



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA BETAÍNA ALDEHÍDO
DESHIDROGENASA DE ESPINACA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
KARLA ITZEL CASANOVA FIGUEROA**

**TUTOR PRINCIPAL:
ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES
FACULTAD DE QUÍMICA**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ
FACULTAD DE MEDICINA**

**DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES
FACULTAD DE MEDICINA**

Ciudad de México. Abril, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares por su enseñanza, trabajo y esfuerzo durante la realización de este proyecto

A los doctores Juan Pablo Pardo Vázquez e Ismael Bustos Jaimes, miembros del comité tutor

A los miembros del jurado

Presidente	Dr. Agustín López-Munguía Canales
Vocal	Dr. Luis Fernando Olguín Contreras
Vocal	Dra. Leticia Haydeé Ramírez Silva
Vocal	Dra. Adela Rodríguez Romero
Secretario	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Al Biól. Carlos Mújica Jiménez, asesor técnico

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a su Facultad de Química

Al Programa de Apoyo al Posgrado y la Innovación Tecnológica (PAPIIT IN220317), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 252123 y 283524) y a la Facultad de Química de la UNAM (PAIP 5000-9119) por el apoyo financiero otorgado a la Dra. Rosario A. Muñoz Clares

Al CONACyT por la beca de posgrado otorgada (812283)

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Generalidades de las enzimas aldehído deshidrogenasas.....	1
I.1.1. Función general de las enzimas aldehído deshidrogenasas.....	1
I.1.2. Estructura general de las enzimas aldehído deshidrogenasas.....	2
I.1.2.2. Triada catalítica en las enzimas aldehído deshidrogenasas hidrolíticas.....	6
I.1.3 Mecanismo de reacción general de las aldehído deshidrogenasas hidrolíticas.....	9
I.1.4. Mecanismo cinético de las enzimas aldehído deshidrogenasas hidrolíticas.....	11
I.1.4.1. Inhibición por NADH en las enzimas aldehído deshidrogenasas hidrolíticas.....	12
I.1.4.2. Inhibición por sustrato en las enzimas aldehído deshidrogenasas hidrolíticas.....	14
I.2. Antecedentes sobre la betaína aldehído deshidrogenasa de espinaca, <i>SoBADH</i>	15
II. JUSTIFICACIÓN.....	17
III. HIPÓTESIS.....	17
IV. OBJETIVOS.....	18
IV.1 Objetivo general.....	18
IV.2 Objetivos particulares.....	18
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
V.1. Materiales.....	19
V.2 Determinación de la concentración de ligandos.....	19
V.3 Obtención de la <i>SoBADH</i> purificada a homogeneidad.....	19
V.4. Estudios cinéticos.	20
V.5. Inhibición por NADH en las reacciones NAD(P)^+ -dependientes.....	23
V.6. Determinación de constantes de disociación por fluorescencia.....	23
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
VI.1. Determinación de los parámetros cinéticos de la reacción NAD^+ -dependiente a concentraciones de NAD^+ y BAL subinhibitorias.....	25
VI.1.1. Patrones de velocidad inicial a concentraciones de NAD^+ y BAL subinhibitorias... 25	
VI.1.2. Inhibición por NADH a concentraciones de NAD^+ y BAL subinhibitorias.....	28
VI.1.3. Inhibición por GB a concentraciones de NAD^+ y BAL subinhibitorias.....	33

VI.1.4. Inhibición por AMP a concentraciones de NAD ⁺ y BAL subinhibitorias.....	37
VI.1.5. Inhibición por colina a concentraciones de NAD ⁺ y BAL subinhibitorias.....	41
VI.2. Inhibición por NAD ⁺ y BAL en la reacción NAD ⁺ -dependiente.....	44
VI.2.1. Inhibición por NAD ⁺	45
VI.2.2. Inhibición por NAD ⁺ en presencia de NADH.....	48
VI.2.3. Inhibición por NAD ⁺ en presencia de AMP.....	52
VI.2.4. Inhibición por BAL.....	54
VI.2.5. Inhibición por BAL en presencia de NADH.....	59
VI.2.6. Inhibición por BAL en presencia de AMP.....	65
VI.3. Reacción NADP ⁺ -dependiente.....	69
VI.3.1. Patrones de velocidad inicial de la reacción NADP ⁺ -dependiente.....	69
VI.3.2. Inhibición por NADH en la reacción NADP ⁺ -dependiente.....	72
VI.4. Saturación por NADH en las reacciones NAD(P) ⁺ -dependientes.....	75
VI.5. Unión al equilibrio de los nucleótidos a la <i>S</i> ₀ BADH.....	78
VI.5.1. Constantes de disociación por NAD(P)(H) medidas por fluorescencia.....	78
VI.6. Importancia del estudio de la inhibición por el sustrato aldehído para la correcta estimación de parámetros cinéticos y determinación de mecanismos cinéticos.....	82
VI.6.1. Resultados experimentales.....	82
VI.6.2. Simulaciones teóricas de los diferentes mecanismos cinéticos de inhibición por sustrato en reacciones monosustrato.....	87
VI.6.3. Simulaciones teóricas de los errores generados por ignorar la inhibición por sustrato en la cinética de los inhibidores.....	89
VI.6.4. Simulaciones teóricas de la inhibición por sustrato en mecanismos cinéticos Bi Bi ordenados en estado estacionario.....	91
VII. DISCUSIÓN GENERAL.....	95
VIII. CONCLUSIONES.....	99
IX. REFERENCIAS.....	100
X. ANEXO.....	108

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reacción catalizada por las enzimas ALDH hidrolíticas.	2
Esquema 2. Mecanismo de reacción general de las enzimas ALDH hidrolíticas.....	9
Esquema 3. Diagramas de Cleland mostrando los mecanismos Bi Bi ordenado en estado estacionario propuestos para enzimas ALDH.	33
Esquema 4. Mecanismos de inhibición por el sustrato B en mecanismos cinéticos Bi Bi ordenados en estado estacionario.	94
Esquema 5. Diagrama de Cleland con una ruta alterna propuesta para explicar la inhibición parcial por el sustrato BAL.....	96
Esquema 6. Diagrama de Cleland con una ruta alterna propuesta para explicar la inhibición parcial por el sustrato NAD ⁺	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Unión del NAD ⁺ en la <i>S</i> oBADH (PDB 4A0M).....	4
Figura 2. Modelo representativo del sitio activo de las enzimas ALDH.....	5
Figura 3. Flexibilidad conformacional del nucleótido unido en las enzimas ALDH.....	8
Figura 4. Patrones de velocidad inicial obtenidos con concentraciones de NAD ⁺ y BAL subinhibitorias.....	26
Figura 5. Patrones de inhibición por NADH frente a NAD ⁺ manteniendo fija la concentración de BAL.....	30
Figura 6. Patrón de inhibición por NADH frente a BAL manteniendo fija la concentración de NAD ⁺	31
Figura 7. Patrón de inhibición por GB frente a NAD ⁺ manteniendo fija la concentración de BAL.....	35
Figura 8. Patrón de inhibición por GB frente a BAL manteniendo fija la concentración de NAD ⁺	36
Figura 9. Patrón de inhibición por AMP frente a NAD ⁺ manteniendo fija la concentración de BAL.....	39
Figura 10. Patrón de inhibición por AMP frente a BAL manteniendo fija la concentración de NAD ⁺	40
Figura 11. Patrón de inhibición por colina frente a NAD ⁺ manteniendo fija la concentración de BAL.....	42
Figura 12. Patrón de inhibición por colina frente a BAL manteniendo fija la concentración de NAD ⁺	43
Figura 13. Efecto de la concentración de BAL subinhibitorio sobre la inhibición por el sustrato NAD ⁺	46
Figura 14. Regráficos de los parámetros aparentes de la concentración de BAL subinhibitorio sobre la inhibición por el sustrato NAD ⁺	47
Figura 15. Efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato NAD ⁺ a una concentración subinhibitoria de BAL.....	49
Figura 16. Efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato NAD ⁺ a una concentración inhibitoria de BAL.....	51
Figura 17. Efecto de la concentración de AMP sobre la inhibición por el sustrato NAD ⁺ a una concentración subinhibitoria de BAL.....	53

Figura 18. Efecto de la concentración de NAD ⁺ subinhibitorio sobre la inhibición por el sustrato BAL.....	56
Figura 19. Regráficos de los parámetros aparentes de la saturación por BAL con NAD ⁺ fijo-variable y subinhibitorio.....	57
Figura 20. Patrón de inhibición de BAL a nivel inhibitorio frente a NAD ⁺ a concentraciones subinhibitorias.....	58
Figura 21. Efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato BAL a una concentración subinhibitoria de NAD ⁺	60
Figura 22. Regráficos de los parámetros aparentes de la saturación por BAL con NAD ⁺ subinhibitorio en presencia de NADH.....	61
Figura 23. Patrón de inhibición del NADH frente a BAL a NAD ⁺ subinhibitorio.....	63
Figura 24. Efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato BAL a una concentración inhibitoria de NAD ⁺	64
Figura 25. Efecto de la concentración de AMP sobre la inhibición por el sustrato BAL a una concentración subinhibitoria de NAD ⁺	66
Figura 26. Regráficos de los parámetros aparentes de la saturación por BAL con NAD ⁺ subinhibitorio en presencia de AMP.....	67
Figura 27. Patrón de inhibición por AMP frente a BAL con NAD ⁺ subinhibitorio.....	69
Figura 28. Patrones de velocidad inicial de la reacción NADP ⁺ -dependiente con BAL.....	71
Figura 29. Patrón de inhibición del NADH frente a NADP ⁺ con BAL fijo 100 μM.....	73
Figura 30. Saturación de la <i>S</i> oBADH por NADH en las reacciones NAD ⁺ - y NADP ⁺ - dependientes.....	77
Figura 31. Interacción entre los residuos de Trp de la <i>S</i> oBADH y el nucleótido unido.....	79
Figura 32. Fluorescencia intrínseca de la <i>S</i> oBADH en presencia de NAD(P)(H).....	81
Figura 33. Inhibición por el sustrato aldehído en la <i>S</i> oBADH a 0.2 mM de NAD ⁺	85
Figura 34. Efecto del NADH sobre el grado de inhibición por BAL en la <i>S</i> oBADH.....	86
Figura 35. Simulaciones de la inhibición incompetitiva por sustrato en reacciones monosustrato.....	88
Figura 36. Efectos de la inhibición parcial incompetitiva sobre la cinética en presencia de un inhibidor.....	90

Figura 37. Simulaciones de la inhibición por el Sustrato B en reacciones Bi Bi ordenadas en estado estacionario.....	92
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Parámetros cinéticos estimados a concentraciones de NAD^+ y BAL subinhibitorias.....	27
Tabla II. Parámetros cinéticos estimados de la inhibición por NADH frente a los dos sustratos a concentraciones subinhibitorias.....	32
Tabla III. Parámetros cinéticos estimados de la inhibición por GB frente a los dos sustratos a concentraciones subinhibitorias.....	37
Tabla IV. Parámetros cinéticos estimados de la inhibición por AMP frente a los dos sustratos a concentraciones subinhibitorias.....	41
Tabla V. Parámetros cinéticos estimados de la inhibición por colina frente a los dos sustratos a concentraciones subinhibitorias.....	44
Tabla VI. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de BAL subinhibitorio sobre la inhibición por el sustrato NAD^+	48
Tabla VII. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato NAD^+ a una concentración subinhibitoria de BAL.....	50
Tabla VIII. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato NAD^+ a una concentración inhibitoria de BAL.....	52
Tabla IX. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de AMP sobre la inhibición por el sustrato NAD^+ a una concentración subinhibitoria de BAL.....	54
Tabla X. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de NAD^+ subinhibitorio sobre la inhibición por el sustrato BAL.....	58
Tabla XI. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato BAL a una concentración subinhibitoria de NAD^+	62
Tabla XII. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato BAL a una concentración inhibitoria de NAD^+	65
Tabla XIII. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de AMP sobre la inhibición por el sustrato BAL a una concentración subinhibitoria de NAD^+	68
Tabla XIV. Parámetros cinéticos de los patrones de velocidad inicial con NADP^+ y BAL.....	71
Tabla XV. Parámetros cinéticos de la inhibición por NADH frente a NADP^+ con BAL....	74

ABREVIATURAS

ALDH aldehído deshidrogenasa

APAL 3-aminopropionaldehído

BADH betaína aldehído deshidrogenasa

BAL betaína aldehído

GB glicina betaína

I₅₀ concentración de inhibidor a la que la velocidad de la reacción se reduce a la mitad de la que existe en ausencia del inhibidor

K_d constante de disociación del ligando del complejo que forma con la proteína

K_{ia} constante de disociación del primer sustrato en unirse a la enzima

K_{ic} constante de inhibición de un inhibidor competitivo

K_{is} constante de inhibición de un sustrato

K_{iu} constante de inhibición de un inhibidor incompetitivo

K_m constante de Michaelis-Menten

n_H número de Hill.

