). Los colores de los puntos y líneas son iguales a los mostrados en la Figura 15: magenta en ausencia y cian oscuro en presencia de  $100 \mu\text{M}$  NADH.

## RESULTADOS

Por tanto, estos resultados apoyan que la inhibición incompetitiva, obtenida en los patrones de inhibición donde se varió el aldehído a concentraciones fijas variables de NADH, es el resultado de la inhibición por sustrato que se hace más acusada por la presencia de NADH. Esto hace que a las altas concentraciones de ABAL se obtengan valores más bajos de velocidad inicial que los que se deberían obtener si no existiera la inhibición por sustrato, dando como resultado un patrón de curvas paralelas en lugar del patrón de líneas que se cruzan.

### *VI.7. Determinación de la estructura tridimensional de la enzima PaKauB por cristalografía y difracción de rayos X*

La estructura tridimensional de la enzima PaKauB fue obtenida a 2.55 Å de resolución. El cristal pertenece al grupo espacial C121 y contiene cuatro subunidades en la unidad asimétrica que corresponde a la unidad biológica de la enzima. El modelo final en breve será sometido al PDB. Todos los datos estadísticos de la colecta y el refinamiento se resumen en la Tabla 8.

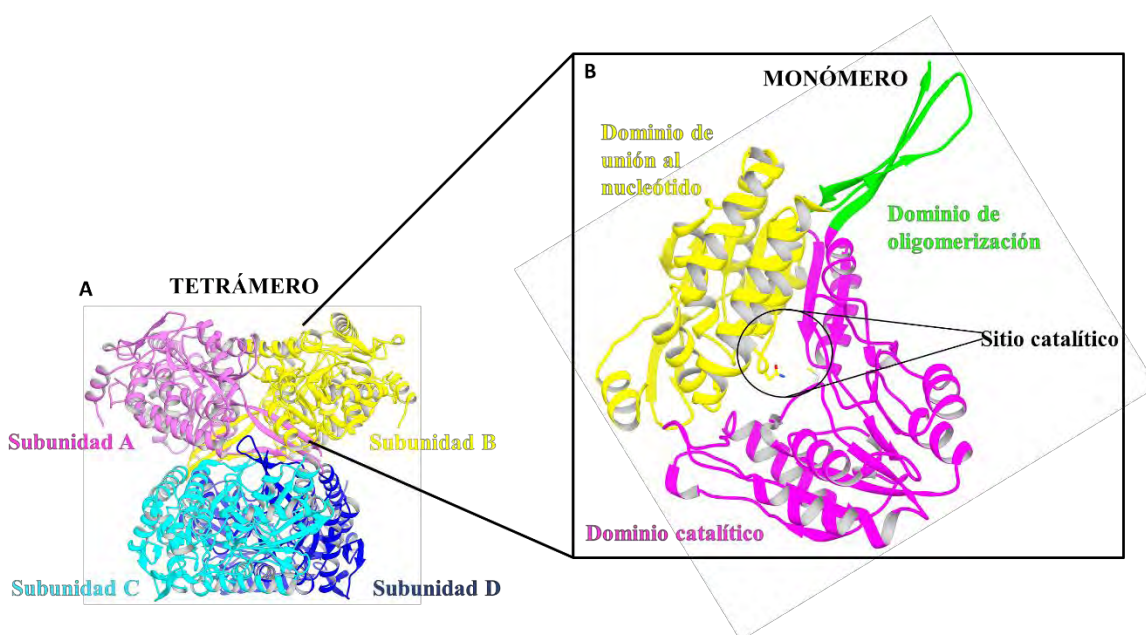
**Tabla 8. Estadística de los cristales y del refinamiento del modelo de la estructura tridimensional de la enzima PaKauB**

<b>Estadística de la colecta de datos<sup>a</sup></b>	
Grupo especial	C121
Dimensiones de la celda	
$a, b, c$ (Å)	177.64, 93.81, 128.86
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.00, 92.28, 90.00
Contenido en la unidad asimétrica	tetramero
Intervalo de resolución (Å)	47.18 (2.55)
Reflexiones únicas	432,312 (68,752)
Integridad (%)	99.4 (99.7)
$I/\sigma - \text{Mean } I/\sigma$ (I)	4.5 (1.8)-10.5 (4.4)
$R_{\text{merge}}$ (%)	11.1 (37.0)
$CC_{1/2}$	0.99 (0.88)
Multiplidad	6.3 (6.4)
Coefficiente de Matthews	2.52
Contenido de solvente (%)	51.22
<b>Afinamiento</b>	
$R_{\text{work}}$ (%)	16.18
$R_{\text{free}}$ (%)	21.93
Valores $B$ promedio (Å <sup>2</sup> )	24.90
<i>Ramachandran plot</i> (%)	
Regiones más favorecidas	95.33
Regiones adicionales permitidas	3.46
Regiones no permitidas	1.21

<sup>a</sup>Valores entre paréntesis corresponden a la franja de alta resolución.

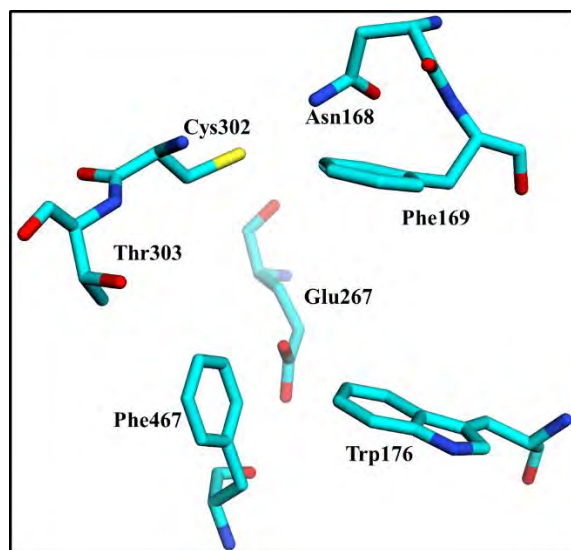
## RESULTADOS

Los cristales de la enzima, como muchas de las ALDHs de estructura 3D conocida, están constituidos por homotetrámeros, que son dímeros de dímeros (Figura 17A). En cada subunidad del tetrámero se encuentran los tres dominios característicos del plegamiento de las enzimas de la superfamilia de las ALDHs (Liu *et al.*, 1997): dominio de oligomerización, dominio de unión a la coenzima y dominio catalítico en el que se encuentra el sitio catalítico de la enzima (Figura 17B).



## RESULTADOS

En las cuatro subunidades de la estructura encontramos a la cisteína catalítica (Cys302) en la conformación llamada “*de descanso*” y al Glu catalítico (Glu267) en la conformación “*intermedia*” (González-Segura *et al.*, 2009). Encontramos también tres residuos aromáticos (Phe169, Trp176 y Phe467) que corresponden a los que forman la caja de aromáticos descrita en otras AMADHs (Díaz-Sánchez *et al.*, 2012; Riveros-Rosas *et al.*, 2013), y que ayudan a la unión del sustrato aminoaldehído en el sitio activo mediante interacciones catión- $\pi$ . La asparagina catalítica (Asn168) está en la posición observada en el resto de los cristales de ALDHs reportados a la fecha, posición que le permite junto con el nitrógeno amídico de la Cys302 formar la cavidad del oxianión, ayudando a la estabilización del oxígeno cargado negativamente que se genera cuando se da el ataque nucleofílico de la cisteína catalítica al carbono carbonílico del sustrato (Figura 18).

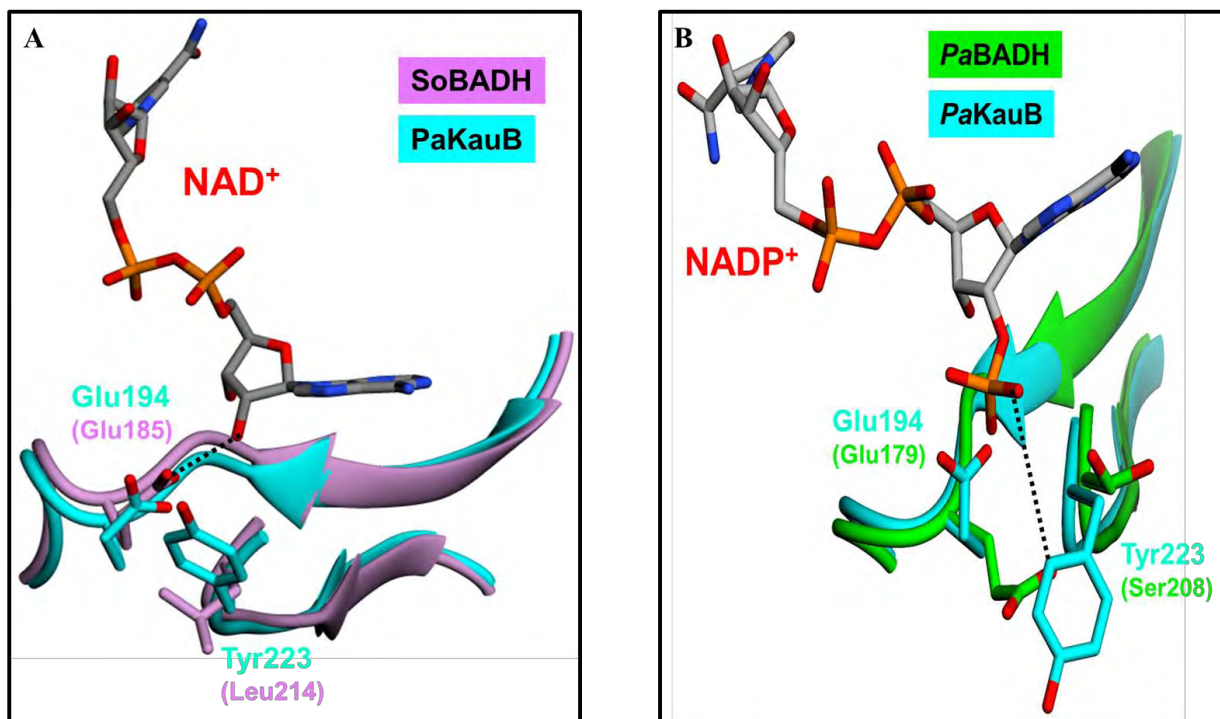


**Figura 18. Sitio activo de la enzima PaKauB.** Se muestran la Cys302 catalítica en la conformación “de descanso”, la Asn168 catalítica y el residuo de Glu267 catalítico en la conformación “intermedia”. Los residuos Phe169, Trp176 y Phe467 forman la caja de aromáticos descrita en otras AMADHs. Los

## RESULTADOS

residuos de aminoácidos se muestran en varillas coloreadas por átomos (carbonos en cian, nitrógenos en azul, oxígenos en rojo, azufres en amarillo).

En cuanto al sitio de unión a la coenzima, *PaKauB* posee un residuo de glutámico (Glu194) en la posición equivalente a la 195 de la ALDH2 y un residuo de tirosina (Tyr223) en la posición equivalente a la 223 en ALDH2, que como ya se mencionó son las posiciones que determinan la especificidad por  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ . En este caso, la presencia de dichos residuos es consistente con el uso exclusivo de  $\text{NAD}^+$ , ya que no podría unir al  $\text{NADP}^+$ , lo que concuerda con los datos experimentales descritos en la sección de Resultados. El que no una al  $\text{NADP}^+$  se debe a las repulsiones electrostáticas y estéricas entre el grupo carboxilo de la cadena lateral del Glu194 y el grupo 2'-fosfato de la ribosa de la adenosina del  $\text{NADP}^+$ . La cadena lateral voluminosa de la Tyr223 impide el movimiento de la cadena lateral de Glu194 para dejar espacio al grupo 2'-fosfato del  $\text{NADP}^+$ , de manera que Glu194 solo pueda interactuar con el grupo 2'-OH de la ribosa de la adenosina del  $\text{NAD}^+$ , que es más pequeño. En la Figura 19A, se muestra la superposición de la enzima *SoBADH* (código PDB: 4A0M) que se cristalizó con la coenzima  $\text{NAD}^+$  con la estructura cristalográfica de la enzima *PaKauB* para inferir las posibles interacciones que ocurren en el sitio de unión del  $\text{NAD}^+$  de la *PaKauB*. Mientras que en la Figura 19B, se muestra la superposición de la enzima *PaBADH* (código PDB: 2WOX) que se cristalizó con la coenzima  $\text{NADP}^+$  con la enzima *PaKauB* para mostrar que el grupo 2'-OH del  $\text{NADP}^+$  choca con el residuo Glu194 de la *PaKauB*, razón por la cual no puede usar este nucleótido.



**Figura 19. Sitio de unión de la coenzima NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> de la enzima PaKauB.** A. Superposición de la estructura cristalográfica de la enzima SoBADH (familia ALDH10) con NAD<sup>+</sup> unido (código PDB 4A0M) y la estructura cristalográfica de PaKauB. B. Superposición de la estructura cristalográfica de la enzima PaBADH (familia ALDH9) con NADP<sup>+</sup> (código PDB: 2WOX) y la estructura cristalográfica de PaKauB. Las cadenas laterales de los aminoácidos están dibujadas como varillas coloreadas por tipo de átomo (oxígenos en rojo, nitrógenos en azul) y las cadenas principales como lazos con los átomos de carbono coloreados de acuerdo a la proteína mostrada (cian para PaKauB, lila para SoBADH y verde para PaBADH). Los carbonos de las coenzimas se muestran en gris, fósforos en naranja, oxígenos en rojo y nitrógenos en azul.

### ***VI.8. Acoplamiento molecular (“docking”) de los posibles sustratos aldehídos con la enzima PaKauB***

Los resultados del acoplamiento molecular hecho con los diferentes aldehídos sustratos probados en esta tesis (ABAL, APAL, PAL y LAL) se muestran en la Figura 20. Se seleccionaron aquellas poses que concordaban con lo reportado en la literatura sobre el mecanismo químico de las ALDHs (revisado en Muñoz-Clares *et al.*, 2010; Muñoz-Clares *et al.*, 2011) en el que el oxígeno del aldehído estuviera a distancia accesible por puentes de hidrógeno con el nitrógeno amídico de la cadena principal de la Cys302 y el nitrógeno amídico de la cadena lateral de la Asn168 catalítica. En los casos del acoplamiento molecular con ABAL, APAL y PAL encontramos al átomo de oxígeno del grupo carbonilo del aldehído a una distancia apropiada para su unión por puente de hidrógeno con la cadena lateral del residuo de Asn168 y el grupo amídico de la cadena principal de la cisteína catalítica Cys302, los cuales forman la cavidad del oxianión. En el caso de LAL, solo se observó la posibilidad de un puente de hidrógeno con la cadena lateral de la Asn168, pero una ligera rotación permitiría formar los dos puentes de hidrógeno necesarios para la catálisis.