S_{0.5} concentración de sustrato con la cual se obtiene la mitad de la V_{\max} en una cinética de saturación sigmoideal

SoBADH betaína aldehído deshidrogenasa de espinaca

V_{max} velocidad máxima

β factor que indica la proporción por la que baja la V_{\max} real cuando la enzima es inhibida por sustrato

RESUMEN

A pesar de que el estudio de las propiedades cinéticas de las enzimas aldehído deshidrogenasas (ALDH) comenzó hace más de medio siglo, aún se desconocen varias propiedades funcionales de estas enzimas y lo que las origina. En este proyecto se estudió experimentalmente a la betaína aldehído deshidrogenasa de *Spinacia oleracea* (SoBADH) y además se realizaron simulaciones sobre el comportamiento cinético de las enzimas ALDH en general. Los patrones de velocidad inicial con los sustratos NAD^+ y betaína aldehído (BAL) mostraron que la SoBADH tiene un mecanismo secuencial y los resultados de inhibición por producto que se tiene un mecanismo de liberación al azar de los productos, siendo la ruta preferida aquella en el que el NADH es el último en salir del sitio activo. Para poder determinar el orden en la adición de los sustratos, se realizaron los patrones de inhibición por análogos de los sustratos, AMP y colina. Los resultados indicaron que el NAD^+ es el primer sustrato en unirse a la enzima y BAL es el segundo. La SoBADH es inhibida por ambos sustratos, NAD^+ y BAL de manera parcial. El grado de inhibición por BAL se favoreció a medida que aumentó la concentración de NADH. Este resultado es consistente con un mecanismo Bi Bi ordenado en estado estacionario en donde ocurre la formación de un complejo E-NADH-BAL del cual se libera NADH de manera más lenta con respecto a cómo se libera del complejo E-NADH. Comprender el comportamiento de la enzima con el sustrato NAD^+ fue más difícil debido a que se observó una atípica inhibición mixta en el patrón de inhibición NADH frente a NAD^+ y a la inhibición parcial por NAD^+ . La observación de que el NADH inhibe la reacción y que al mismo tiempo contrarresta la inhibición por NAD^+ , nos sugirió que ambas moléculas compiten por las mismas formas de la enzima, la enzima libre y el complejo E-tioéster. El componente competitivo de la inhibición mixta del NADH frente a NAD^+ deriva de la unión de ambos nucleótidos a la

enzima libre, mientras que el componente incompetitivo deriva de la unión al complejo E-tioéster. La unión del NAD^+ al complejo E-tioéster explica la inhibición por sustrato incompetitiva por el NAD^+ , y el hecho de que esta sea parcial se explicaría si el NAD^+ unido al complejo E-tioéster entorpeciera pero no impidiera a la molécula de agua catalítica realizar el paso de hidrólisis. Así mismo, nos interesó estudiar si el NADH , frente al NADP^+ , también exhibía la atípica inhibición mixta que habíamos observado frente al NAD^+ . Sin embargo e inesperadamente, el NADH fue un inhibidor competitivo frente al NADP^+ . Esto podría deberse a la mucha menor afinidad de la enzima por el NADP^+ respecto al NAD^+ , como se determinó por fluorescencia ($K_d^{\text{NAD}^+} = 2.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ y $K_d^{\text{NADP}^+} = 709 \pm 62 \mu\text{M}$). No se pudo determinar la inhibición por el NADPH , lo que sugiere que, en las condiciones de nuestros ensayos, las concentraciones del complejo E-tioéster- NADP(H) son muy bajas. Además, a partir de simulaciones usando las ecuaciones apropiadas para diferentes mecanismos, mostramos que cuando la inhibición por sustrato se ignora, se subestima el valor de V_{max} y K_m mientras el valor de V_{max}/K_m se sobrestima. Concluimos que omitir el estudio de la inhibición por sustrato también provoca errores en la estimación de las constantes de inhibición y en la determinación del mecanismo cinético.

I. INTRODUCCIÓN

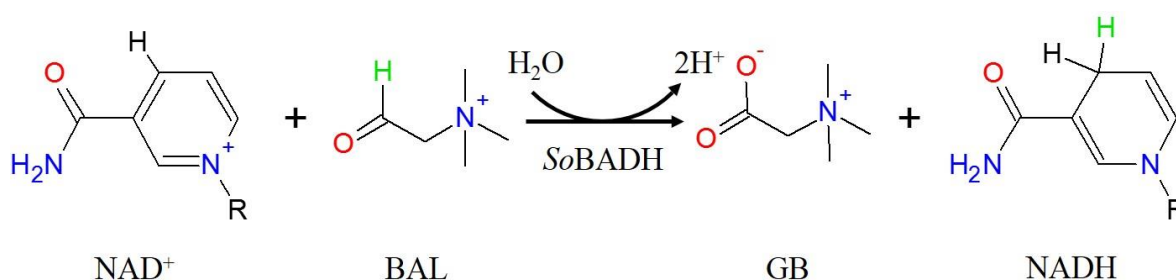
I.1. Generalidades de las enzimas aldehído deshidrogenasas

I.1.1. Función general de las enzimas aldehído deshidrogenasas

Las enzimas de la superfamilia de aldehído deshidrogenasas (ALDH; EC 1.2.1.) catalizan la reacción de oxidación de aldehídos alifáticos y aromáticos, endógenos o exógenos, con la concomitante reducción del NAD(P)⁺, y juegan un papel importante en procesos fisiológicos y de desintoxicación. Estas enzimas poseen una gran distribución dentro de los tres dominios de la vida (Sophos y Vasiliou, 2003; Julián-Sánchez *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2011) y dentro de la célula (Hanson *et al.*, 1985; Liu y Schnable, 2002; Ashibe *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2009; Stagos *et al.*, 2010; Díaz-Sánchez *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013; Krupenko *et al.*, 2015).

Durante la reacción, las enzimas ALDH forman un enlace tioéster entre el tiol de la cisteína catalítica y el carbono carbonílico del sustrato aldehído. Con base en el nucleófilo que utilizan para romper dicho enlace se pueden clasificar en 1) hidrolíticas, 2) CoA-acilantes y 3) fosforilantes. Las enzimas hidrolíticas utilizan como nucleófilo una molécula de agua para dar lugar a la formación de un ácido carboxílico, las CoA- acilantes utilizan el grupo tiol de la coenzima A (CoA) para formar acil-CoA y las fosforilantes utilizan una molécula de fosfato inorgánico para producir un acil-fosfato.

En el **Esquema 1** se representa la reacción catalizada por la enzima que se estudió en este trabajo, la betaína aldehído deshidrogenasa de espinaca (*SoBADH*) que sirve para ilustrar la reacción catalizada por las enzimas ALDH hidrolíticas. La *SoBADH*, en condiciones fisiológicas, utiliza como sustratos al NAD^+ y a la betaína aldehído (BAL) para producir glicina betaína (GB) y NADH. Sin embargo, también es capaz de utilizar otros ω -aminoaldehídos como sustratos ([Díaz-Sánchez *et al.*, 2012](#)).



Esquema 1. Reacción catalizada por las enzimas ALDH hidrolíticas. Se muestra como ejemplo la reacción que realiza la *SoBADH*.

1.1.2. Estructura general de las enzimas aldehído deshidrogenasas

Las enzimas ALDH reportadas a la fecha son enzimas diméricas, tetraméricas o con poca frecuencia hexaméricas, de alrededor de 500 aminoácidos por subunidad. Las estructuras cristalográficas muestran que las diferentes enzimas ALDH tienen un plegamiento muy similar y que poseen un dominio de oligomerización, otro de unión al nucleótido y uno catalítico en cada subunidad ([Liu *et al.*, 1997](#); [Steinmetz *et al.*, 1997](#)). El *dominio de oligomerización* es una extensión del dominio de unión a la coenzima que permite la

formación y estabilización de la unidad dimérica (Liu *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 1998). El *dominio de unión al nucleótido* consiste en cinco hebras α/β abiertas, una variante del plegamiento Rossmann típico (Rossmann *et al.*, 1974) debido a que carece del último motivo $\alpha\beta$ (Lui *et al.*, 1997).

Se ha propuesto que la preferencia por el nucleótido en muchas de estas enzimas se debe al residuo que se encuentra en la posición 195 (numeración de la ALDH2 de humano; González-Segura *et al.*, 2015). Un Glu en dicha posición adopta generalmente una conformación que reduce el tamaño de la cavidad donde entraría el grupo 2'-P de la ribosa de la adenosina del NADP⁺ y además posee una carga negativa; como resultado, estas enzimas tienen en general una preferencia por NAD⁺ sobre NADP⁺. La flexibilidad conformacional del Glu195 está permitida o restringida por los residuos cercanos, particularmente el de la posición 224 y los de las posiciones 37 y/o 53 (numeración de la ALDH2 de humano; **Figura 1**). Cuando en estas posiciones existe un residuo más pequeño y sin carga, el Glu195 puede moverse a una posición en la que permite que se acomode el grupo 2'-P del NADP⁺ y no haya repulsión electrostática, lo que resulta en que el NADP⁺ se una igual o mejor que el NAD⁺ (González-Segura *et al.*, 2009; González-Segura *et al.*, 2015).

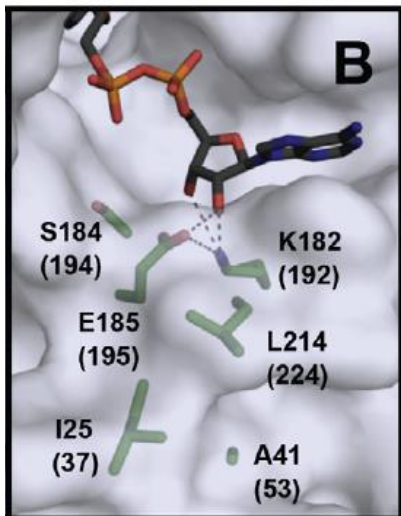
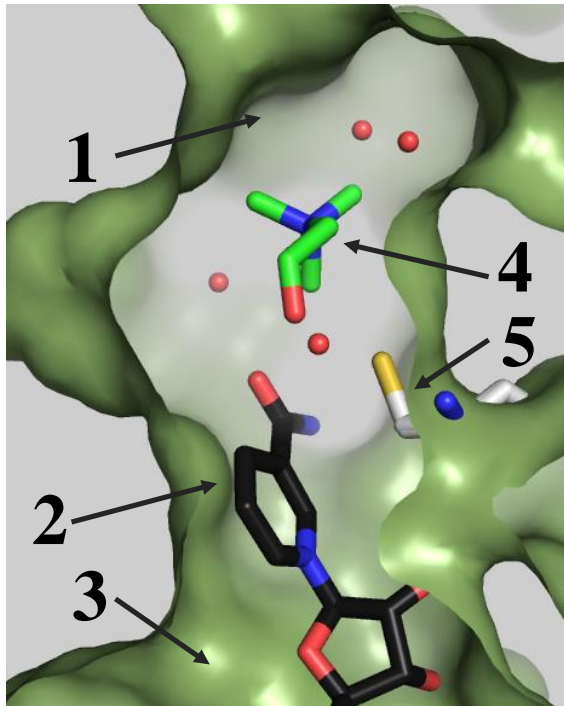


Figura 1. Unión del NAD⁺ en la SoBADH (PDB 4A0M). Los aminoácidos se señalan con su abreviatura y el número de residuo al que corresponden en la SoBADH. El número entre paréntesis se refiere a la numeración de la ALDH2 humana. Figura modificada de [González-Segura et al. \(2015\)](#).

En el *dominio catalítico* se encuentran dos túneles que están conectados, el de entrada del aldehído y el de entrada del nucleótido (**Figura 2**). En todas las enzimas ALDH se encuentran de manera conservada los residuos catalíticos Cys302 y Asn169 (numeración de la ALDH2 de humano; [Hempel et al., 1993](#)). Las enzimas ALDH hidrolíticas poseen además un residuo catalítico conservado, Glu268 (numeración de la ALDH2 de humano) que no está presente en las enzimas CoA-acilantes ([Stines-Chaumeil et al., 2006](#)).

A



B

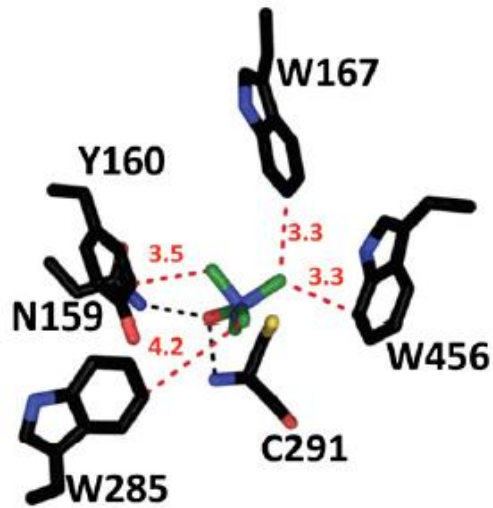
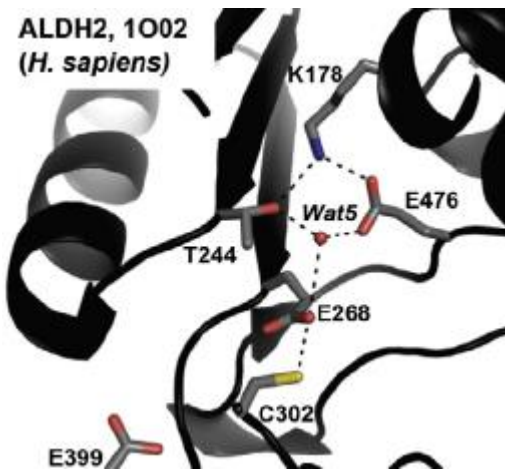


Figura 2. Modelo representativo del sitio activo de las enzimas ALDH. A,

sitio activo de la betaína aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa*: 1) túnel de entrada del aldehído; 2) nucleótido; 3) túnel de entrada de nucleótido; 4) betaína aldehído; 5) Cys catalítica. Figura modificada de [Díaz-Sánchez et al. \(2011\)](#). B, modelo del sitio activo de la SoBADH donde se muestra la

C



posición más favorable del grupo trimetilamonio del BAL. La Cys291 y la Asn159 (numeración de la SoBADH) corresponden a los residuos catalíticos. Figura tomada de [Díaz-Sánchez et al. \(2012\)](#). C, región del sitio activo de la ALDH2 de humano en donde se muestran las interacciones del residuo catalítico Glu268 (numeración de la ALDH2). Figura tomada de [Muñoz-Clares et al. \(2015\)](#).

1.1.2.2. Triada catalítica en las enzimas aldehído deshidrogenasas hidrolíticas

Cys catalítica: realiza el ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico del sustrato aldehído. Puede adoptar dos conformaciones: 1) “en descanso” cuando su cadena lateral está en una posición en la que no puede realizar el ataque nucleofílico sobre el sustrato aldehído y 2) “en ataque” cuando la cadena lateral se encuentra en la posición correcta para realizar el ataque nucleofílico (**Figura 2**; [González-Segura et al., 2009](#)).

Asn catalítica: el grupo amida de su cadena lateral forma la cavidad del oxianión junto con el nitrógeno amídico de la Cys catalítica. En esta cavidad se estabiliza mediante puentes de hidrógeno el intermediario tiohemiacetal tetraédrico generado en la reacción (**Figura 2**; [Steinmetz et al., 1997](#)).

Glu catalítico: es una base muy importante en las enzimas ALDH hidrolíticas. Puede adoptar tres conformaciones ([González-Segura, et al., 2009](#)): 1) “adentro” debido a que está en posición para abstraer el protón de la Cys catalítica para dar lugar al nucleófilo tiolato, aunque se debate que esto ocurra ([Muñoz-Clares et al., 2017](#)); 2) “intermedia”, es la posición en la que puede abstraer el protón de la molécula del agua hidrolítica y 3) “afuera” que podría participar en la descarga del protón que la cadena lateral del Glu toma del agua hidrolítica.

Algunas enzimas ALDH pueden ser clasificadas como ω -aminoaldehído deshidrogenasas (AMADH) debido a que son capaces de utilizar como sustrato aldehídos con grupos ω -

amino. Una de estas enzimas es la SoBADH que, como otras de estas enzimas, posee en su sitio activo una “caja de aromáticos” formada por residuos aromáticos cuyas nubes electrónicas dan estabilidad al grupo amino del aminoaldehído cargado positivamente mediante interacciones *cación- π* (**Figura 2**; [Díaz-Sánchez et al., 2012](#)). Todas las enzimas AMADH poseen un túnel de entrada del aldehído con potencial electrostático negativo que favorece la unión de sustratos con grupo amino. Por otra parte, las enzimas ALDH que usan sustratos no polares o cargados negativamente presentan potenciales electrostáticos neutros o positivos ([Riveros-Rosas et al., 2013](#)).

Resultados de cristalografía y de resonancia magnética nuclear indican que el nucleótido unido al sitio activo de las enzimas ALDH posee flexibilidad conformacional que es crucial para la catálisis ([Hammen et al., 2002](#); [Perez-Miller y Hurley, 2003](#)). El NAD(P)⁺ unido dentro del sitio activo de las enzimas ALDH adopta una conformación extendida que permite la oxidación del sustrato, a esta conformación se le denomina “HT” o de transferencia del hidruro. Por otra parte, el NAD(P)H se ha encontrado en varias conformaciones que están más o menos plegadas o cuyo anillo de nicotinamida está ligeramente desplazado de la posición que ocupa el anillo del nucleótido oxidado. A este conjunto de conformaciones se les llama genéricamente conformación “Hyd” o de hidrólisis, ya que permiten que se coloque en posición adecuada la molécula de agua hidrolítica y que, por tanto, ocurra el paso de hidrólisis en la reacción ([Perez-Miller y Hurley, 2003](#); [Muñoz-Clares et al., 2011](#); **Figura 3**). La mayoría de las enzimas ALDH son NAD⁺-específicas, pero también se han reportado algunas NADP⁺-específicas ([Ahvazi et al., 2000](#); [Cobessi et al., 2000](#); [Perozich et al., 2000](#)) y otras enzimas son capaces de usar ambos nucleótidos de manera eficiente ([Velasco-García et al., 2000](#); [Mori et al., 2002](#); [Inagaki et al., 2006](#)).

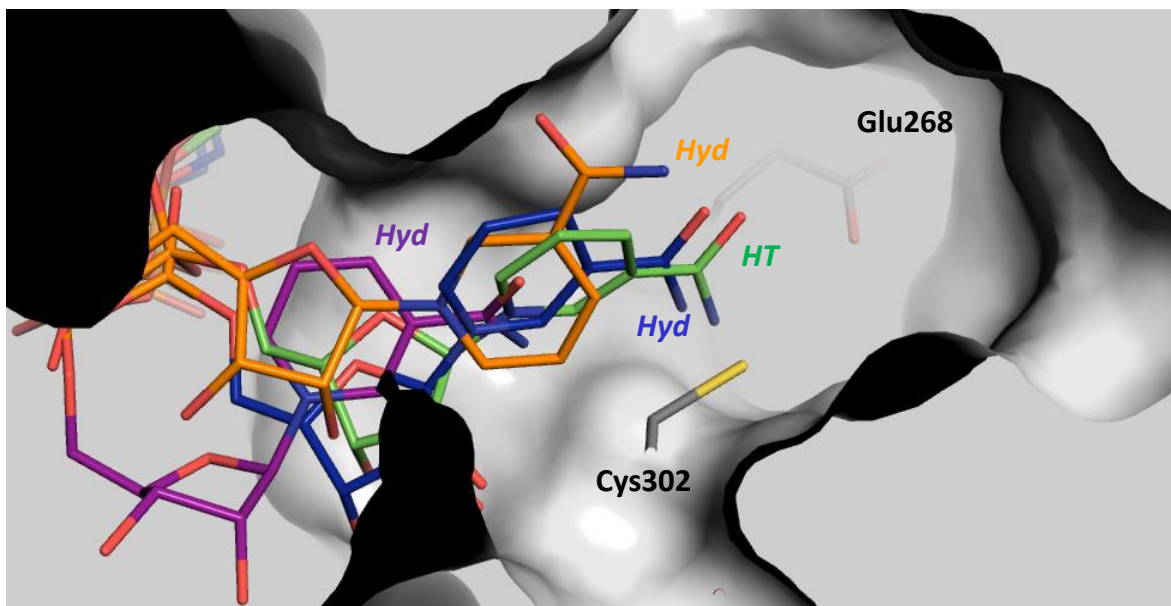
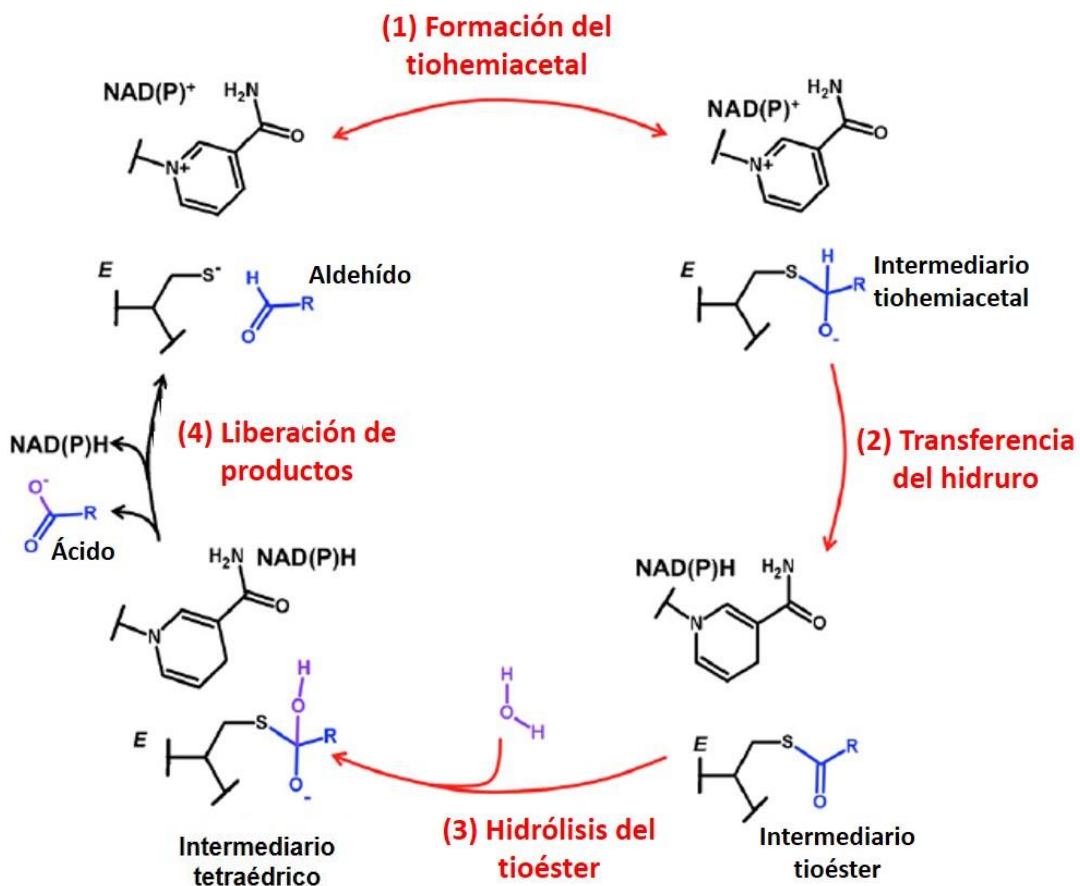


Figura 3. Flexibilidad conformacional del nucleótido unido en las enzimas ALDH.

Modelo de las conformaciones de los nucleótidos que se han encontrado en diferentes estructuras en el sitio activo de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de *P. aeruginosa* (PDB 3ZQA). *HT*, conformación de transferencias del hidruro del NAD(P)⁺; *Hyd*, conformación de hidrólisis del NAD(P)H. En morado, NADH observado en la estructura de la ALDH2 de humano (PDB 1O00); en verde, NAD⁺ en otra estructura de la ALDH2 de humano (PDB 1O00); en azul, NADPH en la estructura de la betaína aldehído deshidrogenasa de *P. aeruginosa* (PDB 3ZQA); en naranja, NADPH en la estructura de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante de *Streptococcus mutans* (PDB 1Q11). Figura tomada de [Díaz-Sánchez et al. \(2011\)](#).

1.1.3 Mecanismo de reacción general de las aldehído deshidrogenasas hidrolíticas

Las enzimas ALDH hidrolíticas catalizan la reacción deshidrogenasa para la oxidación de aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, con la concomitante reducción del NAD(P)⁺. El mecanismo de reacción de las enzimas ALDH hidrolíticas es una catálisis covalente que, una vez que el nucleótido oxidado y el aldehído están unidos al sitio activo, puede ser descrito en dos etapas (Feldman y Weiner, 1972), la acilación (pasos 1 y 2) y la desacilación (pasos 3 y 4). En el **Esquema 2** se describen los pasos mínimos del mecanismo de reacción de las enzimas ALDH hidrolíticas.



Esquema 2. Mecanismo de reacción general de las enzimas ALDH hidrolíticas. Figura adaptada de Muñoz-Clares *et al.* (2011).

- 1) Ataque nucleofílico del tiol de la Cys catalítica sobre el carbono carbonílico del sustrato aldehído, lo que resulta en la formación de un tiohemiacetal, un intermediario covalente tetraédrico.
- 2) Transferencia del hidruro al C4 del anillo de nicotinamida del NAD(P)⁺ por la oxidación del tiohemiacetal, lo que resulta en la formación de un tioéster, un intermediario covalente trigonal.
- 3) Ataque nucleofílico por un ion hidroxilo sobre el intermediario tioéster, formando un segundo intermediario tetraédrico.
- 4) Rearreglo electrónico que lleva a la ruptura del enlace S-C y a la consiguiente liberación del producto ácido, seguida de la liberación del NAD(P)H.