También, se puede observar que los aldehídos que tienen un grupo amino en su estructura (ABAL, APAL) son estabilizados mediante interacciones catión- $\pi$  entre dicho grupo amino y los residuos aromáticos del sitio activo, especialmente con la Phe467. Además, el nitrógeno del grupo amino y el hidrógeno del grupo hidroxilo de la cadena lateral del residuo de treonina Thr303 están a distancia de puente de hidrógeno. Por otro lado, los sustratos que no poseen un grupo amino en su estructura como el LAL y el PAL, no hacen interacciones catión- $\pi$  con residuos aromáticos, aunque el grupo hidroxilo del LAL si parece que puede formar un puente de hidrógeno con la Thr303.



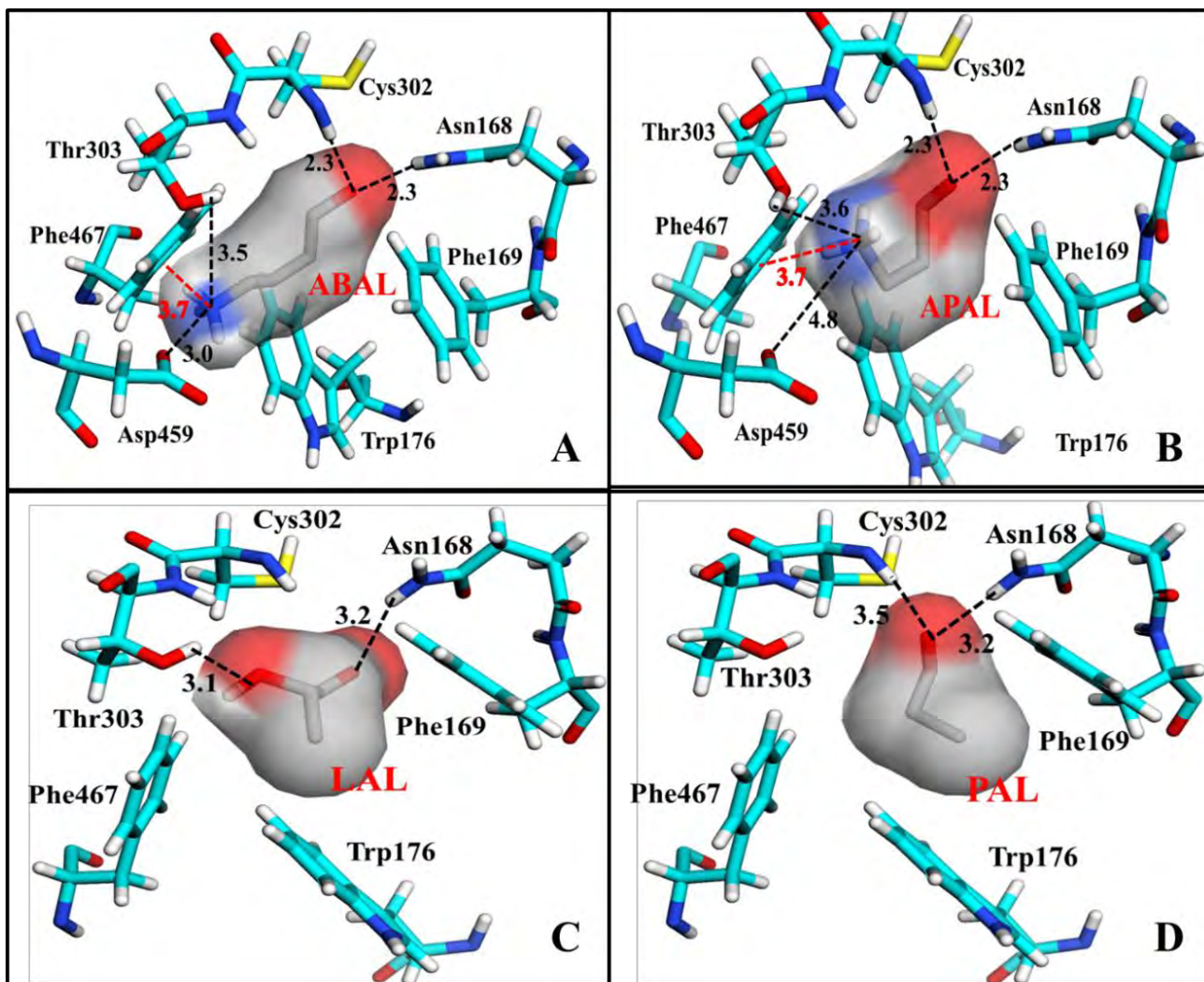


Figura 20. Acoplamiento molecular (“docking”) de aldehídos sustratos en el sitio activo de la enzima *PaKauB*. Se muestran las posiciones más favorables de los aldehídos dada por el programa y los residuos posiblemente involucrados en la unión de estos aldehídos en el sitio activo. Además, se muestran los puentes de hidrógeno (líneas punteadas negras) entre el oxígeno del grupo carbonilo con el nitrógeno amídico de la cadena lateral de la Asn168 y el nitrógeno amídico de la cadena principal de la Cys302 catalíticas, así como entre la Thr303 y los grupo amino de los aldehídos ABAL, APAL y el grupo hidroxilo de LAL. También, se muestran las interacciones catión- $\pi$  (líneas punteadas rojas) entre los grupos amino de ABAL y APAL con el residuo de la caja de aromáticos Phe467. Los aldehídos se muestran en varillas y con superficie de van der Waals coloreada por tipo de átomo (carbonos en gris, nitrógenos en azul, oxígenos en rojo). Para los residuos de aminoácidos

## RESULTADOS

de la enzima *PaKauB* los carbonos se muestran en cian, nitrógenos en azul, oxígenos en rojo, hidrógenos en blanco y azufres en amarillo. Las distancias están en ángströms.

Cuando se hicieron los estudios de acoplamiento molecular con BAL y la enzima *PaKauB*, no se obtuvieron resultados acordes con lo observado experimentalmente, pues la molécula de BAL se ajustaba muy bien en el sitio catalítico de la enzima pero, como ya se mencionó, este aldehído no presentó actividad con *PaKauB*. Por lo tanto, se procedió a comparar la estructura de *PaKauB* con las estructuras conocidas de otras AMADHs que sí presentan actividad con BAL para saber si había alguna diferencia estructural que pudiera ser responsable de estas discrepancias. En la Figura 21, se muestra la sobreposición de la estructura tridimensional de la enzima *PaKauB* con las enzimas YdcW de *E. coli* (código PDB: 1WNB, Gruez *et al.*, 2014), *PaBADH* de *P. aeruginosa* (código PDB: 2WME, González-Segura *et al.*, 2009), *SoBADH* de espinaca (código PDB:4A0M, Díaz-Sánchez *et al.*, 2012), *BADH* de hígado de bacalao (código PDB: 1A4S, Johansson *et al.*, 1998) y la *BADH* de *Staphylococcus aureus* (código PDB: 4NU9, Halavaty *et al.*, 2015). Todas ellas pueden usar a BAL como sustrato (Weretilnyk y Hanson, 1989; Falkenberg y Strøm, 1990; Hjelmqvist *et al.*, 1999; Velasco-García *et al.*, 1999, 2006; Chen *et al.*, 2014)

En la estructura cristalográfica de *PaKauB* se observa, que un residuo de aspártico (Asp459) está expuesto al solvente, justo en la entrada del túnel del aldehído, debido al impedimento estérico que se genera entre el grupo carboxilo de este en las conformaciones permitidas para este residuo y el grupo hidroxilo de la cadena lateral del residuo de tirosina Tyr458, el que está fijo en su posición por interacciones con otros residuos de la proteína. De esta forma, se imposibilita el acceso de BAL al sitio catalítico, debido a que su grupo trimetilamonio choca con la cadena lateral de Asp459. Esto explica nuestro hallazgo

## RESULTADOS

experimental de que BAL no es usado como sustrato por la enzima *PaKauB*. En la AMADH de YcdW de *E. coli* (Figura 21A) hay un residuo de fenilalanina (Phe436) en la posición equivalente al Asp459 de *PaKauB*, que al igual que el residuo de histidina (His448) de la enzima de *S. aureus* (Figura 21D), hace interacciones catión- $\pi$  con un residuo de histidina (His435) en el caso de la enzima de *E. coli*, o con un residuo de fenilalanina (Phe447) en el caso de la enzima de *S. aureus*; debido a estas interacciones, estas cadenas laterales no sobresalen en el túnel de entrada del aldehído y no bloquean el acceso de BAL al sitio catalítico. En la enzima de espinaca *SoBADH* (Figura 21B) un residuo de glutamina (Gln448) en la posición equivalente al Asp459 de *PaKauB* deja espacio en el túnel para la entrada de BAL, debido a que su cadena lateral forma un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo de la serina Ser447, que es el residuo en la posición equivalente a la de Tyr458 de *PaKauB*. En el caso de la enzima *PaBADH* (Figura 21C), hay una glicina (Gly445) en la posición equivalente al Asp459 de *PaKauB*, lo que también deja suficiente espacio para la entrada de BAL. Finalmente, en la BADH de bacalao (*GcBADH*) el residuo expuesto al túnel del aldehído es una serina (Ser458) cuya cadena lateral hace interacciones OH- $\pi$  con el anillo aromático de la Tyr457, dejando así espacio para la entrada del voluminoso grupo trimetilamonio de BAL. Además, es interesante que ninguno de los residuos de las enzimas con actividad BADH que ocupan la posición equivalente a la del Asp459 de la *PaKauB* poseen carga, lo cual puede sugerir que además del impedimento estérico ya mencionado, la carga de este residuo también pudiera impedir el paso del grupo trimetilamino por interacciones electrostáticas. Aunque, de ser este el caso, se esperaría que ABAL y APAL también fuesen retenidos por el Asp459 ya que su grupo amino primario posee una densidad de carga positiva incluso mayor que la del trimetilamonio.

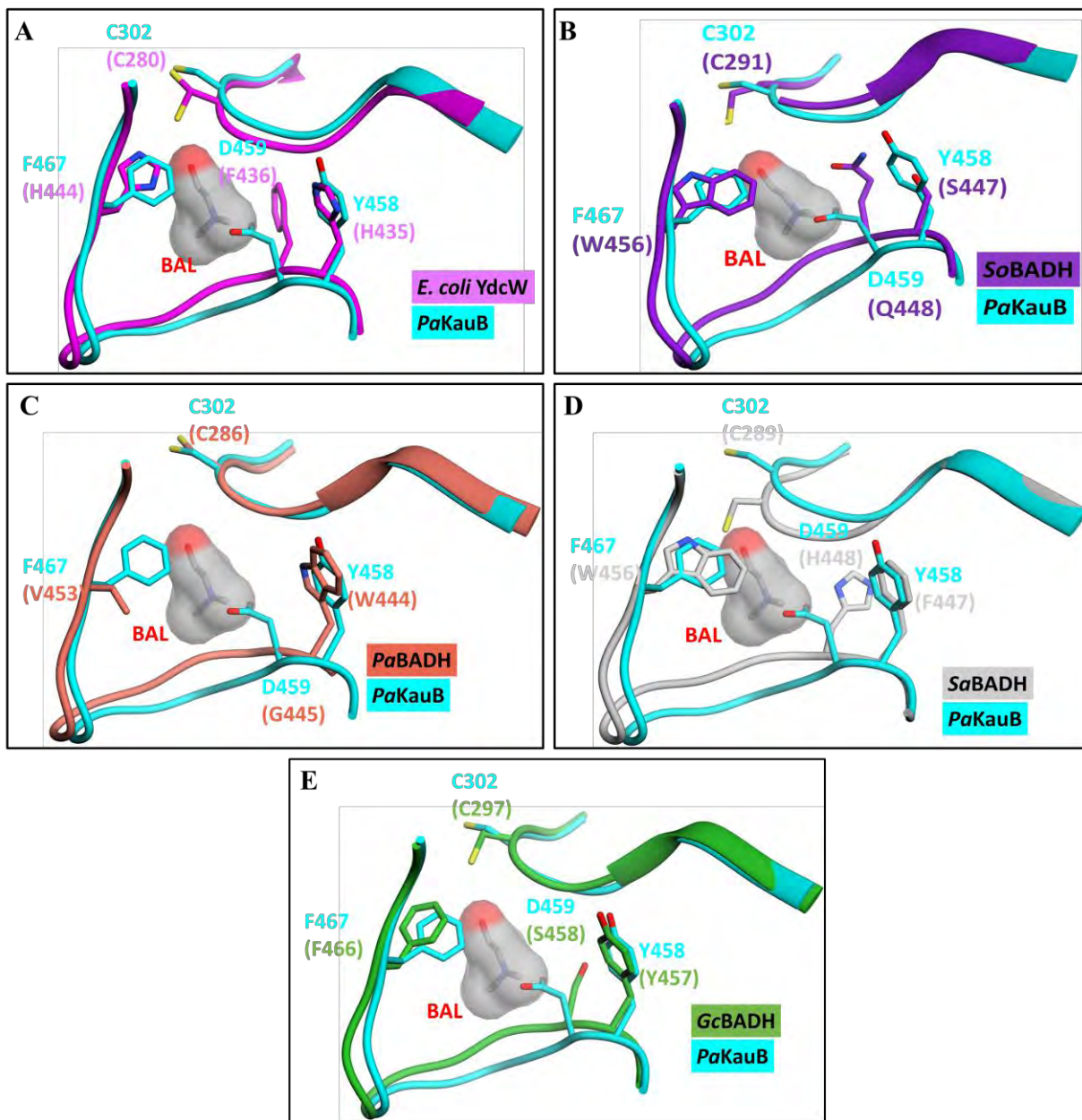
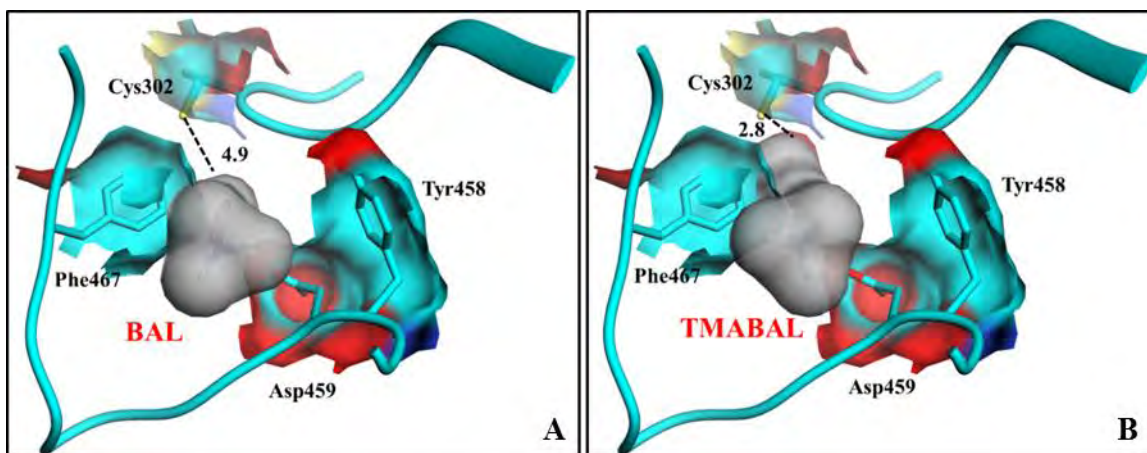


Figura 21. Superposición de la estructura del túnel de entrada del aldehído de la enzima *PaKauB* con el de enzimas que presentan actividad BADH. Los residuos Asp459 y Tyr223 en *PaKauB* están sustituidos por Phe436 y Tyr435 en la enzima YdcW de *E. coli* (A); Gln448 y Ser447 en la SoBADH (B); Gly445 y Trp444 en la PaBADH (C); His448 y Phe447 en la SaBADH (D); Ser458 y Tyr457 en GcBADH (E). Nótese que el impedimento estérico para el paso del BAL hacia el sitio activo solo se da en la enzima *PaKauB*. En los cinco paneles se muestra la molécula de BAL en superficie de van der Waals coloreada por átomo (carbonos en gris, oxígeno en rojo, nitrógeno en

## RESULTADOS

azul) y las cadenas laterales de los aminoácidos como varillas coloreadas por átomo (oxígenos en rojo, nitrógenos en azul); las cadenas principales se muestran como lazos con los átomos de carbono coloreados de acuerdo a la proteína mostrada (cian para *PaKauB*, magenta para *YcdW*, púrpura para *SoBADH*, salmón para *PaBADH*, gris para *SaBADH* y verde para *GcBADH*).