Muchas enzimas ALDH hidrolíticas también pueden catalizar la reacción de hidrólisis de ésteres en sus correspondientes alcoholes y ácidos, aunque esta última no es una reacción que tenga lugar *in vivo* (Weiner *et al.*, 1976; Muñoz-Clares *et al.*, 2010). El mecanismo para la reacción esterasa y deshidrogenasa es esencialmente el mismo, excepto que la reacción esterasa no requiere de nucleótido ya que la transferencia del hidruro no sucede.

Se ha propuesto el paso limitante de la velocidad sólo para las enzimas ALDH1, ALDH2 y ALDH3 el cual difiere entre ellas. Podría ser la disociación de la coenzima para la ALDH1 de hígado de oveja (Blackwell *et al.*, 1987), la desacilación, es decir, la hidrólisis del enlace tioéster, para las enzimas ALDH2 de hígado de caballo y humano (Feldman y Weiner, 1972; Weiner *et al.*, 1976; Wang y Weiner, 1995) y la transferencia del hidruro para la ALDH3 de

estómago de humano (Mann y Weiner, 1999). Si el paso limitante de la reacción ocurre después de la formación del intermediario acil-enzima, es decir, después de la transferencia del hidruro, se observará un estallido (“burst”) en la formación de NAD(P)H en el primer ciclo catalítico, como se ha reportado para la ALDH1 y la ALDH2 (Weiner *et al.*, 1976; Blackwell *et al.*, 1987). En contraste, no se observará un estallido si no existe un paso limitante, o si este se encuentra antes o en el paso de transferencia del hidruro.

1.1.4. Mecanismo cinético de las enzimas aldehído deshidrogenasas hidrolíticas

El mecanismo cinético para la actividad deshidrogenasa de la mayoría de las enzimas ALDH hidrolíticas es Bi Bi ordenado en estado estacionario, en el que el nucleótido oxidado es el primer sustrato en unirse a la enzima y el nucleótido reducido es el último producto en ser liberado del sitio activo (Duncan y Tipton, 1971; Feldman y Weiner, 1972; Sidhu y Blair, 1975; MacGibbon *et al.*, 1977; Vallari y Pietruszko, 1981; Forte-McRobbie y Pietruszko, 1989; Henehan y Tipton, 1992; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993; Kang y Cho, 1994; Lee *et al.*, 1995; Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000; Marchal *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015; Cardona-Cardona, 2017).

Además de los mecanismos Bi Bi ordenados, se han descrito mecanismos al azar que presentan cierta preferencia por unir primero al nucleótido (Sidhu y Blair, 1975; Velasco-García *et al.* 2000). También se han descrito mecanismos Ping Pong (Mori *et al.*, 1980; Falkenberg y Strøm, 1990; Boch *et al.*, 1997) que pueden ser cuestionables debido a que se propusieron únicamente por obtener líneas paralelas en los gráficos de dobles recíprocos de

los patrones de velocidad inicial. Se pueden obtener líneas aparentemente paralelas en mecanismos secuenciales cuando $K_{ia} \ll K_m$ (Cleland, 1977; Falkenberg y Strøm, 1990), lo que ocurre en algunas enzimas ALDH (Cardona-Cardona, 2017; Rueda-Sanabria, 2017), e incluso pueden obtenerse si no se considera la inhibición por sustrato, que también es muy frecuente en estas enzimas. Además, un mecanismo ping-pong no es consistente con el mecanismo químico propuesto para las enzimas ALDH hidrolíticas puesto que implica la transferencia de un hidruro y no existe un aminoácido que pueda tomarlo, sino que debe pasar directo del tiohemiacetal hacia el NAD(P)⁺. Así, la transferencia del hidruro requiere que ambos sustratos estén unidos a la enzima al mismo tiempo, por lo que el mecanismo debe ser secuencial.

1.1.4.1. Inhibición por NADH en las enzimas aldehído deshidrogenasas hidrolíticas

En forma consistente con el mecanismo ordenado propuesto, la mayoría de las enzimas ALDH hidrolíticas presentan inhibición competitiva por el NADH frente al NAD⁺, salvo las enzimas ALDH1 de bovino (MacGibbon *et al.*, 1977), ALDH10 de *Amaranthus hypochondriacus* (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993), ALDH10 de *Glycine max* (Kang y Cho, 1994), ALDH9 de riñón de cerdo (Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000), ALDH9 de *Pseudomonas aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 2000) y la ALDH3 de humano (Perozich *et al.*, 2000), las cuales muestran inhibición mixta.

La inhibición mixta por NADH frente al NAD⁺ en un mecanismo Bi Bi ordenado en estado estacionario en la betaína aldehído deshidrogenasa de *A. hypochondriacus* se consideró como

la primera evidencia experimental de un mecanismo Iso (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993) cuya existencia había sido propuesta por Cleland (1963). En un mecanismo cinético Iso existen dos formas isoméricas de la enzima libre que están en equilibrio, una de las cuales une al sustrato y la otra al último producto de la reacción, de manera que una vez que se libera este producto, la enzima debe isomerizarse a la forma que une al sustrato para que comience un nuevo ciclo catalítico. Este mecanismo podría explicar la inhibición mixta por NADH frente al NAD^+ y así se explicó para algunas de ellas (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993; Kang y Cho, 1994; Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000). Sin embargo, tras conocerse las estructuras tridimensionales de las enzimas ALDH, parece que la isomerización de la enzima libre que define a los mecanismos Iso es improbable en estas enzimas.

Debido a que en algunas enzimas ALDH que muestran inhibición mixta por NADH frente al NAD^+ se ha observado la formación de un aducto covalente NAD(P)H-cisteína catalítica (Díaz-Sánchez *et al.*, 2011), surgió la propuesta de que el componente incompetitivo de la inhibición mixta podría deberse a la inactivación de la enzima por la formación de este aducto, ya que retiraría enzima activa del ciclo catalítico normal (Muñoz-Clares *et al.*, 2010). Este último mecanismo también podría explicar la progresiva y reversible inactivación de la enzima por el nucleótido reducido bajo condiciones catalíticas y no catalíticas (Muñoz-Clares *et al.*, 2010; Díaz-Sánchez *et al.*, 2011). Como consecuencia, el componente incompetitivo de la inhibición mixta por NADH frente al NAD^+ pudiera ser relevante en la regulación de las enzimas ALDH que lo presenten.

1.1.4.2. Inhibición por sustrato en las enzimas aldehído deshidrogenasas hidrolíticas

La saturación de una reacción enzimática se representa graficando la velocidad de formación del producto en función de la concentración del sustrato. En muchos casos se obtiene una curva hiperbólica típica, llamada comúnmente de Michaelis-Menten, que corresponde con una gráfica de Lineweaver-Burk o de dobles recíprocos lineal. Pero en un número sorprendentemente elevado de enzimas, las curvas de velocidad frente a la concentración de sustrato aumentan hasta un máximo y luego disminuyen a medida que aumenta la concentración del sustrato. Específicamente en las enzimas ALDH, la inhibición por el sustrato aldehído tiene una alta incidencia y hay numerosos reportes que lo indican (Duncan y Tipton, 1971; Sidhu y Blair, 1975; Rivett y Tipton, 1981; Hart y Dickinson, 1982; Blackwell *et al.*, 1983; Forte-McRobbie y Pietruszko 1986; Dickinson, 1986; Gillyon *et al.*, 1987; Falkenberg y Strøm; 1990; Henehan y Tipton; 1992; Vojtěchová *et al.*, 1997a; Vojtěchová *et al.*, 1997b; Boch *et al.*, 1997; Marchal *et al.*, 2000; Livingstone *et al.*, 2003; Samsonova *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2009; Kopečný *et al.*, 2011; de Carvalho *et al.*, 2011; Díaz-Sánchez *et al.*, 2012; Kopečný *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014; Jang *et al.*, 2015; Tuck *et al.*, 2016) pero no ha sido caracterizada con detalle en la mayoría de los estudios. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la inhibición por el sustrato aldehído: 1) formación de un complejo ternario no productivo E-NAD(P)H-aldehído del cual se puede liberar NAD(P)H (Rivett y Tipton, 1981; Hart y Dickinson, 1982; Dickinson, 1986; Vojtěchová *et al.*, 1997b); 2) unión del aldehído a la enzima libre en competencia con el nucleótido (Henehan y Tipton; 1992; Jang *et al.*, 2015); 3) unión incorrecta del aldehído en su sitio de unión ya sea adoptando una conformación no productiva (Chen *et al.*, 2014) o uniéndose dos moléculas de aldehído (Kopečný *et al.*, 2011);

y 4) unión del sustrato a un sitio alostérico inhibidor (Forte-McRobbie y Pietruszko 1986). Por otra parte, la inhibición por el sustrato nucleótido también ocurre, pero ha sido menos documentada (Velasco-García *et al.*, 2000).

Muchos enzimólogos consideran que la inhibición por sustrato es, en general, un fenómeno sin relevancia fisiológica debido a que se presenta en concentraciones de sustrato más altas que las que se considera que existen *in vivo*. Sin embargo, existen casos documentados en los que este tipo de inhibición sí posee importancia para la regulación *in vivo* de enzimas (Reed *et al.*, 2010). Además, es muy importante considerar tal inhibición cuando se está caracterizando cinéticamente a una enzima porque cuando se usan concentraciones de sustrato que aparentemente son subinhibitorias, lo que es una práctica común para tratar de evitar esta complejidad del mecanismo cinético, los valores estimados de los parámetros V_{\max} , K_m y V_{\max}/K_m son erróneos e incluso lo son los patrones de inhibición y, por lo tanto, se pueden cometer errores significativos en la deducción del mecanismo cinético (Muñoz-Clares y Casanova-Figueroa, 2019; ver **X. Anexo**).

I.2. Antecedentes sobre la betaína aldehído deshidrogenasa de espinaca, SoBADH

La betaína aldehído deshidrogenasa de espinaca (*Spinacia oleracea*; SoBADH) tiene como función fisiológica la síntesis de glicina betaína (GB) a partir de la oxidación de la betaína aldehído (BAL), aunque también es capaz de utilizar *in vitro* a otros sustratos aldehído (Díaz-Sánchez *et al.*, 2012). GB es un osmolito compatible u osmoprotector que ayuda a contrarrestar el estrés osmótico causado por escasez de agua, salinidad y bajas temperaturas

en una gran variedad de organismos como bacterias, animales y plantas (Pan *et al.*, 1981; Landfald y Strøm, 1986; Petronini *et al.*, 1992; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). Es considerado como el más eficiente osmoprotector conocido (Courtenay *et al.*, 2000), actividad que es atribuida a sus características como zwitterión y a su alta solubilidad en agua (Chambers y Kunin, 1985). En plantas, la síntesis de GB ocurre en el estroma del cloroplasto (Hanson *et al.*, 1985) a partir de la oxidación en dos pasos de la colina: 1) el grupo alcohol de la colina es oxidado a aldehído (BAL) en la reacción catalizada por la enzima colina monooxigenasa (CMO; EC 1.14.15.7; Burnet *et al.*, 1995; Carrillo-Campos *et al.*, 2018), y luego el grupo aldehído del BAL es oxidado al grupo ácido del GB por la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH; EC 1.2.1.8; Hanson *et al.*, 1985; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Díaz-Sánchez *et al.*, 2012; Muñoz-Clares *et al.*, 2014; Muñoz-Clares *et al.*, 2015).

En cuanto a su estructura, la SoBADH es una ALDH dimérica cuyo plegamiento y topología son muy similares a los que se encuentran en todas las enzimas ALDH con estructura tridimensional conocida; mientras que el análisis filogenético la coloca dentro de la familia ALDH10 (Vasiliou *et al.*, 1999; Díaz-Sánchez *et al.*, 2012).

II. JUSTIFICACIÓN

Las enzimas ALDH juegan un papel esencial en procesos fisiológicos y también se les considera como objetos biotecnológicos de alta relevancia. Sin embargo, a pesar de que el estudio de sus propiedades cinéticas comenzó hace más de medio siglo, aún se desconocen varias propiedades funcionales de estas enzimas y lo que las origina. El objeto de estudio de este trabajo fue la enzima *S*oBADH, la cual presenta inhibición por ambos sustratos y la atípica inhibición mixta por NADH frente al NAD⁺. Con este estudio se buscó describir la cinética de la *S*oBADH a fondo, explicarla en términos cinéticos y relacionarla con su estructura tridimensional. Además, a partir de simulaciones, se validaron algunos resultados de interés que pueden utilizarse como una herramienta de comparación e inferencia del comportamiento cinético de otras enzimas ALDH.

III. HIPÓTESIS

En este trabajo se plantearon dos hipótesis:

- 1) La inhibición mixta por NADH frente al NAD⁺ en la *S*oBADH se debe a la formación de complejos no productivos involucrados en la inhibición por sustrato.
- 2) Ignorar la inhibición por sustrato conlleva a la estimación errónea de los parámetros cinéticos (V_{\max} , K_m y V_{\max}/K_m) y a la incorrecta determinación del mecanismo cinético en las enzimas ALDH en general.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Explicar el comportamiento cinético de la SoBADH determinando sus propiedades cinéticas a profundidad.