Con el fin de investigar las razones estructurales por las cuales la enzima *PaKauB* sí utiliza eficientemente TAMABAL a pesar de que no utiliza BAL y los dos sustratos poseen el grupo trimetilamonio, se compararon las dos moléculas (BAL y TMABAL) colocándolas en el túnel de entrada del aldehído hacia el sitio catalítico de la enzima (Figura 22). Al parecer, los dos carbonos extras que posee la molécula del TMABAL son suficientes para que el carbono carbonílico pueda acercarse a la cisteína catalítica y que ocurra la reacción sin que el grupo trimetilamonio tenga que pasar más allá del Asp459. En el caso de BAL por tener una cadena alifática más corta, el grupo carbonilo queda muy lejos de la Cys302 y no puede ser atacado por esta.



**Figura 22. Simulación de la posición de BAL y TMABAL en el túnel de entrada del aldehído en la enzima *PaKauB*. Se muestran los aldehídos BAL (A) y TMABAL (B) con su grupo**

## RESULTADOS

trimetilamonio detenido por el residuo Asp459 en el túnel de entrada al sitio catalítico. Nótese la diferencia en la distancia entre la cisteína catalítica y el grupo carbonilo de cada aldehído. Los dos carbonos adicionales que tiene el TMABAL permiten un acercamiento suficiente entre la cisteína catalítica Cys302 en su conformación de “ataque” y el grupo carbonilo para que inicie la reacción. Las distancias están en ángströms. Las moléculas de los aldehídos se muestran en superficie de van der Waals de color gris. Las cadenas laterales de los residuos de la proteína que estrechan el túnel de entrada del aldehído y la cisteína catalítica en sus dos conformaciones (“en descanso” y “en ataque”) se muestran en superficie de Van der Waals con una transparencia del 20% y en barras coloreadas por átomo (carbonos en cian, oxígenos en rojo, nitrógeno en azul, azufre en amarillo). La cadena principal de la proteína se muestra en lazos con los átomos de carbono coloreados en cian.



## VII. DISCUSIÓN

### VII.1. Posibles papeles fisiológicos de la enzima *PaKauB* de acuerdo a los parámetros cinéticos obtenidos con los sustratos aldehídos

Los resultados obtenidos en este trabajo, confirman que el gen PA5312 *PakauB* perteneciente a la bacteria *P. aeruginosa* PAO1 codifica una enzima con actividad aminoaldehído deshidrogenasa que de acuerdo a los estudios reportados por Julián-Sánchez *et al.* (2007) pertenece a la familia ALDH27. Los resultados de la actividad específica reportada por Jann *et al.* (1988) quienes le confirieron la actividad aminobutiraldehído deshidrogenasa a esta enzima son mayores a los datos de la actividad específica encontrada por nosotros. Sin embargo, los datos no son comparables debido a la diferencia en las condiciones de pH y temperatura a las que se realizaron los ensayos y a que ellos los hicieron con los extractos crudos de cultivos de bacterias de *P. aeruginosa* creciendo sobre arginina y poliaminas y nosotros los hicimos con la enzima recombinante y pura. Por otro lado, estos son los primeros datos que muestran que la enzima *PaKauB* puede oxidar aldehídos alifáticos sin y con diferentes sustituyentes en su estructura como el grupo trimetilamonio y el grupo hidroxilo.

De acuerdo a los resultados de la caracterización cinética realizada en este trabajo, el sustrato preferido por *PaKauB* a las concentraciones fisiológicas de  $\text{NAD}^+$  en la bacteria (Zhou *et al.*, 2011) es el TMABAL con una constante de especificidad aparente de  $0.40 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ . Su  $K_m$  aparente es  $164 \mu\text{M}$ , un valor menor que los de la  $K_m$  de ABAL y APAL, a pesar de que estos aldehídos pueden entrar completamente al sitio activo de la enzima a diferencia de TMABAL cuyo grupo trimetilamonio es detenido por el residuo

## DISCUSIÓN

de Asp459 en la entrada del túnel. Parece ser que la interacción entre el TMABAL y el residuo Asp459, que encontramos en la simulación de acoplamiento molecular, permite mantener unida la molécula del TMABAL en una posición estable y favorable para que se lleve a cabo la catálisis, mientras que las moléculas de ABAL y APAL tienen más posibilidad de moverse en el sitio activo lo que puede disminuir tanto su constante de afinidad como la  $V$ . Sin embargo, al comparar las constantes cinéticas aparentes obtenidas con ABAL y con APAL, vemos que estas son muy diferentes a pesar que sus estructuras solo difieren en el tamaño de su cadena alifática por un carbono. Estos resultados, de igual forma se pueden analizar con base en la interacción observada en los respectivos acoplamientos moleculares de los aldehídos con el residuo Asp459, el cual está a una distancia de 3.0 Å del grupo amino del ABAL mientras que está a 4.8 Å del APAL; es decir el ABAL puede formar un puente de hidrógeno con el Asp459 lo que no sucede con el APAL por tener una cadena alifática más corta. Esto sugiere que, de forma análoga al TMABAL, esta interacción mantiene unida la molécula de ABAL en una posición más estable y favorable para que se lleve a cabo la catálisis respecto a la molécula de APAL, pero menos favorable respecto a la molécula de TMABAL. De igual forma las moléculas de LAL y PAL aunque presentan los valores de  $K_m$  aparentes más bajos de los aldehídos aquí ensayados, sus  $V$  aparentes son bajas, sugiriendo que al igual que ABAL y APAL no son estabilizados en el sitio activo en la forma más productiva, lo cual concuerda con los resultados del acoplamiento molecular en el que presentan un menor número de interacciones con la proteína.

Su especificidad relativamente amplia por sustratos aldehídos parece indicar que *PaKauB* es una enzima que puede participar en diversas rutas metabólicas, razón por la cual no se encuentra en un contexto genómico específico de ninguna de ellas. Además, todos los sustratos que usa *PaKauB* son intermediarios de rutas catabólicas inducibles como la



degradación de arginina y de poliaminas (Jann *et al.*, 1988), e incluso se puede proponer que en la degradación de lisina que es mediada por la lisina descarboxilasa en una ruta que contempla la poliamina cadaverina y el 5-aminopentaldehído como intermediarios (Yamanishi *et al.*, 2007; Indurthi *et al.*, 2016) ya que *P. aeruginosa* cuenta con estas enzimas en su genoma (Figura 23, Ruta 7), sería interesante probar el 5-aminopentaldehído como sustrato de *PaKauB* en futuros estudios. Además, nuestros resultados sugieren que la enzima puede participar en el metabolismo de L-ramnosa o L-fucosa para dar lactaldehído y convertirlo en piruvato, el cual producirá acetil CoA y entrará al ciclo de Krebs, como se ha reportado para *E. coli* (Baldoma y Aguilar, 1987) y *Azotobacter vinelandii* (Watanabe *et al.*, 2008) aunque en *P. aeruginosa* aún no hay reportes del uso de ramnosa como fuente de carbono y energía. Además, gracias a su actividad de lactaldehído deshidrogenasa podría participar en la ruta de degradación del metilglioxal hasta piruvato, como también se ha propuesto para *E. coli* (Baldoma y Aguilar, 1987). Es interesante a este respecto que hasta el momento no se conoce ninguna aldehído deshidrogenasa de *P. aeruginosa* con actividad de lactaldehído deshidrogenasa, ni hay en su genoma un gen que codifique para una proteína ortóloga de la lactaldehído deshidrogenasa de *E. coli* que es la mejor caracterizada (Costanzo *et al.*, 2007). Ya que *PaKauB* es capaz de oxidar aldehídos con grupos hidroxilo en su estructura como LAL sería factible que también pueda oxidar el 3-hidroxi propionaldehído (3-HPAL) que es un intermediario del catabolismo del glicerol. Aunque no lo hemos probado experimentalmente porque este aldehído no está disponible comercialmente.

En cuanto a la utilización de propionaldehído se ha propuesto que *PaKauB* participa en el catabolismo de isopropilamina exógena (De Azevedo *et al.*, 2002) para dar propionato o lo que es aún más interesante esta enzima también podría participar en esta misma ruta de degradación pero oxidando 2-aminopropionaldehído (Figura 23, Ruta 6).

## DISCUSIÓN

Finalmente, resulta a primera vista sorprendente que en términos de su  $V/K_m$  determinada a concentraciones de  $\text{NAD}^+$  cercanas a las fisiológicas, que el mejor sustrato de *PaKauB* sea el TMABAL, habiéndose encontrado en este trabajo de tesis que esta enzima no puede oxidar BAL, que es una molécula muy parecida a TMABAL ya que ambas poseen el voluminoso grupo trimetilamonio y difieren solo en dos carbonos. La ruta metabólica de síntesis de carnitina para la que se ha reportado a TMABAL como intermediario solo se conoce en animales (Vaz *et al.*, 2000) y en hongos (Kaufman y Broquist, 1977) (Figura 23, Ruta 8), pues no hay reportes de que las bacterias puedan sintetizar carnitina, aunque sí se sabe que la pueden tomar del medio y usarla como osmoprotector o como fuente de carbono y en algunas bacterias como fuente de carbono y nitrógeno (revisado en Kleber, 1997). En cuanto a la degradación de lisina, la ruta que se conoce en *P. aeruginosa* no involucra el aldehído TMABAL como intermediario (Chou *et al.*, 2010). Todo ello parece indicar que en *P. aeruginosa* TMABAL está involucrado en una ruta metabólica aún desconocida. Algunos autores han reportado que *Pseudomonas sp.* 13CM posee una enzima trimetilaminobutanol deshidrogenasa y una enzima trimetilaminobutiraldehído deshidrogenasa involucradas en el metabolismo del trimetilaminobutanol (Hassan *et al.*, 2007), aunque la importancia biológica de este homólogo de colina no se conoce todavía. Otros estudios han reportado la degradación de homocolina (un homólogo de colina y trimetilaminobutanol, los cuales difieren solamente en la longitud de su cadena alifática con dos, tres y cuatro carbonos para la colina, homocolina y trimetilaminobutiraldehído respectivamente) que se oxida a alaninbetaína aldehído por una colina deshidrogenasa, para posteriormente ser oxidado a alanina betaína por una alanina betaína deshidrogenasa  $\text{NAD}^+$ -dependiente, dando como producto final acetyl-CoA (Mohamed-Ahmeda *et al.*, 2015) (Figura 23, Ruta 9), el cual puede usarse como precursor en la síntesis de lípidos o como fuente de carbono y energía. Por lo tanto, suponemos que

*PaKauB* puede estar participando en la oxidación de trimetilaminobutiraldehído en una ruta semejante a la propuesta para la homocolina pero partiendo de trimetilaminobutanol.