IV.2 Objetivos particulares

- Caracterizar la inhibición por NADH frente al NAD⁺.
- Caracterizar la inhibición por los sustratos NAD⁺ y BAL.
- Proponer un mecanismo cinético que sea consistente con los resultados cinéticos y las estructuras cristalográficas reportadas.
- Realizar simulaciones de los posibles mecanismos de inhibición por sustrato para validar algunos resultados de interés que pueden utilizarse como una herramienta de comparación e inferencia del comportamiento de otras enzimas ALDH.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Materiales

HEPES, KOH, etilenglicol, 2-mercaptoetanol, EDTA, cloruro de betaína aldehído (BAL), 3-aminopropionaldehído (APAL) dietilacetal, NAD⁺, NADP⁺, NADH, NADPH, GB, AMP y colina se obtuvieron de Sigma-Aldrich México.

V.2 Determinación de la concentración de ligandos

La concentración de NAD(P)(H), AMP, BAL y APAL se determinaron por espectrofotometría. NAD(P⁺) fue medido a 260 nm ($\epsilon_{260 \text{ nm}} = 18,000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), NAD(P)H a 340 nm ($\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,200 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) y AMP a 260 nm ($\epsilon_{260 \text{ nm}} = 15,000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). La concentración de BAL y APAL se determinó mediante la medición del NADH producido después de la oxidación completa del aldehído por medio de un ensayo con una concentración de NAD⁺ en exceso. El APAL se obtuvo a partir de la hidrólisis del correspondiente dietilacetal usando el método descrito por Flores y Filner (1985).

V.3 Obtención de la SoBADH purificada a homogeneidad

La SoBADH recombinante se sobre-expresó en células de *Escherichia coli* BL21(DE3) (Agilent) que habían sido transformadas con el plásmido pET-28-SoBADH el cual contiene la secuencia completa del gen de la *badh* de espinaca con una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal (Díaz-Sánchez *et al.*, 2012). La enzima se purificó a homogeneidad como se reportó previamente (Díaz-Sánchez *et al.*, 2012). La concentración de SoBADH se

determinó por espectrofotometría a 280 nm usando un valor de $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 86,400 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, determinado a partir del análisis de la secuencia de aminoácidos con ExPASy ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2003).

V.4. Estudios cinéticos

Los estudios de velocidad inicial se hicieron a 30 °C y a pH 8.0 en un amortiguador compuesto por HEPES-KOH 100 mM y EDTA 1 mM. Las concentraciones de ligando que se utilizaron se especifican en los resultados. Todos los ensayos se iniciaron con la adición de la enzima. La actividad se determinó siguiendo el cambio en la absorbancia a 340 nm, que es la longitud de onda del pico máximo de absorción del NAD(P)H. El tiempo que se consideró como velocidad inicial fueron los primeros 12 segundos de la reacción. Curiosamente, cuando se añadió un inhibidor en el medio de reacción, se presentó una fase de retraso (5 a 12 segundos) que fue haciéndose más grande a medida que la concentración de inhibidor aumentó.

Los datos mostrados en las gráficas son el promedio y la desviación estándar de al menos 4 mediciones que pertenecen a dos experimentos independientes que se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU-65. Mediante Microcal Origin 5.0 se estimó el valor de los parámetros cinéticos con regresión no lineal. El análisis se hizo con los gráficos directos y de dobles recíprocos mediante las ecuaciones correspondientes

Michaelis-Menten

Ecuación 1

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Bi Bi ordenado en estado estacionario

Ecuación 2

$$v_0 = \frac{V_{max}[A][B]}{K_{ia}K_{mB} + K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]}$$

Inhibición competitiva total

Ecuación 3

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [S]}$$

Inhibición incompetitiva total

Ecuación 4

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)}$$

Inhibición mixta total

Ecuación 5

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)}$$

Inhibición por sustrato incompetitiva

Ecuación 6

$$v_0 = \frac{V_{max}[S] \left(1 + \beta \left(\frac{[S]}{K_{IS}}\right)\right)}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[S]}{K_{IS}}\right)}$$

Hill

Ecuación 7

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]^{n_H}}{S_{0.5}^{n_H} + [S]^{n_H}}$$

Hill con inhibición por sustrato total

Ecuación 8

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]^{n_H}}{S_{0.5}^{n_H} + [S]^{n_H} \left(1 + \frac{[S]}{K_{IS}}\right)}$$

Bi Bi ordenado en estado estacionario con inhibición por sustrato competitiva total

Ecuación 9

$$v_0 = \frac{V_{max}[A][B]}{K_{ia}K_{m_B} \left(1 + \frac{[B]}{K_{IS}}\right) + K_{m_B}[A] + K_{m_A}[B] \left(1 + \frac{[B]}{K_{IS}}\right) + [A][B]}$$

Bi Bi ordenado en estado estacionario con inhibición por sustrato incompetitiva total

Ecuación 10

$$v_0 = \frac{V_{max}[A][B]}{K_{ia}K_{m_B} + K_{m_B}[A] + K_{m_A}[B] + [A][B] \left(1 + \frac{[B]}{K_{IS}}\right)}$$

Bi Bi ordenado en estado estacionario con inhibición por sustrato incompetitiva parcial

Ecuación 11

$$v_0 = \frac{V_{max}[A][B] \left(1 + \frac{\beta[B]}{K_{IS}}\right)}{K_{ia}K_{m_B} + K_{m_B}[A] + K_{m_A}[B] + [A][B] \left(1 + \frac{\beta[B]}{K_{IS}}\right)}$$

En estas ecuaciones v_0 es la velocidad inicial, V_{max} la velocidad máxima, $[S]$ la concentración de un sustrato cualquiera, K_m la constante de Michaelis-Menten que corresponde a la concentración de sustrato con la cual se obtiene la mitad de la V_{max} en una saturación hiperbólica, $[A]$ y $[B]$ son las concentraciones del primer y segundo sustrato en unirse a la enzima, respectivamente, en una reacción bisustrato ordenada, K_{ia} la constante de disociación del primer sustrato en unirse a la enzima, K_{mA} y K_{mB} las constantes de Michaelis-Menten para el primer y segundo sustrato en unirse a la enzima, respectivamente, $[I]$ la concentración de inhibidor; K_{ic} y K_{iu} las constantes de inhibición de un inhibidor competitivo e incompetitivo, respectivamente, β el factor que indica la proporción por la que baja la V_{max} real cuando la enzima es inhibida por sustrato, K_{IS} la constante de inhibición de un sustrato

cualquiera, $S_{0.5}$ la concentración de sustrato con la cual se obtiene la mitad de la V_{\max} en una cinética de saturación sigmoideal y n_H el número de Hill. El producto $\beta \times V_{\max}$ da como resultado el parámetro $V_{\max i}$ que se reporta en los resultados.

V.5. Inhibición por NADH en las reacciones NAD(P)⁺-dependientes

La inhibición por NADH en las reacciones NAD⁺ y NADP⁺-dependientes se hizo bajo condiciones en las que se obtuviera una velocidad inicial similar en ausencia de inhibidor. Se varió la concentración de NADH a concentraciones fijas de NAD⁺ 10 μ M y BAL 100 μ M en la reacción NAD⁺-dependiente, mientras que en la reacción NADP⁺-dependiente se utilizó NADP⁺ 3,250 μ M y BAL 100 μ M. Los datos en ambos casos se ajustaron a la **Ecuación 12**.

$$v_i = \frac{v_0 I_{50}}{I_{50} + [I]} \quad \text{Ecuación 12}$$

en donde v_i es la velocidad inhibida, v_0 la velocidad inicial, I_{50} es el valor de concentración de inhibidor al que la velocidad de la reacción se reduce a la mitad de la que existe en ausencia del inhibidor e $[I]$ es la concentración del inhibidor.

V.6. Determinación de constantes de disociación por fluorescencia

Las constantes de disociación de los complejos binarios NAD(P)(H)-enzima se determinaron midiendo el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la proteína provocada por la unión del nucleótido. La excitación de la proteína se hizo a 296 nm en un espectrofluorómetro Ollis DM45 con anchos de banda de 2.5 nm (excitación) y 5 nm (emisión). Los experimentos se

hicieron a una concentración de 4.6 μM de sitios activos de SoBADH determinados a partir del análisis de la secuencia de aminoácidos con ExPASy ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2003), en un amortiguador HEPES 50 mM, pH 6.9 con KCl 50 mM, etilenglicol 10 % (v/v) y 2-mercaptoetanol 10 mM a una temperatura de 30 °C. Para la titulación con el nucleótido se hicieron adiciones consecutivas de 1 μL de una solución concentrada. Después de cada adición, se agitó por un minuto para asegurarnos de que la unión había llegado al equilibrio. Debido a que no hubo un corrimiento en la longitud máxima de emisión de la proteína durante la titulación por ninguno de los nucleótidos, los valores de K_d se determinaron a partir del cambio en la intensidad de la fluorescencia a una longitud de onda específica (340 nm). Los datos de fluorescencia obtenidos se corrigieron considerando el efecto de la dilución y la absorbancia del nucleótido añadido en las longitudes de excitación y emisión (filtro interno; **Ecuación 13**). Los datos del cambio en la fluorescencia con respecto a la preparación sin nucleótido añadido se ajustaron a la **Ecuación 14**.

$$F_c = F_{obs} \times 10^{[(A_{ex}+A_{em})/2]} \quad \text{Ecuación 13}$$

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{max} [L]}{K_d + [L]} \quad \text{Ecuación 14}$$

En donde F_c es la fluorescencia corregida, F_{obs} la fluorescencia de la enzima en presencia del nucleótido corregidas por la dilución con el amortiguador, A_{ex} y A_{em} las absorbancias a las longitudes de onda de excitación y emisión también corregidas por la dilución con el amortiguador, ΔF el cambio en la fluorescencia observada, ΔF_{max} el cambio máximo en la fluorescencia, $[L]$ la concentración de ligando y K_d la constante de disociación del ligando del complejo que forma con la proteína.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1. Determinación de los parámetros cinéticos de la reacción NAD^+ -dependiente a concentraciones de NAD^+ y BAL subinhibitorias

VI.1.1. Patrones de velocidad inicial a concentraciones de NAD^+ y BAL subinhibitorias

La reacción catalizada por la SoBADH, al igual que el resto de las enzimas ALDH hidrolíticas, es esencialmente irreversible por lo que las velocidades iniciales se midieron únicamente en el sentido en el que NAD^+ y BAL son los sustratos y GB y NADH son los productos (**Esquema 1**). Los datos de velocidad inicial a concentraciones subinhibitorias de ambos sustratos se ajustaron de manera global a la **Ecuación 2** y se muestran en la **Figura 4**. Los parámetros cinéticos obtenidos como resultado de los ajustes se reportan en la **Tabla I**. La **Ecuación 2** con la que se ajustaron los datos de velocidad inicial, formalmente es la misma para los mecanismos secuenciales Bi Bi al azar en equilibrio rápido, Bi Bi ordenado en estado estacionario y Theorell-Chance ([Segel, 1975](#)), aunque el significado de los parámetros cinéticos es diferente. A lo largo de esta sección se discutirá cómo los resultados excluyen o son consistentes con uno de estos mecanismos cinéticos.

Los resultados mostrados en las **Figuras 4B y D** y en la **Tabla I** indican que la SoBADH tiene un mecanismo secuencial debido a que las rectas se intersectan. Como además lo hacen en el segundo cuadrante, ligeramente por encima del eje de abscisas, el valor de la K_{ia} es ligeramente mayor que la K_{mA} .