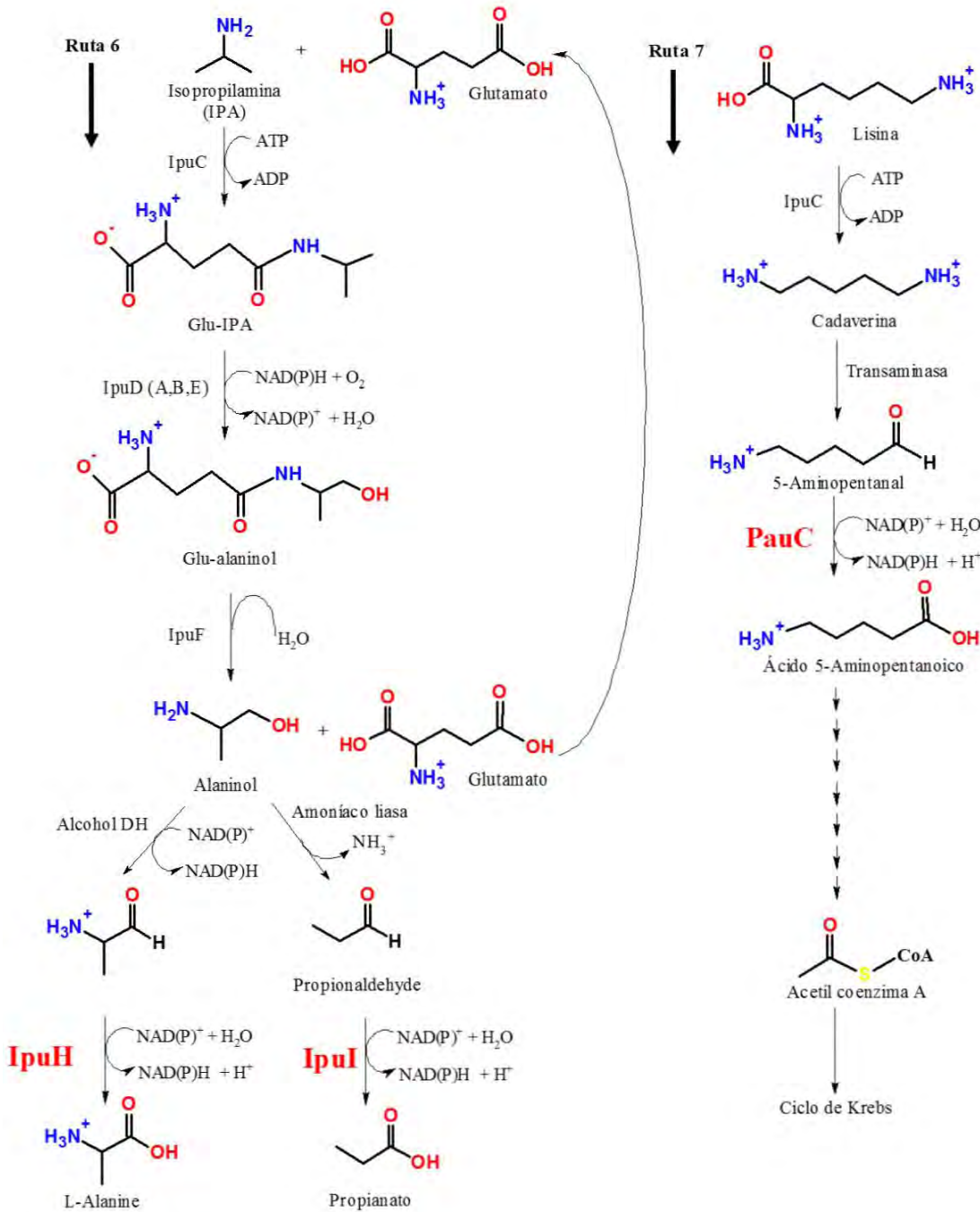
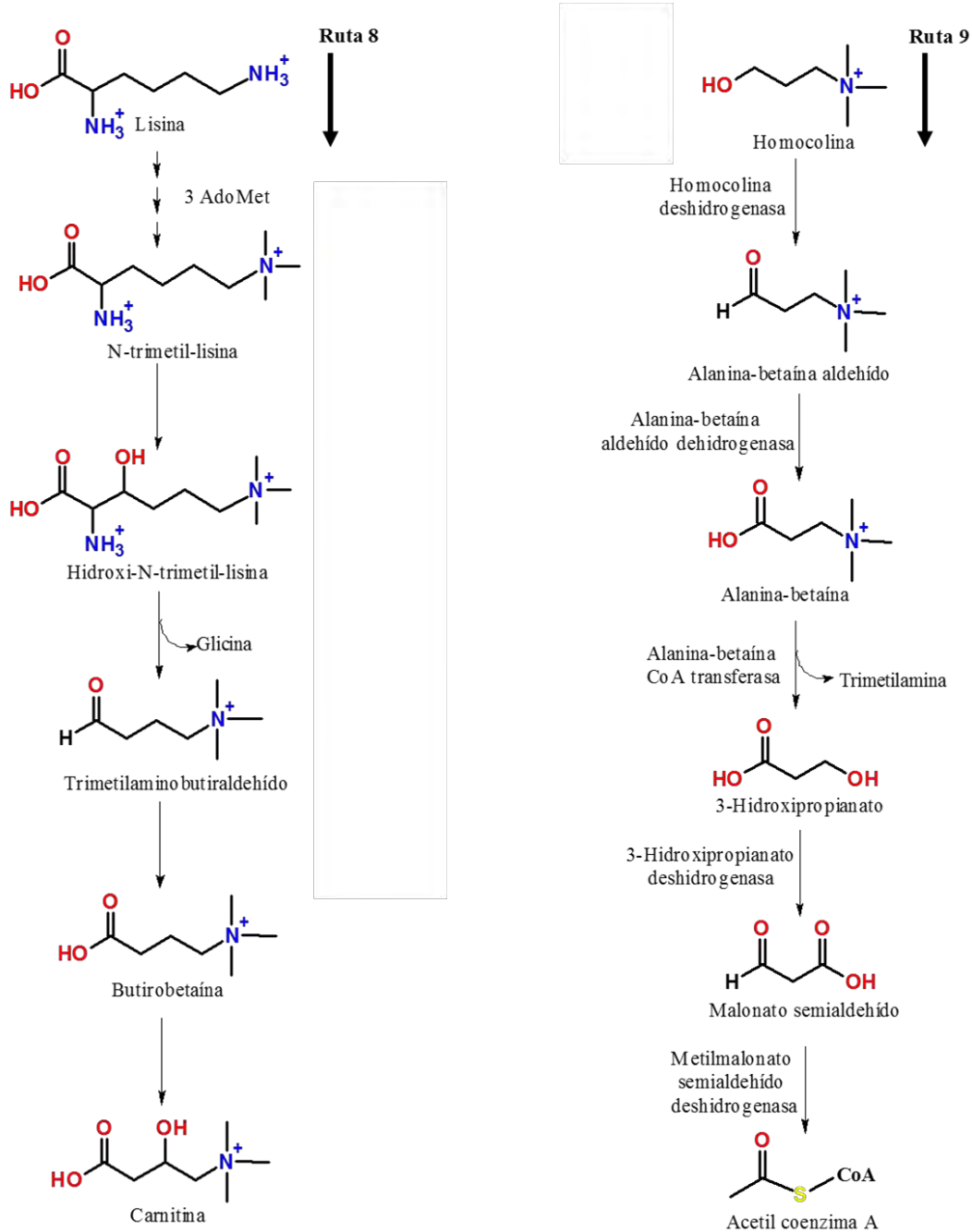


Figura 23. Rutas metabólicas en las que proponemos que podría participar la enzima *PaKauB* con base a los resultados obtenidos en este trabajo. (Continúa en la siguiente página).



**Figura 23. Rutas metabólicas en las que proponemos que podría participar la enzima *PaKauB* con base a los resultados obtenidos en este trabajo. (Continuación).**

De lo anterior, podemos decir que *PaKauB* parece ser una enzima esencial para la bacteria *P. aeruginosa* debido a las diferentes rutas catabólicas en las que puede participar,

todas ellas con el fin de obtener carbono, nitrógeno y energía para su supervivencia dependiendo del lugar en el que se encuentre y de los compuestos que encuentre en estos lugares.

### ***VII.2. El mecanismo cinético de PaKauB usando ABAL como sustrato es el Bi Bi Ordenado en estado estacionario propuesto para otras ALDHs***

Los ajustes globales de los datos de velocidad inicial obtenidos con ABAL, tanto en los patrones de velocidad inicial como en los de inhibición de NADH frente a  $\text{NAD}^+$ , son consistentes con un mecanismo Bi Bi Ordenado en estado estacionario (Cleland, 1963) en el que el  $\text{NAD}^+$  es el primer sustrato en unirse a la enzima y el NADH el último producto en salir del sitio activo (Esquema 3). Este mecanismo se ha reportado para otras ALDHs (MacGibbon *et al.*, 1977; Henehan y Tipton, 1992; Valenzuela-Soto *et al.*, 1993; Velasco-García *et al.*, 2000) aunque no es fácil de explicar en términos estructurales, dado que la arquitectura del sitio activo de las ALDHs parece permitir la entrada al azar de los sustratos (aldehído y coenzima).

Los valores menores de  $K_m$  para el  $\text{NAD}^+$  en comparación con los del ABAL podrían indicar que bajo las condiciones normales fisiológicas de la bacteria el primer sustrato en unirse sería el  $\text{NAD}^+$ , pero eso dependerá además de las concentraciones intracelulares de ambos. Además, en las gráficas de dobles recíprocos se observa que las líneas se cruzan en el tercer cuadrante y, por lo tanto, los valores aparentes de  $V$ ,  $K_m$  y  $V/K_m$  cambian cuando se cambia la concentración del aldehído, de manera que la enzima presenta una mayor  $K_m$  aparente por el  $\text{NAD}^+$  cuando hay concentraciones altas del aldehído y viceversa, una menor  $K_m$  aparente cuando hay concentraciones bajas del aldehído. Lo anterior parecería sugerir que

## DISCUSIÓN

el aldehído está interfiriendo en la unión del  $\text{NAD}^+$  a la enzima y, si ese fuese el caso, una posible explicación sería que el aldehído llegue al sitio activo por la entrada del nucleótido, lo cual sería más probable cuando hay concentraciones altas del aldehído. Sin embargo, el valor relativo de las constantes de velocidad  $K_m^{\text{NAD}^+}$  y  $K_{ia}$ , cuando  $K_m^{\text{NAD}^+}$  es mayor que  $K_{ia}$ , hacen que se obtenga el patrón de líneas que se cruzan en el tercer cuadrante. Teniendo en cuenta la definición de  $K_m^{\text{NAD}^+}$  y  $K_{ia}$  en términos de constantes de velocidad para un mecanismo Bi Bi ordenado en estado estacionario ( $K_m^{\text{NAD}^+} = k_{+3}k_{+4} / k_{+1}(k_{+3} + k_{+4})$  y  $K_{ia} = k_{-1}/k_{+1}$ ; Segel, 1993) y el hecho de que en las enzimas ALDH la liberación del producto ácido es muy rápida comparada con la liberación del nucleótido reducido (es decir,  $k_{+3}$  es mucho mayor que  $k_{+4}$ ; véase el Esquema 3), la condición de que  $K_m^{\text{NAD}^+}$  sea mayor que  $K_{ia}$  se da cuando la liberación del NADH es más lenta que la liberación del  $\text{NAD}^+$ , es decir, cuando  $k_{-1}$  es mayor que  $k_{+4}$ . Este comportamiento se ha observado en los mecanismos cinéticos descritos para las ALDHs de hígado de humano (Sidhu y Blair, 1975) y la BADH de *P. aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 2000) en los que la constante de disociación de la coenzima  $K_{ia}$  tiene un valor menor al de la  $K_m^{\text{NAD}^+}$ . Sin embargo, otras ALDHs muestran un patrón de velocidad inicial de líneas que se cruzan sobre el eje, indicando que la  $K_{ia}$  y la  $K_m^{\text{NAD}^+}$  son iguales (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993; Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000). El tener un valor de  $K_{ia}$  mucho menor que el de  $K_m^{\text{NAD}^+}$  explica el aparente mecanismo Ping Pong reportado para otras ALDHs (Mori *et al.*, 1980; Falkenberg y Strøm, 1990), mecanismo cinético que no es compatible con el mecanismo químico de estas enzimas. Es interesante que a pesar de tener una constante de disociación del complejo E- $\text{NAD}^+$  ( $K_{ia}$ ) tan baja, y por tanto una afinidad tan alta del  $\text{NAD}^+$  por el sitio activo, el mecanismo cinético hace que se necesiten concentraciones relativamente altas del nucleótido para que la enzima esté al 50% formando el complejo ternario productivo cuando el aldehído sea saturante. Pero a

concentraciones subsaturantes del aldehído, como las que probablemente existen *in vivo*, esta concentración del nucleótido es mucho menor.

Por otro lado, la inhibición por el producto NADH frente a  $\text{NAD}^+$  es competitiva, es decir, el NADH se une a la enzima libre e interfiere con la unión del  $\text{NAD}^+$  a esta, lo que es consistente con el mecanismo Bi Bi Ordenado mencionado anteriormente y con la estructura del sitio activo. Los valores de la  $K_m^{\text{NAD}^+}$  aparente y la constante de disociación del complejo E-NADH ( $K_{ic}$ ) obtenidos son prácticamente iguales, lo que indica que la enzima presenta la misma afinidad por ambas moléculas, si se considera a la  $K_m$  como una medida de afinidad, a la concentración de ABAL usadas experimentalmente en el experimento de inhibición por NADH. Por otra parte, al comparar el valor de la  $K_m$  para el  $\text{NAD}^+$  obtenido en el patrón de velocidad inicial (cuando no hay NADH en el medio de reacción) se ve que es mayor que el valor de la  $K_m$  para el  $\text{NAD}^+$ , obtenido en el patrón de inhibición por NADH, lo que puede llevar a pensar que el NADH aumenta la afinidad por el  $\text{NAD}^+$  de la enzima. Pero esto no tiene sentido ya que el NADH actúa como inhibidor competitivo frente al  $\text{NAD}^+$ . La diferencia en los valores de la  $K_m$  para el  $\text{NAD}^+$  cuando en el ensayo está ausente o presente el NADH se deben a que en el primer caso los valores estimados para la  $K_m$  son los reales, es decir, los que se obtienen a concentraciones saturantes del aldehído, mientras que en el segundo caso se trata de una  $K_m$  aparente, porque se estima a una concentración no saturante del ABAL y, como ya mencionamos, aumentos en la concentración del aldehído aumentan el valor de  $K_m$  aparente para el  $\text{NAD}^+$ , hasta llegar a un valor máximo a saturación de la enzima por el aldehído.