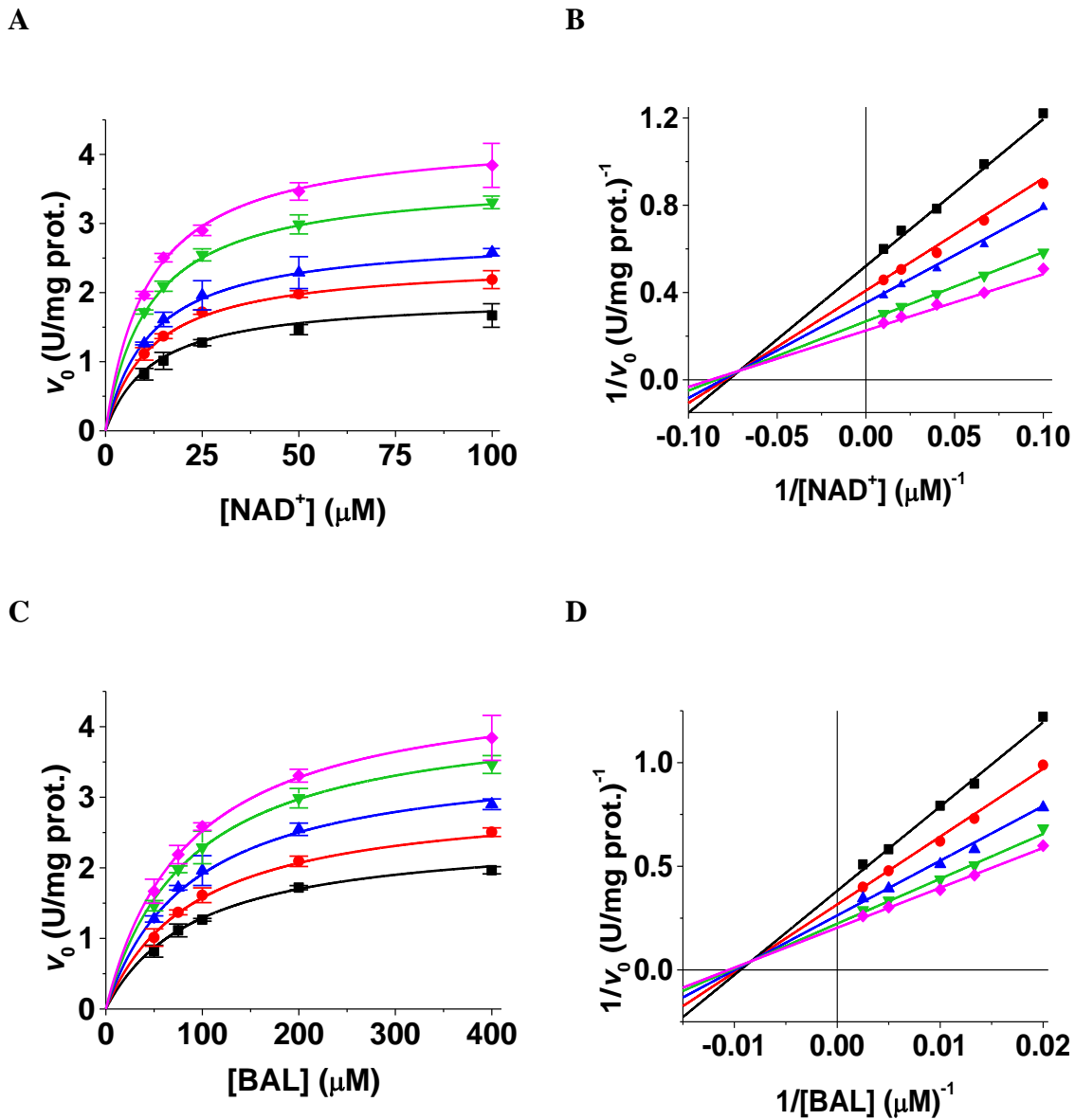


Figura 4. Patrones de velocidad inicial obtenidos con concentraciones de NAD^+ y BAL subinhibitorias. A y B, gráficos directo y de dobles recíprocos cuando NAD^+ es el sustrato variable y BAL el fijo-variable (\blacksquare 50, \bullet 75, \blacktriangle 100, \blacktriangledown 200 o \blacklozenge 400 μM). C y D, gráficos directo y de dobles recíprocos cuando BAL es el sustrato variable y NAD^+ el fijo-variable (\blacksquare 10, \bullet 15, \blacktriangle 25, \blacktriangledown 50 o \blacklozenge 100 μM). Los puntos son los valores promedio de la velocidad inicial obtenidos experimentalmente, las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores y las líneas trazadas son las resultantes del ajuste global a la **Ecuación 2**.

Tabla I. Parámetros cinéticos estimados a concentraciones de NAD⁺ y BAL subinhibitorias. Los valores de los parámetros se estimaron a partir del ajuste global de los datos experimentales mostrados en la **Figura 4** con la **Ecuación 2** y asumiendo que el mecanismo es un Bi Bi ordenado en estado estacionario.

Sustrato A	NAD ⁺	BAL
Sustrato B	BAL	NAD ⁺
V_{\max} (U/mg prot.)	5.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1
K_{ia} (μM)	13.3 ± 1.6	102.6 ± 14.4
K_{mA} (μM)	10.8 ± 0.8	84.6 ± 4.7
K_{mB} (μM)	84.6 ± 4.7	10.8 ± 0.8
k_{cat} (s^{-1})	4.9	4.9
k_{cat}/K_{mA} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	4.5×10^5	5.8×10^4
k_{cat}/K_{mB} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	5.8×10^4	4.5×10^5
$k_{\text{cat}}/K_{ia} K_{mB}$ ($\text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$)	4.3×10^9	4.4×10^9

El mecanismo Theorell-Chance es un caso muy particular en donde los niveles de estado estacionario del complejo ternario son despreciables ([Theorell y Chance, 1951](#)); sin embargo, los pasos limitantes de la velocidad que han sido propuestos para las enzimas ALDH implican la formación de concentraciones significativas de dichos complejos ([Feldman y Weiner, 1972](#); [Weiner *et al.*, 1976](#); [Wang y Weiner, 1995](#); [Mann y Weiner, 1999](#)). Estos antecedentes podrían ayudarnos a descartar el mecanismo Theorell-Chance.

En la **Tabla I** se reportan los parámetros cinéticos estimados considerando que NAD^+ o BAL es el primer sustrato en unirse a la enzima, debido a que los patrones de velocidad inicial son insuficientes para determinar el orden de adición de los sustratos. Más adelante, se concluirá que el mecanismo es ordenado en estado estacionario y que el NAD^+ es el primer sustrato en unirse a la enzima. Por lo tanto, sólo existen los parámetros cinéticos estimados con NAD^+ como primer sustrato.

VI.1.2. Inhibición por NADH a concentraciones de NAD^+ y BAL subinhibitorias

Para continuar con la determinación del mecanismo cinético se realizaron estudios de inhibición por producto que permiten determinar el orden de liberación de los productos y de la unión de los sustratos. La inhibición observada por NADH frente a NAD^+ y frente a BAL fue mixta (**Figuras 5 y 6; Tabla II**). Estos resultados excluyen al mecanismo Bi Bi al azar en equilibrio rápido sugerido por los estudios de velocidad inicial (**Figura 4**), ya que en este mecanismo se debe observar una inhibición competitiva del producto con respecto a ambos sustratos (Segel, 1975).

Los resultados de inhibición por el NADH que se obtuvieron son difíciles de interpretar a primera vista, debido a que, en el mecanismo cinético Bi Bi ordenado en estado estacionario generalmente reportado para las enzimas ALDH, se esperarían patrones de inhibición competitiva por NADH frente a NAD^+ y mixto frente a BAL (**Esquema 3A**). Por otra parte, una isomerización de la enzima libre después de la liberación del producto NADH (mecanismo Iso; **Esquema 3B**) podría producir patrones mixtos por el NADH frente a ambos sustratos pero, como se argumentó en la sección *I.1.4.1. Inhibición por NADH en las*

enzimas aldehído deshidrogenasas hidrolíticas, este no es un mecanismo probable. A primera vista, la inhibición mixta por el NADH frente al NAD⁺ o al BAL podría ser el resultado de un mecanismo cinético en el que NADH se liberara antes que GB, pero dada la irreversibilidad de la reacción esto daría lugar a inhibición incompetitiva, no mixta como se observa.

También, es interesante que al utilizar concentraciones subsaturante y saturante de BAL en la inhibición por NADH frente al NAD⁺ el patrón mixto no cambia pero el valor de K_{ic}^{NADH} sí, siendo que el valor de K_{ic} debe ser independiente de la concentración del segundo sustrato de la reacción (**Tabla II**). Estos resultados sugieren que el mecanismo cinético es más complejo que un simple Bi Bi ordenado. Como mostraremos más adelante en la sección **VI.2.4. Inhibición por BAL**, la formación de un complejo no productivo E-NADH-BAL, que da lugar a la inhibición por el aldehído, puede ser la causa de este comportamiento “atípico”.

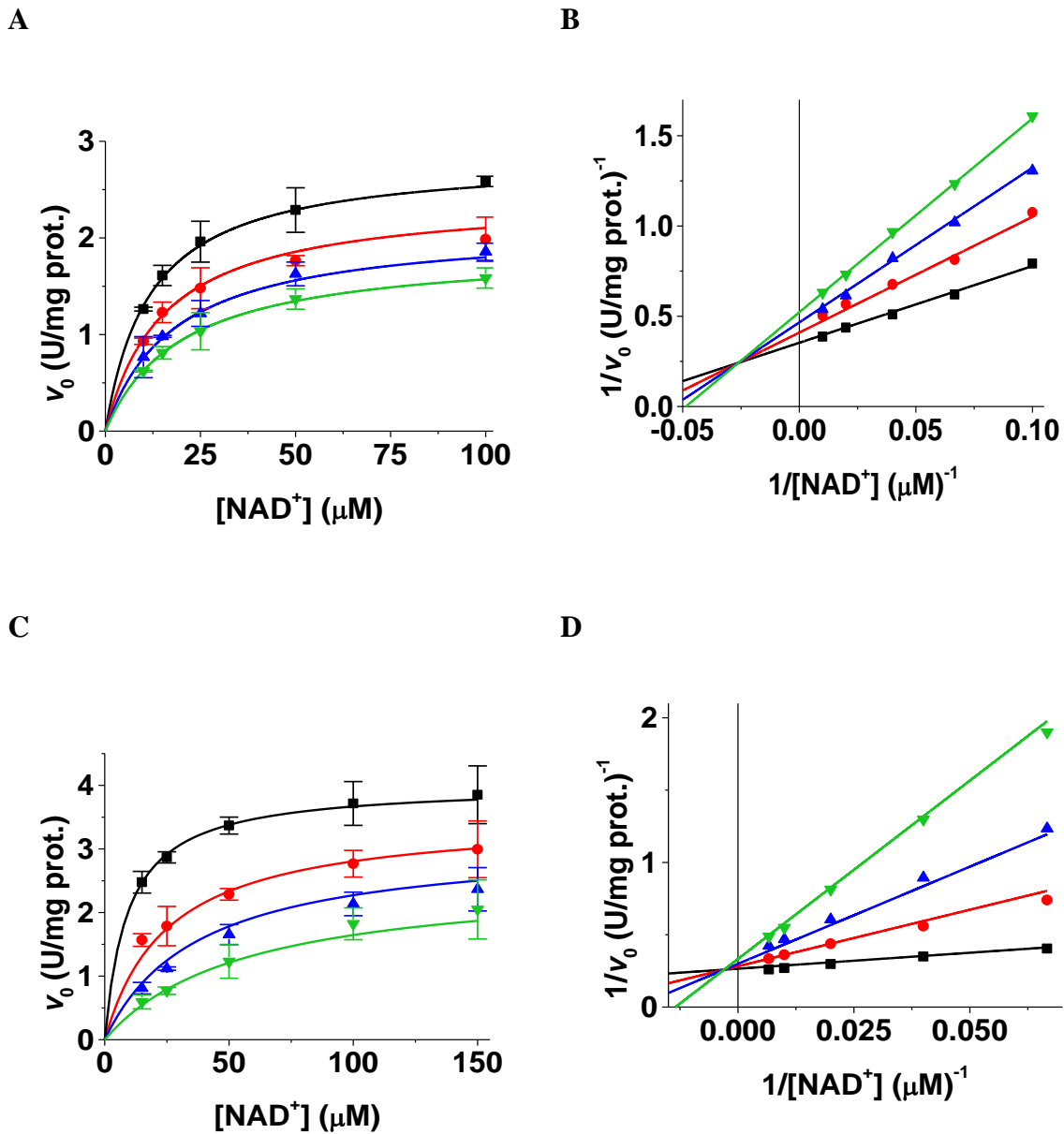
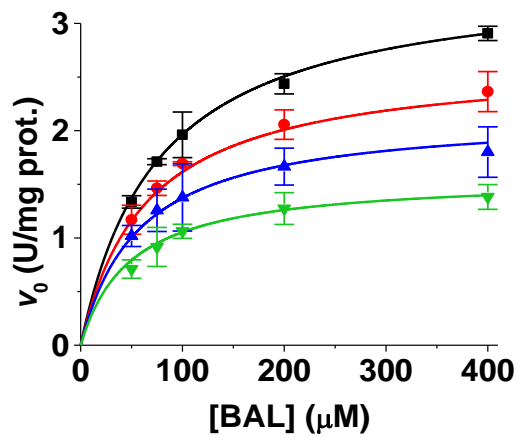


Figura 5. Patrones de inhibición por NADH frente a NAD^+ manteniendo fija la concentración de BAL. A y B, NAD^+ variable con BAL 100 μM y NADH \square 0, \bullet 50, \blacktriangle 100 o \blacktriangledown 150 μM . C y D, NAD^+ variable con BAL 400 μM y NADH \square 0, \bullet 25, \blacktriangle 50 o \blacktriangledown 100 μM . A y C, gráficos directos; B y D, gráficos de dobles recíprocos. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente, las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores y las líneas trazadas son las resultantes del ajuste global a la Ecuación 5.