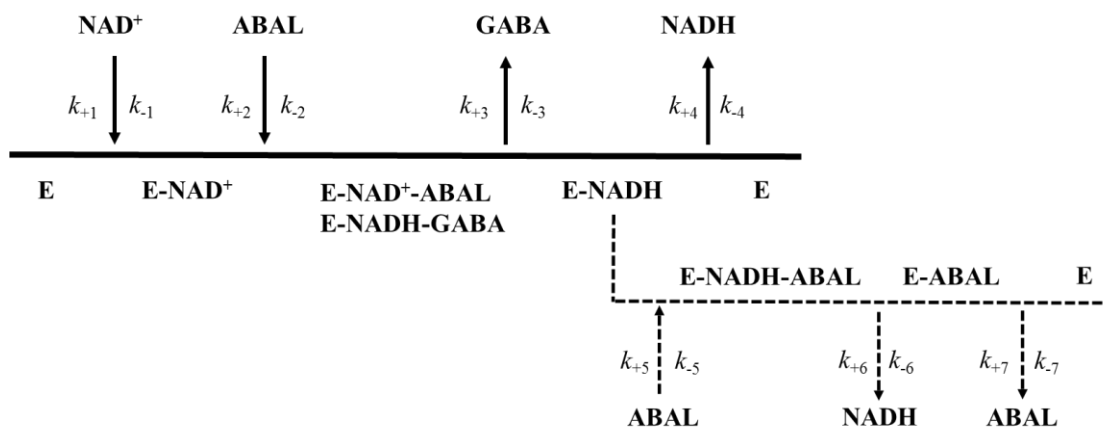
Los patrones de inhibición por NADH frente a ABAL dejando  $\text{NAD}^+$  constante y no saturante (a una concentración cercana a su  $K_m$ ), mostraron un patrón de inhibición incompetitivo, resultado que no es consistente con el mecanismo Bi Bi ordenado en estado

## DISCUSIÓN

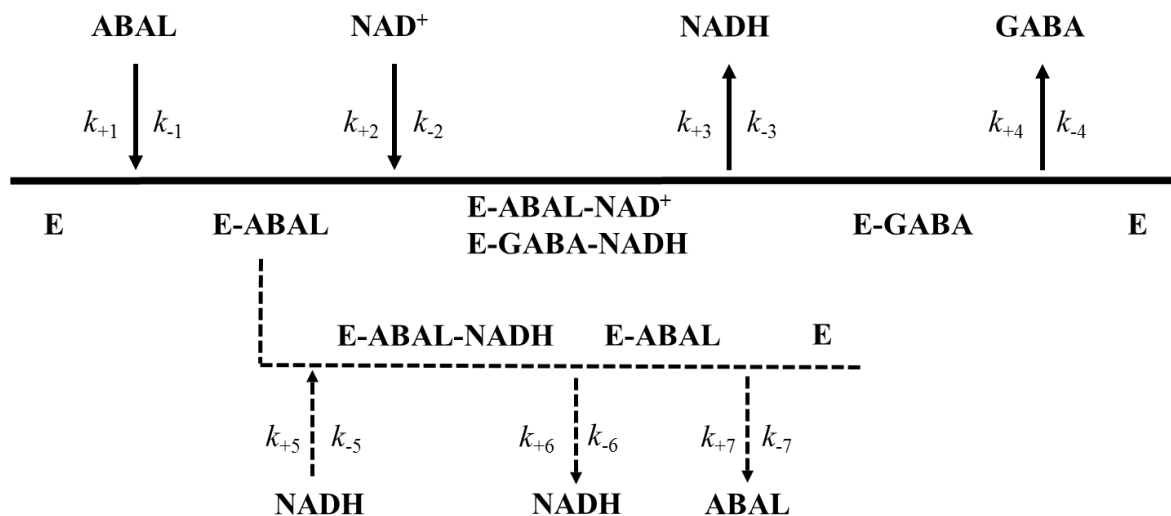
estacionario mostrado en el Esquema 3. De acuerdo con este mecanismo deberíamos haber encontrado un patrón mixto de inhibición. Sin embargo, este resultado anormal es debido a la inhibición por sustrato aldehído que presenta la enzima y a que el grado de inhibición se incrementa en presencia de NADH, como demostramos en este estudio. Este efecto del NADH sobre la inhibición por el aldehído es consistente con un mecanismo de inhibición por sustrato como el reportado por Vojtechová *et al.* (1997). En forma breve, este mecanismo consiste en la unión del aldehído, ABAL en nuestro caso, al complejo binario E-NADH formándose un complejo ternario no productivo E-NADH-ABAL. Si el NADH pudiera liberarse de este complejo, se podría generar una ruta alterna de reacción como la mostrada en el Esquema 5, que daría cuenta de la inhibición por sustrato si la liberación del NADH del complejo E-NADH-ABAL (cuya velocidad está determinada por  $k_{+6}$ ) es más lenta que la liberación del NADH del complejo E-NADH (cuya velocidad está determinada por  $k_{+4}$ ). Se necesitan más experimentos para poder concluir si en el caso de la *PaKauB* se establece esta ruta alterna de liberación del NADH a altas concentraciones de ABAL. No obstante, podemos descartar el mecanismo cinético en el que ABAL se une a la enzima libre y posteriormente el  $\text{NAD}^+$  se une al complejo E-ABAL (Esquema 6), pues este mecanismo no explicaría la inhibición competitiva del NADH frente al  $\text{NAD}^+$ , ya que ambos nucleótidos se unirían a especies diferentes de la enzima (E-ABAL y E-GABA, respectivamente) no conectadas por pasos reversibles, por lo que la inhibición observada debería ser incompetitiva. Pero si se considera que la inhibición por sustrato por ABAL se debe a la formación de un complejo no productivo E-ABAL-NADH, como se ha mencionado, esto daría lugar a inhibición competitiva de NADH frente a  $\text{NAD}^+$  en este mecanismo, lo cual produciría una inhibición mixta, que no es el tipo de inhibición observado experimentalmente. Este mecanismo cinético ordenado con ABAL uniéndose primero sí explicaría la inhibición incompetitiva del NADH



frente a ABAL, por las mismas razones que las mencionadas para el  $\text{NAD}^+$ , es decir porque el NADH se une a una especie de la enzima diferente a la que se une ABAL y ambas especies no están conectadas por pasos reversibles. Pero teniendo en cuenta que el NADH se puede unir al complejo E-ABAL dando lugar a inhibición por sustrato, la inhibición del NADH frente a ABAL tendría dos componentes incompetitivos que se sumarían, resultando en una inhibición incompetitiva, como se observó experimentalmente cuando no se elimina el efecto de la inhibición por sustrato. Pero al eliminar este efecto, la inhibición no es competitiva como predice el mecanismo mostrado en el esquema 6, sino mixta, como predice el mecanismo mostrado en el Esquema 5. Por todo ello, concluimos que este último mecanismo cinético es el que la enzima *PaKauB* sigue.



**Esquema 5. Mecanismo cinético propuesto para la enzima *PaKauB* a altas concentraciones de aldehído.** Las líneas punteadas indican la ruta alterna de la reacción si el NADH pudiera liberarse del complejo E-NADH-ABAL.



**Esquema 6. Mecanismo alternativo para la enzima *PaKauB* a altas concentraciones de aldehído.** Las líneas punteadas indican la ruta alterna de la reacción si el NADH pudiera liberarse del complejo E-NADH-ABAL.

Otro mecanismo para explicar la inhibición por sustrato, observada en muchas enzimas ALDH, es el propuesto por Jang *et al.* (2015). Estos autores proponen que la inhibición por el sustrato succínico semialdehído (SSA) de la succínico semialdehído deshidrogenasa de *Streptococcus* (SpSSADH) se debe a la unión de una segunda molécula de aldehído no a la especie incorrecta de la enzima, como proponen Vojtechová *et al.* (1997), sino al sitio incorrecto, es decir al subsitio del nucleótido. De esta forma se tendría una molécula de aldehído unida al sitio catalítico como sustrato y la otra unida al sitio de la coenzima como inhibidor. Pero de ser este nuestro caso, el NADH disminuiría la inhibición por sustrato en lugar de aumentarla, como nosotros observamos experimentalmente en este trabajo y se observó en el estudio reportado por Vojtechová *et al.* (1997).

Por otro lado, los resultados cinéticos y estructurales confirman las predicciones hechas sobre la especificidad de la enzima *PaKauB* por el NAD<sup>+</sup> basándonos en el estudio

hecho por González-Segura *et al.* (2015): los residuos Glu194 y Tyr223 impiden la unión del grupo 2'-P de la ribosa de la adenosina del NADP<sup>+</sup>. Las gráficas de saturación de PaKauB por el NAD<sup>+</sup> muestran una inhibición por sustrato por la coenzima oxidada, cuyo grado varía dependiendo del aldehído que se use como sustrato. Así, por ejemplo, con los aldehídos TMABAL y LAL se ve una inhibición más fuerte que con PAL, mientras que con ABAL y APAL, a una concentración de 800 μM no se alcanza a observar la inhibición. Esto podría sugerir que las interacciones de los aldehídos con la enzima pueden dar lugar a pequeños pero importantes cambios conformacionales de la proteína que resultan en una unión no productiva de la coenzima y justificarían la inhibición. Del análisis de los resultados del acoplamiento molecular, se puede proponer que las interacciones entre el grupo amino del ABAL y del APAL con la caja de aromáticos, que no se presenta con el resto de los aldehídos, podrían ser las responsables de dichos cambios conformacionales.

### ***VII.3. La estructura tridimensional de la enzima PaKauB explica la afinidad relativa por sus sustratos***

La discusión de los análisis de la estructura cristalográfica y de resultados del acoplamiento molecular (dockings) hechos con los diferentes aldehídos se presenta de forma más completa en la sección de Resultados. Sin embargo, a modo de resumen, diremos aquí que los resultados de estas simulaciones confirman lo previamente reportado por Díaz-Sánchez *et al* (2012) y luego ampliados por Riveros-Rosas *et al.* (2013) de que los residuos aromáticos del sitio activo (Phe169, Phe467 y Trp176 en el caso de la PaKauB) contribuyen a la unión de sustratos aminoaldehídos con una orientación apropiada por medio de interacciones catión- $\pi$ , que son comunes en las proteínas (Cauët *et al*, 2005). Por otro lado,

## DISCUSIÓN

el residuo Asp459 impide la entrada al sitio activo del grupo trimetilamonio del BAL, una propiedad que parece ser exclusiva de algunas enzimas ALDH27 como sugiere la conservación de este residuo de Asp459 junto con una Tyr o Phe en la posición equivalente a la Tyr458 de *PaKauB* (A. Juárez-Vázquez, comunicación personal).

### VIII. CONCLUSIONES

- El sitio activo de *PaKauB* ha sido optimizado para oxidar aldehídos alifáticos, ya sea con diferentes sustituyentes como grupos amino e hidroxilo o sin sustituyente, lo que le permite participar en rutas de degradación importantes para el desarrollo de la bacteria *P. aeruginosa* tales como la degradación de arginina, poliaminas, glicerol y metilglioxal. Sin embargo, no es capaz de oxidar BAL y no puede participar en el catabolismo de colina o en la síntesis del osmoprotector GB.
- El residuo Asp459 en el túnel de entrada del aldehído impide la entrada de BAL al sitio catalítico debido al tamaño de la cadena lateral de este residuo.
- Las características estructurales del sitio de unión a la coenzima son consistentes con su alta especificidad por el  $\text{NAD}^+$ , lo que concuerda con los roles catabólicos propuestos para esta enzima.
- El mecanismo cinético de la enzima *PaKauB* a concentraciones fisiológicas de los sustratos es un Bi Bi Ordenado en estado estacionario en el que el  $\text{NAD}^+$  es el primer sustrato en unirse y el NADH el último producto en salir. A altas concentraciones del aldehído la enzima presenta inhibición por sustrato que es consistente con la formación de un complejo ternario no productivo E-NADH-ABAL del que se puede liberar el NADH, estableciéndose así una ruta alterna de liberación de este nucleótido más lenta que la que opera a bajas concentraciones del aldehído.

## IX. PERSPECTIVAS

- Sintetizar los aldehídos 4-glutamil-4-aminobutiraldehído (GLUABAL), 4-guanidinobutiraldehído (GABAL), 3-hidroxi propionaldehído (3-HPAL), 2-aminopropionaldehído que han sido reportados como sustratos de la *PaKauB* y determinar sus parámetros cinéticos a concentraciones fisiológicas de  $\text{NAD}^+$  para compararlos con los probados en esta tesis e inferir su posible relevancia fisiológica.
- Cambiar el residuo Asp459 por un residuo de asparagina o alanina con el fin de comprobar la importancia de la carga y/o del tamaño de este residuo en la unión de aldehídos (TMABAL, ABAL, APAL, GLUABAL, GABAL) y confirmar si dicho residuo es el responsable de no permitir la entrada de BAL al sitio catalítico.
- Investigar el papel de los residuos que forman la caja de aromáticos en la unión de los aldehídos al sitio activo, obteniendo enzimas en los que cada uno de los residuos haya sido cambiado en forma individual por una alanina, e investigando cómo afectan estos cambios los parámetros cinéticos para los diferentes aldehídos.
- Investigar mediante análisis genómicos y por medio de la técnica RT-q-PCR si el gen *PakauB* se expresa constitutivamente, o se induce por una amplia variedad de sustratos, como sugiere su amplia especificidad encontrada en este trabajo de tesis.
- Validar la importancia fisiológica de la actividad de la *PaKauB* en la bacteria *P. aeruginosa* comprobando si una mutante nula inhibe o anula el crecimiento de la bacteria en diferentes medios de cultivo que contengan como única fuente de carbono los compuestos en cuya degradación suponemos que participa esta enzima con base en los resultados obtenidos en este trabajo.

## **PERSPECTIVAS**

- Conociendo el mecanismo cinético de la enzima, el mecanismo catalítico y su estructura tridimensional identificar y probar experimentalmente compuestos que puedan inhibir específicamente la enzima y que tengan potencial farmacológico contra las infecciones de esta importante bacteria patógena.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L-W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilligere, T. C., Zwart, P. H. 2010. PHENIX: a comprehensive python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66: 213–221.
- 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.
- Baldoma, L., Aguilar, J. 1987. Involvement of lactaldehyde dehydrogenase in several metabolic pathways of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 262: 13991-13999.
- Belitsky, B. R., Sonenshein, A. L. 2002. GabR, a member of a novel protein family, regulates the utilization of gamma-aminobutyrate in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 45: 569–583.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Wheeler, D. L. 2005. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 33: D34-D38.
- Black, W., Vasilou, V. 2009. The aldehyde dehydrogenase gene superfamily resource center. *Hum. Genomics* 4: 136–142.
- Boch, J., Nau-Wagner, G., Kneip, S., Bremer, E. 1997. Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: Characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch. Microbiol.* 168: 282–289.



## BIBLIOGRAFÍA

- Brocker, C., Lassen, N., Estey, T., Pappa, A., Cantore, M., Orlova, V.V., Chavakis, T., Kavanagh, K.L., Oppermann, U., Vasiliou, V. 2010. Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress, *J. Biol. Chem.* 285: 18452–18463.
- Brocker, C., Vasiliou, M., Carpenter, S., Carpenter, C., Zhang, Y., Wang, X., Kotchoni, S.O., Wood, A.J., Kirch, H.H., Kopečný, D., Nebert, D.W., Vasiliou, V. 2012. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta.* 237: 189-210.
- Brunner, N. A., Brinkmann, H., Siebers, B., Hensel, R. 1998. NAD<sup>+</sup>-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax* the first identified archaeal member of the aldehyde dehydrogenase superfamily is a glycolytic enzyme with unusual regulatory properties. *J. Biol. Chem.* 273: 6149–6156.
- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W. 1998. Crystallography & NMR System (CNS): a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 54: 905-921.
- Cauët, E., Rooman, M., Wintjens, R., Liévin, J., Biot, C. 2005. Histidine-aromatic interactions in proteins and protein-ligand complexes: quantum chemical study of X-ray and model structures. *J. Chem. Theory Comput.* 1: 472-483.
- Chambliss, K. L., Gray, R. G., Rylance, G., Pollitt, R. J., Gibson, K. M. 2000. Molecular characterization of methylmalonate semialdehyde dehydrogenase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23: 497–504.

## BIBLIOGRAFÍA

- Chen, C., Joo, J. C., Brown, G., Stolnikova, E., Halavaty, A. S., Savchenko, A., Anderson, W. F., Yakunin, A. F. 2014. Structure-based mutational studies of substrate inhibition of betaine aldehyde dehydrogenase BetB from *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 3992–4002.
- Chou, H. T., Kwon D.H., Hegazy M., Lu C. D. 2008. Transcriptome analysis of agmatine and putrescine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 190: 1966–1975.
- Chou, H. T., Li, J. Y., Peng, Y. C. Lu, C. D. 2013. Molecular characterization of PauR and its role in control of putrescine and cadaverine catabolism through the  $\gamma$ -glutamylation pathway in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 195: 3906–3913.
- Cleland, W.W. 1963. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. *Biochim. Biophys. Acta* 67: 104–137.
- Collaborative Computational Project. 1994. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 50: 760-3.
- Costanzo, L. D., Gomez, G. A., Christianson, D. W. 2007. Crystal structure of lactaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli* and inferences regarding substrate and cofactor specificity. *J. Mol. Biol.* 366: 481–493.
- Cozzani, I., Fazio, A.M., Felici, E., Barletta, G. 1980. Separation and characterization of NAD<sup>+</sup>- and NADP<sup>+</sup>-specific succinate-semialdehyde dehydrogenase from *Escherichia coli* k-12 3300. *Biochim. Biophys. Acta* 613: 309 - 317.
- Csonka, L.N. Hanson, A.D. 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45:569-606.
- Dagorn, A., Hillion, M., Chapalain, A., Lesouhaitier, O., Duclairoir-Poc, C., Vieillard, J., Chevalier, S., Taupin, L., Le Derf, F., Feuilloley, M.G.J. 2013. Gamma-aminobutyric

- acid acts as a specific virulence regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 159: 339-351.
- Dagorn, A., Chapalain, A., Mijouin, L., Hillion, M., Duclairoir-Poc, C., Chevalier, S., Taupin, L., Orange, N., Feuilloley, M. J. G. 2013. Effect of GABA, a bacterial metabolite, on *Pseudomonas fluorescens* surface properties and cytotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 12187-12204.
- De Azevedo Wäsch, S. I., Van der Ploeg, J. R., Maire, T., Lebreton, A., Kiener, A., Leisinger, T. 2002. Transformation of isopropylamine to L-alaninol by *Pseudomonas sp.* strain KIE171 involves N-glutamylated intermediates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2368–2375.
- Díaz-Sánchez A.G., González-Segura L., Rudiño-Piñera E., Lira-Rocha A., Torres-Larios A., Muñoz-Clares R.A. 2011. Novel NADPH-cysteine covalent adduct found in the active site of an aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* 439: 443–452.
- Díaz-Sánchez, Á. G., González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C. Rudiño-Piñera, E., Montiel, C., Martínez-Castilla, L. P., Muñoz-Clares, R. A. 2012. Amino acid residues critical for the specificity for betaine aldehyde of the plant ALDH10 isoenzyme involved in the synthesis of glycine betaine. *Plant Physiol.* 158: 1570–1582.
- Eklund, H., Nordstrom, B., Zeppezauer, E., Soderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T., Branden, C-I. 1974. The structure of horse liver alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.* 44: 200-204.
- Emsley, P., Cowtan, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 60: 2126-2132.
- Falkenberg, P., Strøm A.R. 1990. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1034: 253-259.

- Fan, C. L., Rodwell, V. W. 1975. Physiological consequences of starvation in *Pseudomonas putida*: Degradation of intracellular protein and loss of activity of the inducible enzymes of L-arginine catabolism. *J. Bacteriol.* 124: 1302–1311.
- Feldman, R. I., 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. Valenzuela-Soto, E. M. 2000. Kinetic study of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269: 596–603.
- Flores, H. E., Filner, P. 1985. Polyamine catabolism in higher plants: characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Regul.* 3: 277–291.
- Gill, S.C., Von Hippel, P.H. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**: 319-326.
- González-Segura, L., Rudiño-Piñera, E., Muñoz-Clares, R. A., 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<sup>+</sup> and a novel cation binding site. *J. Mol. Biol.* 385: 542-557.
- González-Segura, L., Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., Muñoz-Clares, R. A. 2015. Residues that influence coenzyme preference in the aldehyde dehydrogenases. *Chem.-Biol. Interact.* 234: 59–74.
- Gruez, A., Roig-Zamboni, V., Grisel, S., Salomoni, A., Valencia, C., Campanacci, V., Tegoni, M., Cambillau, C. 2004. Crystal structure and kinetics identify *Escherichia coli* YdcW gene product as a medium-chain aldehyde dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 343:29-41.

## BIBLIOGRAFÍA

- Halavaty, A. S., Rich, R. L., Chen, C., Joo, J. C., Minasov, G., Dubrovskaya, I., Winsor, J. R., Myszka, D. G., Duban, M., Shuvalova, L., Yakunin, A. F., Anderson, W. F. 2015. Structural and functional analysis of betaine aldehyde dehydrogenase from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr.* 71: 1159-1175.
- Hanson, A. D., May, A. M., Grumet, R., Bode, J., Jamieson, G. C., Rhodes, D. 1985. Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3678–3682.
- Hassan, M., Okada, M., Ichiyanagii, T., Mori, N. 2008. 4-N-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase: purification and characterization of an enzyme from *Pseudomonas sp.* 13CM. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 155-162.
- Hassan, M., Morimoto, S., Murakami, H., Ichiyanagi, T., Mori, N. 2007. Purification and characterization of 4-N-trimethylamino-1-butanol dehydrogenase of *Pseudomonas sp.* 13CM. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 1439–1446.
- Hempel, J., Perozich, J., Chapman, T., Rose, J., Boesch, J. S., Liu, Z. J., Lindahl R., Wang B.C. 1999. Aldehyde dehydrogenase catalytic mechanism. A proposal. *Adv. Exp. Med. Biol.* 436: 53–59.
- Henehan, G. T., Tipton, K. F. 1992. Steady-state kinetic analysis of aldehyde dehydrogenase from human erythrocytes. *Biochem. J.* 287: 145-150.
- Hjelmqvist, L., El-Ahmad, M., Johansson, K., Norin, A., Ramaswamy, S., Jörnvall, H. Structure and function of betaine aldehyde dehydrogenase. An enzyme within the multienzyme aldehyde dehydrogenase system, in: H. Weiner, M. Edmund, D. W. Crabb, R. Lindahl (Eds.), *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 7*, Springer Science + Business Media New York, New York, IN, 1999, pp. 39-44.

- Ho, K. K., Weiner, H. 2005. Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the aldB gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187: 1067–1073.
- Indurthi, S. M., Chou, H-T., Lu, C-D. 2016. Molecular characterization of lysR-lysXE, gcdR-gcdHG and amaR-amaAB operons for lysine export and catabolism: a comprehensive lysine catabolic network in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 162: 876–888.
- Jackson, B., Brocker, C., Thompson, D. C., Black, W., Vasiliou, K., Nebert, D. W., Vasiliou, V. 2011. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum. Genomics*. 5: 283 –303.
- Jakoby, W.B. Fredericks, J. 1959. Pyrrolidine and putrescine metabolism: gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 234: 2145-2150
- Jakoby, W. B. 1963. Aldehyde dehydrogenases. In *The enzymes*, 2<sup>nd</sup> edn, vol 7. (eds Boyer, P. D., Lard, H., Myrback, K.). New York: Academic Press. Pp. 203-221.
- Jang, E. H., Park, S. A., Chi, Y. M., Lee, K. S. 2015. Structural insight into the substrate inhibition mechanism of NADP<sup>+</sup>-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from *Streptococcus pyogenes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 461: 487-493.
- Jann, A., Matsumoto, H., Haas. D. 1988. The fourth arginine catabolic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1043–1053.
- Jastrzab, R., Kaczmarek, M.T., Nowak, M., Trojanowska, A., Zabiszak, M. 2017. Complexes of polyamines and their derivatives as living system active compounds. *Coord. Chem. Rev.* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2017.05.001>.
- Jo, J. E., Mohan Raj, S., Rathnasingh, C., Selvakumar, E., Jung, W. C., Park, S. Cloning. 2008. Expression and characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Escherichia*

- Coli* K-12 that utilizes 3-hydroxypropionaldehyde as a substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 51–60.
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jornvall, H., Eklund, H. L. 1998. Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci.* 7: 2106-2117.
- Julián-Sánchez, A., Riveros-Rosas, H., Martínez-Castilla, L. P., Velasco-García, R., Muñoz-Clares, R.A. Phylogenetic and structural relationships of the betaine aldehyde dehydrogenases, in: H. Weiner, E. Maser, R. Lindahl, B. Plapp (Eds.), *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism - 13*, Purdue University Press, West Lafayette, IN, 2007, pp. 64-76.
- Jung, H., Jung, K., Kleber, H-P. 1990. L-cartinone metabolism and osmotic stress response in *Escherichia coli*. *J. Basic Microbiol.* 30: 409-413.
- Kabsch, W. 2010. XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66: 125-132.
- Kaufman, R. A., Broquist, H. P. 1977. Biosynthesis of carnitine in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 252: 7437-7439.
- Kilbourn, J.P. 1978. Bacterial content and ionic composition of sputum in cystic fibrosis. *Lancet* 311: 334.
- Kleber, H. P. 1997. Bacterial carnitine metabolism. *FEMS Microbiol. Lett.* 147: 1–9.
- Ko, Y., Ashok, S., Zhou, S., Kumar, V., Park, S. 2012. Aldehyde dehydrogenase activity is important to the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by recombinant *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochem.* 47: 1135-1147
- Kopečný, D., Koncítiková, R., Tylichová, M., Vigouroux, A., Moskalíková, H., Soral, M., Sebelá, M., Morera, S. 2013. Plant ALDH10 family: identifying critical residues

- for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate. *J. Biol. Chem.* 288: 9491-9507.
- Kramer, J. J., Gooding, R. C., Jones, M. E. 1988. A radiochemical assay for a NADP<sup>+</sup>-specific  $\gamma$ -glutamate semialdehyde dehydrogenase extracted from mitochondrial membrane of rat intestinal epithelial cells. *Anal. Biochem.* 168: 380-386.
- Kurihara, S.; Oda, S.; Kato, K.; Kim, H. G.; Koyanagi, T.; Kumagai, H.; Suzuki, H. 2005. A novel putrescine utilization pathway involves  $\gamma$ -glutamylated intermediates of *Escherichia Coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 280: 4602–4608.
- Kurys, G., Ambroziak, W., Pietruszko, R. 1989. Human aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of a third isozyme with low  $K_m$  for gamma-aminobutyraldehyde. *J. Biol. Chem.* 264: 4715-4721.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Large, P. J. 1992. Enzymes and pathways of polyamine breakdown in microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 88: 249-262.
- Lesk, A. M. 1995. NAD-binding domains of dehydrogenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 775-783.
- 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. 1997. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD<sup>+</sup> and the Rossmann fold. *Nat. Struct. Biol.* 4: 317–326.
- 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



## BIBLIOGRAFÍA

- Luckey, S. W. Petersen, D. R. 2001. Metabolism of 4-hydroxynonenal by rat kupffer cells. Arch. Biochem. Biophys. 389: 77–83.
- Luo, L., Seo, J.-W., Baek, J.-O., Oh, B.-R., Heo, S.-Y., Hong, W.-K., Kim, D.-H., Kim, C. 2011. Identification and characterization of the propanediol utilization protein PduP of *Lactobacillus reuteri* for 3-hydroxypropionic acid production from glycerol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89: 697-703.
- Luo, M., Singh, R. K., Tanner, J. J. 2013. Structural determinants of oligomerization of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase: identification of a hexamerization hot spot. J. Mol. Biol. 425: 3106-3120.
- MacGibbon, A. K., Blackwell, L. F., Buckley, P. D. 1977. Kinetics of sheep - liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 77: 93-100.
- Mandon, K., Osteras, M., Boncompagni, E., Trinchant, J. C., Spennato, G., Poggi, M.C., Le, R.D. 2003. The *Sinorhizobium meliloti* glycine betaine biosynthetic genes (betLCBA) are induced by choline and highly expressed in bacteroids. Mol. Plant Microbe Interact. 16: 709-719.
- Mann, C. J., Weiner, H. 1999. Differences in the roles of conserved glutamic acid residues in the active site of human class 3 and class 2 aldehyde dehydrogenases. Protein Sci. 8: 1922–1929.
- Marquardt, D. W. 1963. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. J. Soc. Ind. Appl. Math. 11: 431-441.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L.C., Read, R. J. 2007. Phaser crystallographic software. J. Appl. Crystallogr. 40: 658-674.

## BIBLIOGRAFÍA

- McCowen, S. M., Phibbs, P. V., Feary, T. W. 1981. Glycerol catabolism in wild-type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.* 5: 191-196.
- Mesaros, N., Nordmann, P., Plésiat, P., Roussel-Delvallez, M., Eldere, J. V., Glupczynski, Y., Laethem, Y. V., Jacobs, F., Lebecque, P., Malfroot, A., Tulkens, P. M., Bambeke, F. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 560–578.
- Mills, P.B., Struys, E., Jakobs, C., Plecko, B., Baxter, P., Baumgartner, M., Willemssen, M.A., Omran, H., Tacke, U., Uhlenberg, B., Weschke, B., Clayton, P.T. 2006. Mutations in antiquitin in individuals with pyridoxine-dependent seizures. *Nat. Med.* 12: 307–309.
- Mohamed-Ahmeda, I. A., Eltayeba, M. E., Mori, N., Arimab, J., Tanakac, H., Taniguchid, T., Yamanaka, N. 2015. Proteomic analysis of homocholine catabolic pathway in *Pseudomonas sp.* strain A. *Process Biochem.* 50: 1735–1747.
- Mori, N., Kawakami, B., Hyakutome, K., Tani, Y., Yamada, H. 1980. Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpum didymium* M-1. *Agric. Biol. Chem.* 40: 3015-3016.
- Mori, N., Fuchigami, S., Kitamoto, Y. 2002. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase with high affinity for NADP<sup>+</sup> from *Arthrobacter globiformis*. *J. Biosci. Bioeng.* 93: 130–135.
- Mori, N., Yoshida, N., Kitamoto, Y. 1992. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. *J. Ferment. Bioeng.* 73: 352–356.
- Morimoto, N., Fukuda, W., Nakajima, N., Masuda, T., Terui, Y., Kanai, T., Oshima, T., Imanaka, T., Fujiwara, S. 2010. Dual biosynthesis pathway for longer-chain polyamines in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *J. Bacteriol.* 192: 4991-5001.