A



B

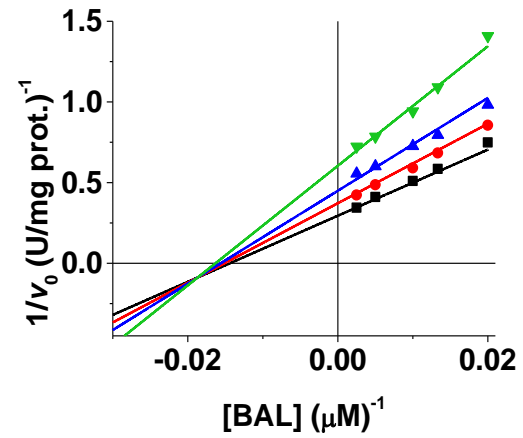
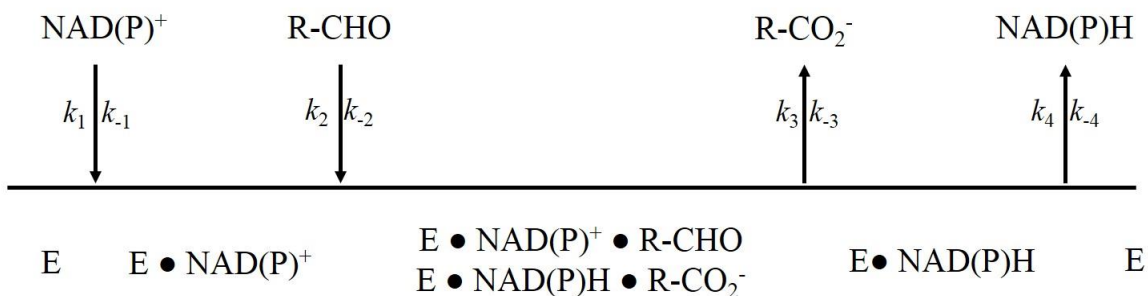


Figura 6. Patrón de inhibición por NADH frente a BAL manteniendo fija la concentración de NAD^+ . A y B, BAL variable con NAD^+ 25 μM y NADH \blacksquare 0, \bullet 25, \blacktriangle 50 o \blacktriangledown 100 μM . A, gráfico directo; B, gráfico de dobles recíprocos. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente, las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores y las líneas trazadas son las resultantes del ajuste global a la **Ecuación 5**.

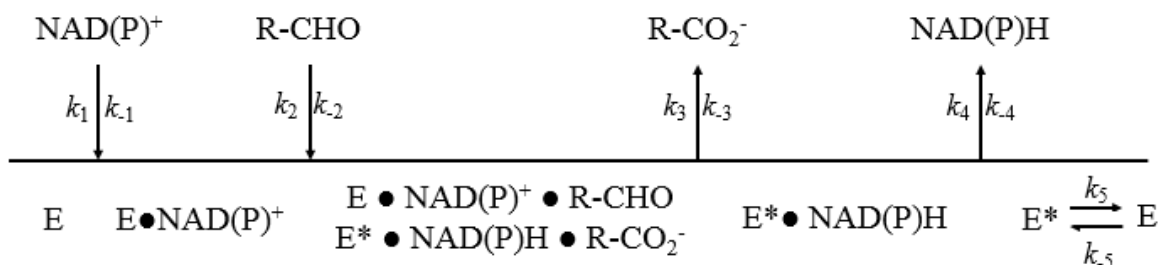
Tabla II. Parámetros cinéticos estimados de la inhibición por NADH frente a los dos sustratos a concentraciones subinhibitorias. Los valores de los parámetros se estimaron a partir del ajuste global de los datos experimentales mostrados en las **Figuras 5 y 6** con la **Ecuación 5**. Las unidades de los parámetros cinéticos son: V_{max} , U/mg prot.; K_m , K_{ic} y K_{iu} μ M. M, inhibición mixta.

Sustrato variable	NAD ⁺	NAD ⁺	BAL
Sustrato fijo	BAL	BAL	NAD ⁺
	(100 μ M)	(400 μ M)	(25 μ M)
V_{max}	2.8 \pm 0.1	4.0 \pm 0.1	3.5 \pm 0.1
K_m	12.0 \pm 0.1	9.4 \pm 1.2	75.9 \pm 4.7
K_{ic}	96.1 \pm 14.2	12.0 \pm 2.0	238 \pm 86
K_{iu}	300 \pm 37	177 \pm 36	83.1 \pm 6.5
Tipo de inhibición	M	M	M

A



B



Esquema 3. Diagramas de Cleland mostrando los mecanismos Bi Bi ordenado en estado estacionario propuestos para enzimas ALDH. A, Bi Bi ordenado en estado estacionario y B, Iso Bi Bi ordenado en estado estacionario.

VI.1.3. Inhibición por GB a concentraciones de NAD^+ y BAL subinhibitorias

De manera general, se considera despreciable la inhibición por el producto ácido en las enzimas ALDH (Bradbury y Jakoby, 1971; Rivett y Tipton, 1981; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993; Chen *et al.*, 2014) debido a que deben usarse concentraciones muy altas para ver un efecto inhibitorio (Velasco-García *et al.*, 2000). Sin embargo, fue importante tratar de

caracterizar la inhibición por el ácido para formular conclusiones más sólidas sobre el mecanismo cinético de la *S*oBADH.

En la *S*oBADH encontramos inhibición a partir de 0.5 M de GB (**Figuras 7 y 8**). GB se comportó como un inhibidor mixto frente al NAD^+ y competitivo frente al BAL (**Figuras 7B y 8B; Tabla III**). Considerando un mecanismo Bi Bi ordenado en estado estacionario, sea o no Iso, (**Esquema 3**) y dado que la reacción es irreversible, se esperaría que GB fuera un inhibidor incompetitivo, tanto frente a NAD^+ como frente a BAL en ausencia de NADH añadido al medio de reacción. De nuevo, estos resultados nos sugieren un mecanismo cinético complejo, aunque hay que hacer notar que los resultados de las **Figuras 7 y 8** deben considerarse con cierta reserva debido a las elevadas concentraciones de GB que se utilizaron y que pudieron alterar las propiedades fisicoquímicas del disolvente y la proteína.

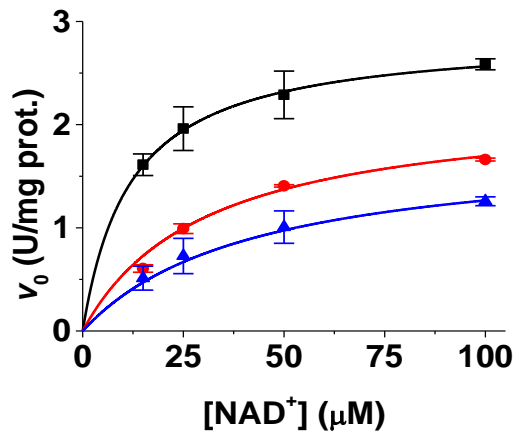
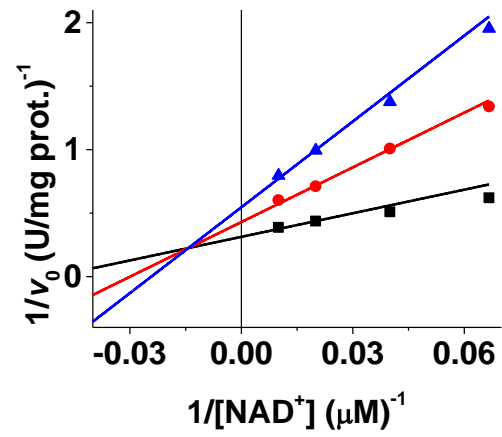
A**B**

Figura 7. Patrón de inhibición por GB frente a NAD^+ manteniendo fija la concentración de BAL. A y B, NAD^+ variable con BAL 100 μM y GB \blacksquare 0, \bullet 0.5 o \blacktriangle 1.0 M. A, gráfico directo; B, gráfico de dobles recíprocos. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente, las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores y las líneas trazadas son las resultantes del ajuste global a la **Ecuación 5**.

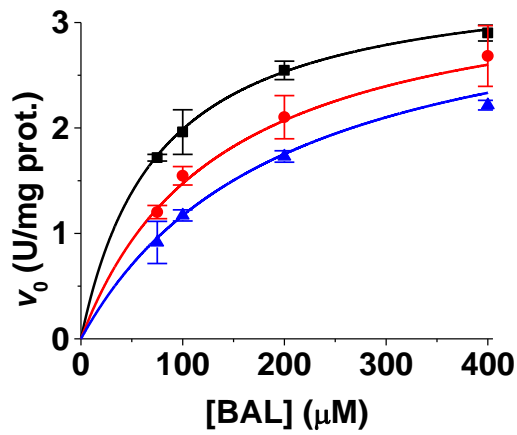
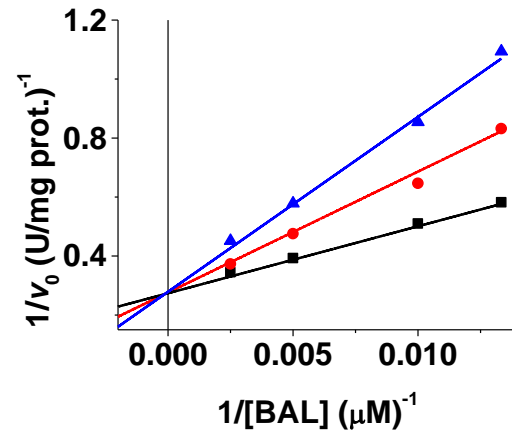
A**B**

Figura 8. Patrón de inhibición por GB frente a BAL manteniendo fija la concentración de NAD⁺. A y B, BAL variable con NAD⁺ 25 μM y GB ■ 0, ● 0.5 o ▲ 1.0 M. A, gráfico directo; B, gráfico de dobles recíprocos. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente, las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores y las líneas trazadas son las resultantes del ajuste global a la **Ecuación 3.**

Tabla III. Parámetros cinéticos estimados de la inhibición por GB frente a los dos sustratos a concentraciones subinhibitorias. Los valores de los parámetros se estimaron a partir del ajuste global de los datos experimentales mostrados en las **Figuras 7 y 8** con las **Ecuaciones 5 y 3**, respetivamente. Las unidades de los parámetros cinéticos son: V_{\max} , U/mg prot.; K_m , K_{ic} y K_{iu} , μM . M, inhibición mixta; C, inhibición competitiva.

Sustrato variable	NAD ⁺	BAL
Sustrato fijo	BAL (100 μM)	NAD ⁺ (25 μM)
V_{\max}	2.9 \pm 0.0	3.5 \pm 0.1
K_m	11.9 \pm 1.3	78.6 \pm 7.7
K_{ic}	213 \pm 33	616 \pm 74
K_{iu}	1,686 \pm 349	—
Tipo de inhibición	M	C

VI.1.4. Inhibición por AMP a concentraciones de NAD⁺ y BAL subinhibitorias

Un análogo de un sustrato es una molécula que posee cierta similitud estructural con respecto a la molécula sustrato, pero que no participa en la reacción y que funciona como inhibidor. Por lo tanto, se comportan como inhibidores sin salida o “dead-end” y son una herramienta muy útil para investigar el orden en la adición de los sustratos, sobre todo cuando los datos

de inhibición por producto no indican claramente cuál es este orden, tal como es el caso de la SoBADH que se describe en la sección anterior.

El análogo que se utilizó para el NAD^+ fue el AMP. La **Figura 9B** muestra que el AMP es un inhibidor competitivo frente al NAD^+ . Es decir, se confirmó lo esperado, puesto que AMP y NAD^+ son mutuamente excluyentes debido a que se unen al mismo subsitio del sitio activo y a la misma forma de la enzima (la enzima libre). La **Figura 10B** muestra que el AMP es un inhibidor mixto frente a BAL, lo que indica que AMP y BAL se unen a diferentes formas de la enzima que están conectadas por pasos reversibles y que, además, BAL se une a una especie de la enzima que está después de la que se une el AMP en el sentido de la reacción. Por tanto, la inhibición por AMP confirmó el orden de adición de los sustratos a la enzima: NAD^+ antes que BAL, aunque no nos dicen nada sobre el orden de salida de los productos. Los parámetros cinéticos estimados en estos experimentos se reportan en la **Tabla IV**.

Cabe mencionar que el valor estimado de los parámetros K_{ic} y K_{iu} , cuando BAL es el sustrato variable, presentaron un error bastante grande, por lo que este resultado podría parecer poco confiable. Sin embargo, en un experimento más completo de la inhibición por AMP frente a BAL, utilizando un intervalo de concentración de sustrato muy amplio, se mantuvo el patrón de inhibición mixto como se mostrará más adelante (**Figura 27**). De hecho, más adelante en la sección **VI.2. Inhibición por NAD^+ y BAL en la reacción NAD^+ -dependiente** se describe cómo se pueden cometer errores en los patrones de inhibición y la estimación de los valores de los parámetros cinéticos si se ignora la inhibición por sustrato.