## BIBLIOGRAFÍA

- Moschou, P.N., Wu, J., Cona, A., Tavladoraki, P., Angelini, R., Roubelakis-Angelakis, K. A., 2012. The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 63: 5003-5015.
- Muñoz-Clares, R. A., Díaz-Sánchez, A. G., 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, R. A., González-Segura, L., Díaz-Sánchez, Á. 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.
- Muñoz-Clares, R. A., González-Segura, L., Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A. 2015. Amino acid residues that affect the basicity of the catalytic glutamate of the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. *Chem-Biol. Interac.* 234: 45era.
- Muñoz-Clares, R. A., González-Segura, L., Murillo-Melo, D. S., Riveros-Rosas, H. 2017. Mechanisms of protection against irreversible oxidation of the catalytic cysteine of ALDH enzymes: possible role of vicinal cysteines. *Chem-Biol. Interact.*
- Nagasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y., Ogata, K. 1976. Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agric. Biol. Chem.* 40: 1743-1749.
- NCBI Resource Coordinators. 2017. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 45: D12-D17.
- Nordlund, I., Shingler, V. 1990. Nucleotide sequences of the recta-cleavage pathway enzymes 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase and 2-hydroxymuconic

- semialdehyde hydrolase from *Pseudomonas* CF600. *Biochim. Biophys. Acta* 1049: 227-230.
- Padmanabhan, R., Tchen, T. T. 1972. Aminoaldehyde dehydrogenases from a *Pseudomonas* species grown on polyamines. *Arch. Biochem. Biophys.* 150: 531–541.
- Perez-Miller, S. J.; Hurley, T. D. 2003. Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* 42: 7100–7109.
- Perozich, J., Nicholas, H., Wang, B.C., Lindahl, R., Hempel, J. 1999. Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci.* 8: 137-146.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. 2004. UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 13: 1605-1612.
- Pesin, S.R., Candia, O.A. 1982. Acetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 22:651–659.
- Rennick, B.R. 1981. Renal tubule transport of organic ions. *Am. J. Physiol.* 240: F83–F89.
- Riveros-Rosas, H., González-Segura, L., Julián-Sánchez, A., Díaz-Sánchez, Á. G., Muñoz-Clares, R. A. 2013. Structural determinants of substrate specificity in aldehyde dehydrogenases. *Chem-Biol. Interact.* 202: 51–61
- Rothschild, H.A., Guzman-Barron, E. S. 1954. The oxidation of betaine aldehyde by betaine aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 209: 511-523.
- Sanders, C. C., Sanders, Jr W. E. 1986. Type I  $\beta$ -lactamases of gramnegative bacteria: interactions with  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Infect. Dis.* 154: 792-800.
- Samsonova, N. N., Smirnov, S. V., Novikova, A. E., Ptitsyn, L. R. 2005. Identification of *Escherichia coli* K12 YdcW protein as a  $\gamma$ -aminobutyraldehyde dehydrogenase. *FEBS Lett.* 579: 4107–4112.

## BIBLIOGRAFÍA

- Sanger, F., Coulson, A. R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94: 441-448.
- Savoia, D. 2014. New perspectives in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Future Microbiol.* 9: 917–928.
- Schauenstein, E., Esterbauer, H., Zollner. 1977. Aldehydes in biological systems: their natural occurrence and biological activities. University of Michigan: Pion Advanced Biochemistry Series, 1977.
- Šebela, M., Brauner, F., Radová, A., Jacobsen, S., Havliš, J., Galuszka, P., Peč, P. 2000. Characterization of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1480: 329–341
- Segel, I. H. Steady-state kinetics of multireactant enzymes, in: *Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*, John Wiley Sons, Inc. United States of America, IN, 1993, pp. 560-590.
- Seiler, N. 2004. Catabolism of polyamines. *Amino Acids* 26: 217–233.
- Sidhu, R. S., Blair, A. H. 1975. Human liver aldehyde dehydrogenase. Kinetics of aldehyde oxidation. *J. Biol. Chem.* 250: 7899-7904.
- Siegel, L. S., Phibbs, P. V. 1979. Glycerol and L- $\alpha$ -glycerol-3-phosphate uptake by *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.* 2: 251-256.
- Sima, A., Parisotto, M., Mader, S., Bhat, P.V. 2009. Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates, *Biochim. Biophys. Acta* 1790: 1660–1664.
- Sophos, N. A., Vasiliou, V. 2003. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem.-Biol. Interact.* 143-144: 5-/22.

## BIBLIOGRAFÍA

- Steinmetz, C. G., Xie, P., Weiner, H., Hurley, T. D. 1997. Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: The genetic component of ethanol aversion. *Structure* 5: 701–711.
- Strijbis, K., Vaz, F. M., Distel, B. 2010. Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway. *IUBMB Life* 62: 357–362.
- Su M., Li, Y., Ge, X., Tian, P. 2015. 3-Hydroxypropionaldehyde-specific aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis* catalyzes 3-hydroxypropionic acid production in *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol. Lett.* 37: 717–724.
- Subramanian M. R., Chelladurai R., Woo-Chel J., Edwardraja S., Sunghoon P. 2010. A novel NAD<sup>+</sup>-dependent aldehyde dehydrogenase encoded by the puuC gene of *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 that utilizes 3-hydroxypropionaldehyde as a substrate. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15: 131-138.
- Suryang, K., Yong-Cheol, P., Jin-Ho, S. 2013. Biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid from glycerol in recombinant *Escherichia coli* expressing *Lactobacillus brevis* dhaB and dhaR gene clusters and *E. coli* K-12 aldH. *Bioresour. Technol.* 135: 432-439
- Tabor, C. W., Tabor H. 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 49: 81–99.
- Tanaka, K., Matsuno, E.; Shimizu, E., Shibai, H., Yorifuji, T. 2001. Purification and characterization of aminopropionaldehyde dehydrogenase from *Arthrobacter* sp. TMP-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 195: 191–196.
- Tricot, C.; Pierard, A.; Stalon, V. 1990. Comparative studies on the degradation of guanidino and ureido compounds by *Pseudomonas*. *J. Gen. Microbiol.* 136: 2307–2317.
- Trossat, C., Rathinasabapathi, B., Hanson, A. D. 1997. Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of

- dimethylsulfoniopropionaldehyde and  $\gamma$ -aminoaldehydes. *Plant Physiol.* 113: 1457–1461.
- Trott, O., Olson, A. J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31: 455-461.
- Tylichova, M., Kopecny, D., Morera, S., Briozzo, P., Lenobel, R., Snegaroff, J., Sebela, 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, R. A. 1994. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *J. Plant Physiol.* 143: 145–152.
- Valenzuela-Soto, E.M., 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.
- Valle, D., Goodman, G. I., Harris, S. C., Phang, J. M. 1979. Genetic evidence for a common enzyme catalyzing the second step in the degradation of proline and hydroxyproline. *J. Clin. Invest.* 64: 1365-1370.
- Vanderbilt, A. S.; Gaby, N. S.; Rodwell, V. W. 1975. Intermediates and enzymes between alpha-ketoarginine and gamma-guanidinobutyrate in the L-arginine catabolic pathway of *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 250: 5322–5329.
- Vasiliou, V., Pappa, A., Petersen, D. R. 2000. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem-Biol. Interact.* 129: 1–19.

## BIBLIOGRAFÍA

- Vaz, F. M., Fouchier, S. W., Ofman, R., Sommer, M., Wanders, R. J. A. 2000. Molecular and biochemical characterization of rat gamma-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde-dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 275: 7390–7394.
- Velasco-García, R., Chacón-Aguilar, V.M., Hervert-Hernández, D., Muñoz-Clares, R.A. 2003. Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves by disulfiram. *Chem. Biol. Interact.* 143-144: 149-158.
- Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G., Muñoz-Clares, R. A. 1999. Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181: 1292–1300.
- Velasco-García, R., González-Segura, L., Muñoz-Clares, R. a. 2000. Steady-state kinetic mechanism of the NADP<sup>+</sup>- and NAD<sup>+</sup>-dependent reactions catalyzed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* 352: 675–683.
- Velasco-García R., Villalobos, M. A., Ramírez-Romero, M. A., Mújica-Jiménez, C., Iturriaga, G., 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.
- Vojtechová, M., Hanson, A. D., Muñoz-Clares, R. A. 1997. Betaine-aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD<sup>+</sup>-dependent oxidation of dimethylsulfonylpropionaldehyde to dimethylsulfonylpropionate. *Arch Biochem. Biophys.* 337: 81–88.



## BIBLIOGRAFÍA

- Vojtechová, M., Rodríguez-Sotres, R., Valenzuela-Soto, E. M., Muñoz-Clares, R. A. 1997. Substrate inhibition by betaine aldehyde of betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Biochim. Biophys. Acta* 1341: 49–57.
- Wang, X., Weiner, H. 1995. Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 34: 237–243.
- Wargo, M. J. 2013. Choline catabolism to glycine betaine contributes to *Pseudomonas aeruginosa* survival during murine lung infection. *PLoS ONE* 8: e56850.
- Watanabe, S., Piyanart, S., Makino, K. 2008. Metabolic fate of L-lactaldehyde derived from an alternative L-rhamnose pathway. *FEBS. J.* 275: 5139-5149.
- Weiner, H., Wang, X. 1994. Aldehyde dehydrogenase and acetaldehyde metabolism. *Alcohol Alcohol.* 2: 141-145.
- Weretilnyk, E. A., Bednarek, S., McCue, K. F., Rhodes, D., Hanson, A. D. 1989. Comparative biochemical and immunological studies of the glycine betaine synthesis pathway in diverse families of dicotyledons. *Planta* 178: 342–352.
- Weretilnyk, E. A., Hanson, A. D. 1989. Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, in vitro translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Arch. Biochem. Biophys.* 271: 56–63.
- Westlund, P., Fylling, A. C., Cederlund, E., Jörnvall, H. 1994. 11-Hydroxythromboxane B2 dehydrogenase is identical to cytosolic aldehyde dehydrogenase. *FEBS Lett.* 345, 99-103.
- White, W. H., Skatrud, P. L., Xue, Z., Toyn, J. H. 2003. Specialization of function among aldehyde dehydrogenases: The ALD2 and ALD3 genes are required for  $\beta$ -alanine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163: 69–77.

## BIBLIOGRAFÍA

- Wood, P.L., Khan, M.A., Moskal, J. R. 2007. The concept of “aldehyde load” in neurodegenerative mechanisms: Cytotoxicity of the polyamine degradation products hydrogen peroxide, acrolein, 3-aminopropanal, 3-acetamidopropanal and 4-aminobutanal in a retinal ganglion cell line. *Brain. Res.* 1145: 150–156
- Wright, J.R., Clements, J.A. 1987. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: 426–444.
- Wu, W., Jin, Y., Bai, F., Jin, S. 2015. *Pseudomonas aeruginosa*. En Y. W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, J. Schwartzman (Eds.), *Molecular Medical Microbiology*, pp. 753-767. Londres, UK: Elsevier Ltd.
- Yamanishi, Y., Mihara, H., Osaki, M., Muramatsu, H., Esaki, N., Sato, T., Hizukuri, Y., Goto, S., Kanehisa, M. 2007. Prediction of missing enzyme genes in a bacterial metabolic network reconstruction of the lysine-degradation pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS J.* 274: 2262–2273.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217:1214-1222.
- Yao, X., He, W., Lu, C.D. 2011. Functional characterization of seven gamma-glutamylpolyamine synthetase genes and the bauRABCD locus for polyamine and beta-alanine utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 193: 3923–3930.
- Yorifugi, T., Koike, K., Sakurai, T., Yokoyama, K. 1986. 4-Aminobutyraldehyde and 4-guanidinobutyraldehyde dehydrogenase for arginine degradation in *Pseudomonas putida*. *Agric. Biol. Chem.* 50: 2009–2016.
- Yoshida, A., Rzhetsky, A., Hsu, L. C., Chang, C. 1998. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur. J. Biochem.* 251: 549–557.

## BIBLIOGRAFÍA

- Zaldívar-Machorro, V. J., López-Ortiz, M., Demare, P., Regla, I., Muñoz-Clares, R. A. 2011. The disulfiram metabolites S-methyl-N,N-diethyldithiocarbamoyl sulfoxide and S-methyl-N,N-diethylthiocarbamoyl sulfone irreversibly inactivate betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, both in vitro and in situ, and arrest bacterial growth. *Biochimie* 93: 286-295.
- Zhao, D., McCaffery, P., Ivins, K. J., Neve, R. L., Hogan, P., Chin, W. W., Drager, U. C. 1996. Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 240: 15-22.
- Zhao, X., Shen, M., Jiang, X., Shen, W., Zhong, Q., Yang, Y., Tan, Y., Agnello, M., He, X., Hu, F., Le, S. 2017. Transcriptomic and metabolomics profiling of phage–host interactions between phage PaP1 and *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 8: 1-10.
- Zhe, Y., Chung-Dar, L. 2007. Functional genomics enables identification of genes of the arginine transaminase pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189: 3945–3953.
- Zhou, Y., Wang, L., Yang, F., Lin, X., Zhang, S., Zhao, Z. K. 2011. Determining the extremes of the cellular NAD(H) level by using an *Escherichia coli* NAD<sup>+</sup>-auxotrophic mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 6133–6140.

XI. APÉNDICE

XI.1 Secuencia del gen PakauB clonado

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1471 bits(796)	0.0	796/796(100%)	0/796(0%)	Plus/Plus
Query 2	TGACCACCCCTGACCCGCGCCGACTGGGAAGCCCCGCGCCAAAGACCTGAAGATCGAAGGCC			61
Sbjct 68	TGACCACCCCTGACCCGCGCCGACTGGGAAGCCCCGCGCCAAAGACCTGAAGATCGAAGGCC			127
Query 62	GTGCCCTTCGTCAACGGCGAATACAGCAACGCCGCTCCGCGGAGACCTTCGATTGCCTGA			121
Sbjct 128	GTGCCCTTCGTCAACGGCGAATACAGCAACGCCGCTCCGCGGAGACCTTCGATTGCCTGA			187
Query 122	GCCCCGGTGGATGGCCGCTTCCTGGCCAAGGTCGCCAGTTGCGACCTGGCCGATGCCGAGC			181
Sbjct 188	GCCCCGGTGGATGGCCGCTTCCTGGCCAAGGTCGCCAGTTGCGACCTGGCCGATGCCGAGC			247
Query 182	AGGCGGTCAAGGTCGCCCCGAATGCCTTCGATTCCGGCGCCTGGTCGCGCTGGCGCCGG			241
Sbjct 248	AGGCGGTCAAGGTCGCCCCGAATGCCTTCGATTCCGGCGCCTGGTCGCGCTGGCGCCGG			307
Query 242	CCAAGCGCAAGCAGACGATGATCCGCTTCGCCGATCTGCTGCTGGAGAACGCCGAGGAGC			301
Sbjct 308	CCAAGCGCAAGCAGACGATGATCCGCTTCGCCGATCTGCTGCTGGAGAACGCCGAGGAGC			367
Query 302	TGGCCCTGCTGGAAACCCCTGGACATGGGCAAGCCGATCAGCGACTCGCTGCACATCGACG			361
Sbjct 368	TGGCCCTGCTGGAAACCCCTGGACATGGGCAAGCCGATCAGCGACTCGCTGCACATCGACG			427
Query 362	TCGCCAGCGCCGCCAACAGCCTGCGCTGGAGCGCCGAGGCGATCGACAAGATCTATGACG			421
Sbjct 428	TCGCCAGCGCCGCCAACAGCCTGCGCTGGAGCGCCGAGGCGATCGACAAGATCTATGACG			487
Query 422	AAGTCGCCGCACTCCCCATGCCGAGCTGGGCTGGTGACCCGCGAGCCGGTCGGCGTGG			481
Sbjct 488	AAGTCGCCGCACTCCCCATGCCGAGCTGGGCTGGTGACCCGCGAGCCGGTCGGCGTGG			547
Query 482	TCGCCGCCATCGTGCCGTGGAACTTCCCCTGCTGATGTCTGCTGGAAACTCGGTCCGG			541
Sbjct 548	TCGCCGCCATCGTGCCGTGGAACTTCCCCTGCTGATGTCTGCTGGAAACTCGGTCCGG			607
Query 542	CCCTGGCCACCGGCAACTCGGTGATCCTCAAGCCCTCCGAGAAGTCGCCGCTGACCGCCA			601
Sbjct 608	CCCTGGCCACCGGCAACTCGGTGATCCTCAAGCCCTCCGAGAAGTCGCCGCTGACCGCCA			667
Query 602	TCCGCATCGCCAGCTGGCCGTCGAGGCCGGCATTCCGAAAGGCGTGTCAACGTGCTGC			661
Sbjct 668	TCCGCATCGCCAGCTGGCCGTCGAGGCCGGCATTCCGAAAGGCGTGTCAACGTGCTGC			727
Query 662	CGGGCTATGGCCACACGGTAGGCAAGGCGCTGGCATTGCACATGGATGTCGACACCTGG			721
Sbjct 728	CGGGCTATGGCCACACGGTAGGCAAGGCGCTGGCATTGCACATGGATGTCGACACCTGG			787
Query 722	TGTTACCGGTTCCGACCAAGATCGCCAAGCAACTGATGGTCTATGCCGGCGAGTCGAACA			781
Sbjct 788	TGTTACCGGTTCCGACCAAGATCGCCAAGCAACTGATGGTCTATGCCGGCGAGTCGAACA			847
Query 782	TGAAGCGCGTCTGGCT			797
Sbjct 848	TGAAGCGCGTCTGGCT			863

(Continúa en la siguiente página)

*XI.1 Secuencia del gen PakauB clonado (Continúa)*

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1731 bits(937)	0.0	937/937(100%)	0/937(0%)	Plus/Plus
Query 558	CTCGGTGATCCTCAAGCCCTCCGAGAAGTCGCCGCTGACCGCCATCCGCATCGCCAGCT			617
Sbjct 1	CTCGGTGATCCTCAAGCCCTCCGAGAAGTCGCCGCTGACCGCCATCCGCATCGCCAGCT			60
Query 618	GGCCGTCGAGGCCGGCATTCCGAAAGGCGTGTCAACGTGCTGCCGGGCTATGGCCACAC			677
Sbjct 61	GGCCGTCGAGGCCGGCATTCCGAAAGGCGTGTCAACGTGCTGCCGGGCTATGGCCACAC			120
Query 678	GGTAGGCAAGGCGCTGGCATTGCACATGGATGTCGACACCCTGGTGTTCACCGGTTGAC			737
Sbjct 121	GGTAGGCAAGGCGCTGGCATTGCACATGGATGTCGACACCCTGGTGTTCACCGGTTGAC			180
Query 738	CAAGATCGCCAAGCAACTGATGGTCTATGCCGGCGAGTCGAACATGAAGCGCGTCTGGCT			797
Sbjct 181	CAAGATCGCCAAGCAACTGATGGTCTATGCCGGCGAGTCGAACATGAAGCGCGTCTGGCT			240
Query 798	GGAGGCCGGCGGCAAGAGCCCGAACATCGTCTTCGCCGACGCCCGGACCTGAAGGCCGC			857
Sbjct 241	GGAGGCCGGCGGCAAGAGCCCGAACATCGTCTTCGCCGACGCCCGGACCTGAAGGCCGC			300
Query 858	CGCCGAAGCCGCTGCCGGCGCCATCGCCTTCAACCAAGGGCGAAGTCTGCACCGCCGGTTC			917
Sbjct 301	CGCCGAAGCCGCTGCCGGCGCCATCGCCTTCAACCAAGGGCGAAGTCTGCACCGCCGGTTC			360
Query 918	GCGCCCTGCTGGTGGAGCGCTCCATCAAGGACAAGTTCTGCCCTGGTGATCGAGGCCCT			977
Sbjct 361	GCGCCCTGCTGGTGGAGCGCTCCATCAAGGACAAGTTCTGCCCTGGTGATCGAGGCCCT			420
Query 978	CAAGGGCTGGAAACC GGGAACCCGCTGGATCCGGAAACCAACGTCGGCGCGCTGGTGG			1037
Sbjct 421	CAAGGGCTGGAAACC GGGAACCCGCTGGATCCGGAAACCAACGTCGGCGCGCTGGTGG			480
Query 1038	CACCCAGCAGATGAACACCGTGTCTACATCGAGGCCGGTCAACAGACGGCGCCAA			1097
Sbjct 481	CACCCAGCAGATGAACACCGTGTCTACATCGAGGCCGGTCAACAGACGGCGCCAA			540
Query 1098	GCTGGTCGCCGGCGCAAGCGGACCCTGGAAGAACTGGTGGCACCTACGTCGAGCCGAC			1157
Sbjct 541	GCTGGTCGCCGGCGCAAGCGGACCCTGGAAGAACTGGTGGCACCTACGTCGAGCCGAC			600
Query 1158	TATCTTCGACGGCGTGACCAATGCGATGAAGATCGCCCGCAGGAAATCTTCGGCCGGT			1217
Sbjct 601	TATCTTCGACGGCGTGACCAATGCGATGAAGATCGCCCGCAGGAAATCTTCGGCCGGT			660
Query 1218	GCTCTCGGTGATCGAGTTCGAGGATGCCGAGGAAGCCGTGCGCATCGCCAACGACACGCC			1277
Sbjct 661	GCTCTCGGTGATCGAGTTCGAGGATGCCGAGGAAGCCGTGCGCATCGCCAACGACACGCC			720
Query 1278	CTATGGGCTGGCGGCGGCGGTCTGGACCAGCAACCTGTCCAAGGGCGCACCTGACTGCCAA			1337
Sbjct 721	CTATGGGCTGGCGGCGGCGGTCTGGACCAGCAACCTGTCCAAGGGCGCACCTGACTGCCAA			780
Query 1338	GGCCCTGCGCGCCGGCAGCGTCTGGGTCAACAGTACGACGGCGGCGACATGACCCTCC			1397
Sbjct 781	GGCCCTGCGCGCCGGCAGCGTCTGGGTCAACAGTACGACGGCGGCGACATGACCCTCC			840
Query 1398	GTTCCGGCGGCTTCAAGCAGTCGGGCAACGGTCCGCAAGTGCCTGCACGCCTTCGACAA			1457
Sbjct 841	GTTCCGGCGGCTTCAAGCAGTCGGGCAACGGTCCGCAAGTGCCTGCACGCCTTCGACAA			900
Query 1458	GTACACCGAGCTGAAAGGCGACCTGGATCAAGCTCTGA 1494			
Sbjct 901	GTACACCGAGCTGAAAGGCGACCTGGATCAAGCTCTGA 937			

**Figura A1. Análisis de secuenciación del gen *PakauB*.** El alineamiento de los resultados de la secuenciación hecha en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM del gen clonado por nosotros a partir del DNA de *P. aeruginosa* con la secuencia del gen PA5312 (*PakauB*) depositada en la base datos del NCBI usando la herramienta BLAST confirmó

que ambas secuencias coincidían en su totalidad y que el gen insertado en el vector de expresión estaba en el marco de lectura correcto y no tenía ninguna mutación.

**XI.2. Datos espectroscópicos del producto de síntesis del 4-trimetilamoniobutiraldehído**

Se sintetizó como cloruro y en forma de dietilacetal para evitar que el aminoaldehído libre se polimerizara.

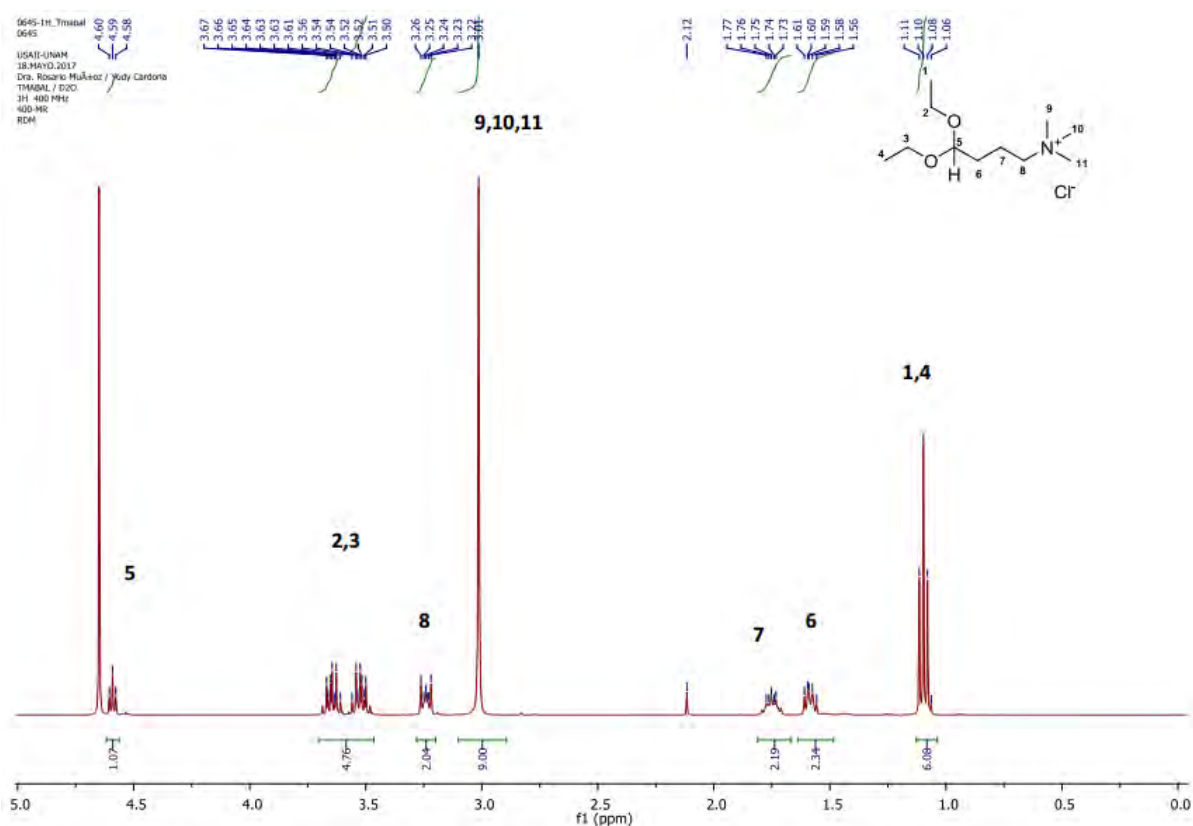


Figura A2. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del trimetilaminobutiraldehído dietilacetal en  $\text{D}_2\text{O}$ .

(Continúa en la siguiente página)

*XI.2. Datos espectroscópicos del producto de síntesis del 4-trimetilamonibutiraldehído (continúa)*

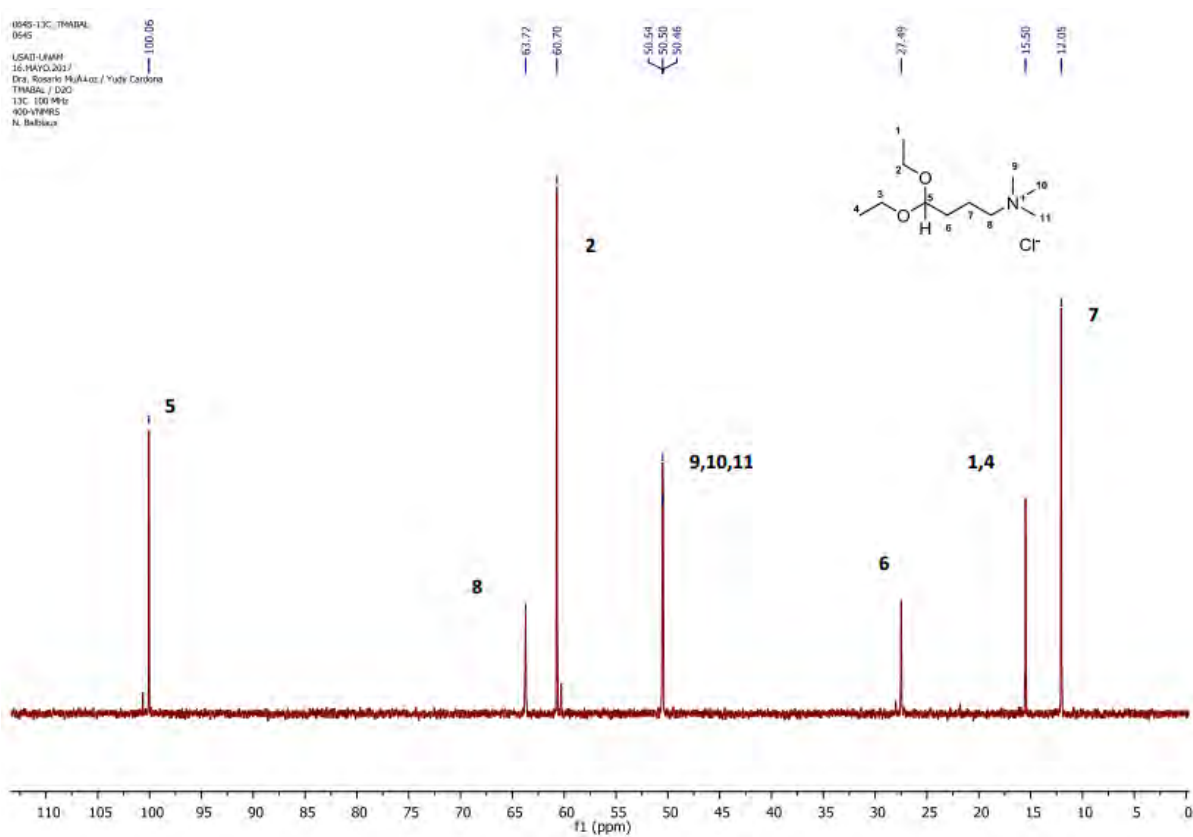


Figura A3. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del trimetilaminobutiraldehído dietilacetal en  $\text{D}_2\text{O}$ .