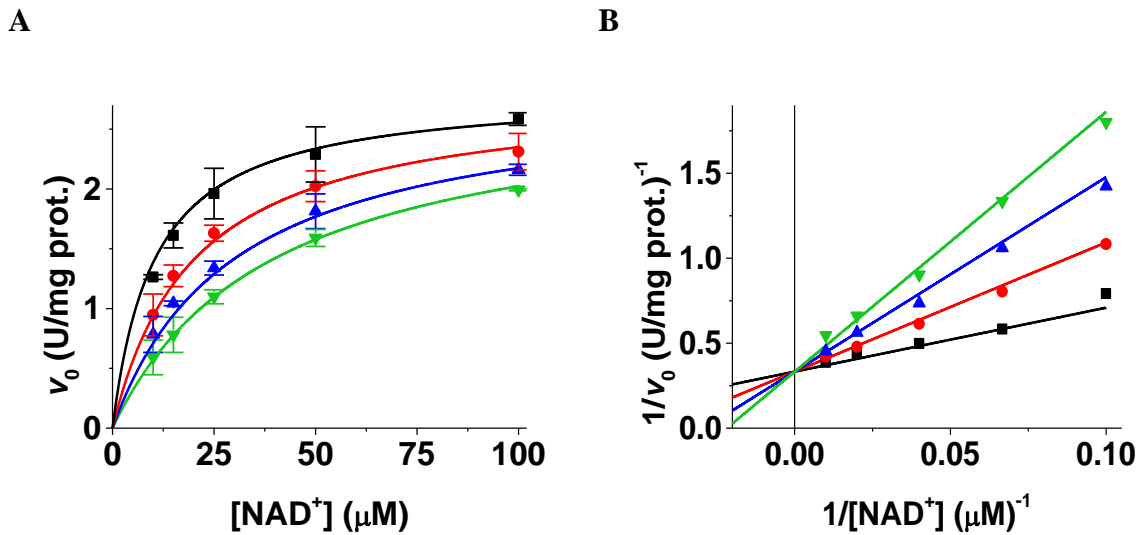


Figura 9. Patrón de inhibición por AMP frente a NAD⁺ manteniendo fija la concentración de BAL. A y B, NAD⁺ variable con BAL 100 μM y AMP = 0, ● 0.5, ▲ 1.0, o ▼ 1.5 mM. A, gráfico directo; B, gráfico de dobles recíprocos. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente, las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores y las líneas trazadas son las resultantes del ajuste global a la Ecuación 3.

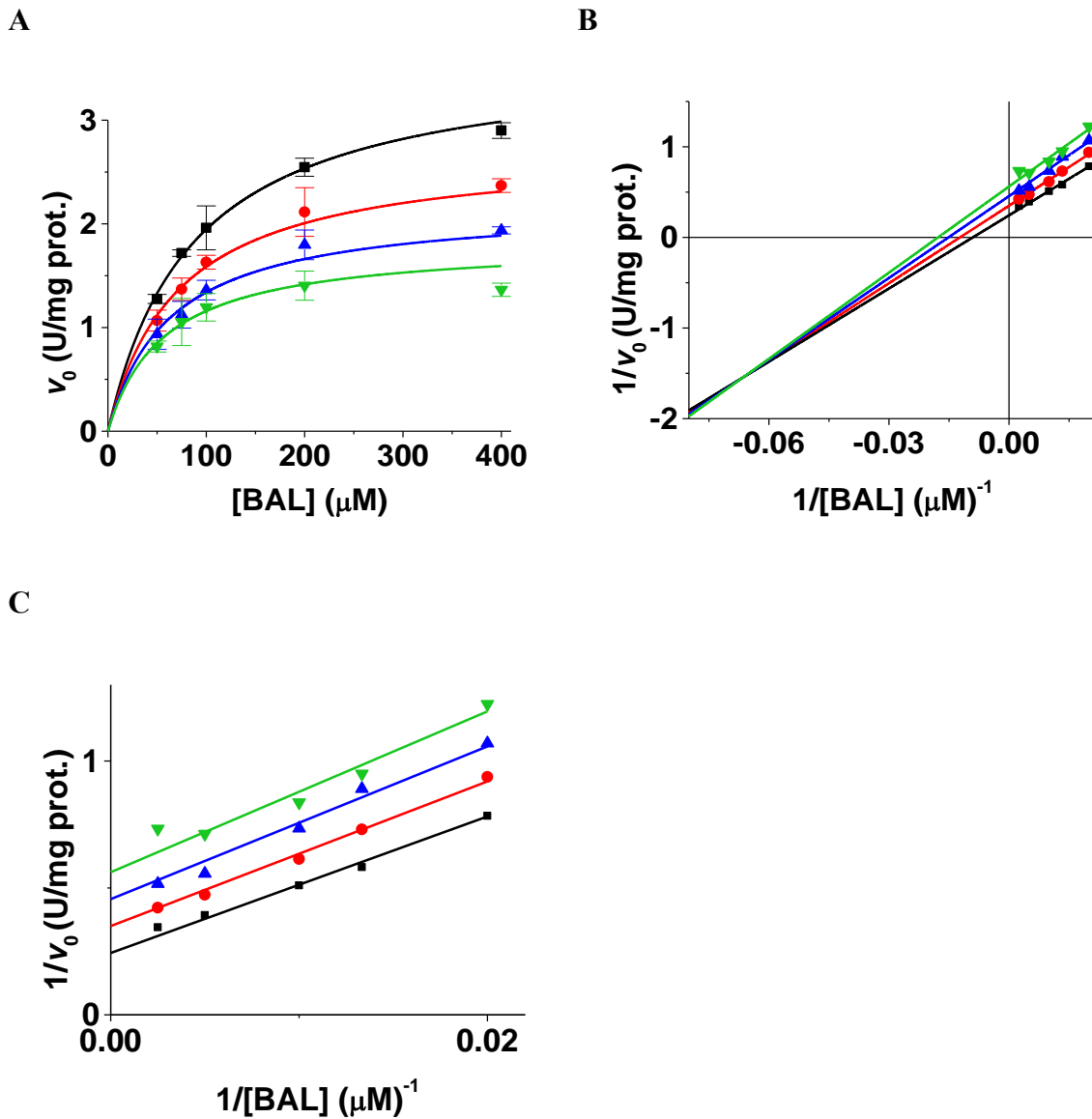


Figura 10. Patrón de inhibición por AMP frente a BAL manteniendo fija la concentración de NAD^+ . A, B y C, BAL variable con NAD^+ 25 μM y AMP \blacksquare 0, \bullet 0.5, \blacktriangle 1.0, o \blacktriangledown 1.5 mM. A, gráfico directo; B, gráfico de dobles recíprocos; C, acercamiento a la región donde se encuentran los puntos experimentales. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente, las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores y las líneas trazadas son las resultantes del ajuste global a la Ecuación 5.

Tabla IV. Parámetros cinéticos estimados de la inhibición por AMP frente a los dos sustratos a concentraciones subinhibitorias. Los valores de los parámetros se estimaron a partir del ajuste global de los datos experimentales mostrados en las **Figuras 9 y 10** con las **Ecuaciones 3 y 5**, respetivamente. Las unidades de los parámetros cinéticos son: V_{\max} , U/mg prot.; K_m , K_{ic} y K_{iu} , μM . C, inhibición competitiva; M, inhibición mixta.

Sustrato variable	NAD ⁺	BAL
Sustrato fijo	BAL (100 μM)	NAD ⁺ (25 μM)
V_{\max}	2.8 \pm 0.1	3.6 \pm 0.1
K_m	10.4 \pm 0.9	86.7 \pm 9.2
K_{ic}	489 \pm 93	4,796 \pm 3,017
K_{iu}	—	1,504 \pm 202
Tipo de inhibición	C	M

VI.1.5. Inhibición por colina a concentraciones de NAD⁺ y BAL subinhibitorias

Para continuar con la determinación en el orden de unión de los sustratos, se utilizó colina como molécula análoga para el BAL. El patrón incompetitivo de colina frente NAD⁺ mostrado en la **Figura 11B** es muy informativo porque indica que colina y NAD⁺ se unen a diferentes formas de la enzima y que NAD⁺ se une a una especie de la enzima que está antes que la especie a la que se une colina. La **Figura 12B** mostró que colina es un inhibidor competitivo frente al BAL, indicando que su unión es mutuamente excluyente. En conjunto,

estos resultados son una evidencia clara de la adición ordenada de los sustratos, siendo el NAD^+ el primero en unirse a la enzima y BAL el segundo. Los parámetros cinéticos estimados en estos experimentos se reportan en la **Tabla V**.

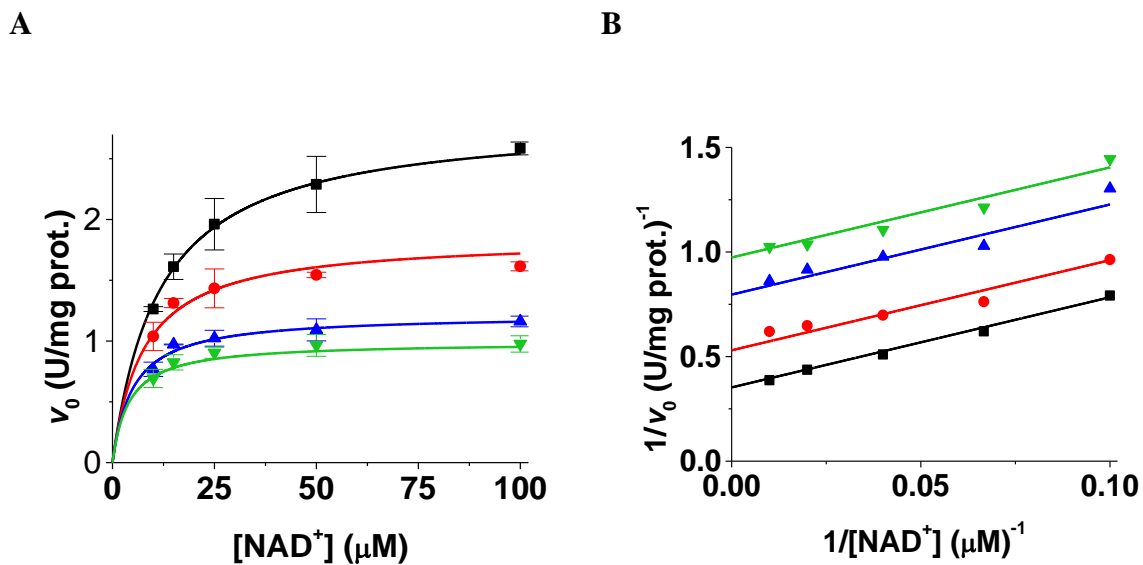


Figura 11. Patrón de inhibición por colina frente a NAD^+ manteniendo fija la concentración de BAL. A y B, NAD^+ variable con BAL 100 μM y colina \blacksquare 0, \bullet 1.0, \blacktriangle 2.5 o \blacktriangledown 3.5 mM. A, gráfico directo; B, gráfico de dobles recíprocos. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente, las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores y las líneas trazadas son las resultantes del ajuste global a la **Ecuación 4**.

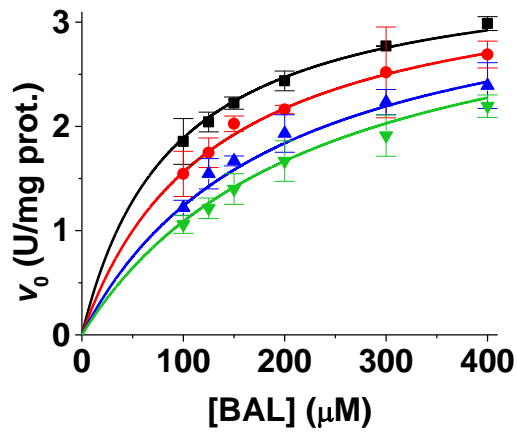
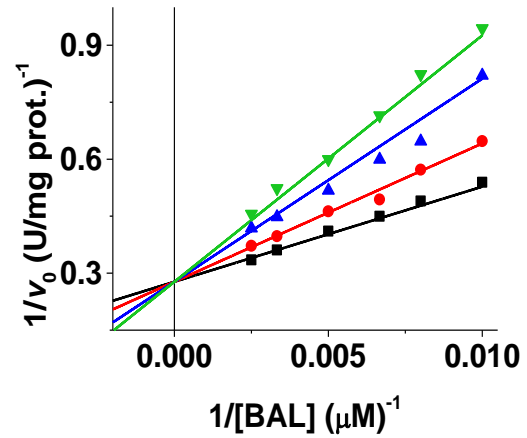
A**B**

Figura 12. Patrón de inhibición por colina frente a BAL manteniendo fija la concentración de NAD⁺. A y B, BAL variable con NAD⁺ 25 μM y colina ▪ 0, ● 1.0, ▲ 2.5 o ▼ 3.5 mM. A, gráfico directo; B, gráfico de dobles recíprocos. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente, las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores y las líneas trazadas son las resultantes del ajuste global a la **Ecuación 3.**

Tabla V. Parámetros cinéticos estimados de la inhibición por colina frente a los dos sustratos a concentraciones subinhibitorias. Los valores de los parámetros se estimaron a partir del ajuste global de los datos experimentales mostrados en las **Figuras 11 y 12** con las **Ecuaciones 4 y 3**, respetivamente. Las unidades de los parámetros cinéticos son: V_{\max} , U/mg prot.; K_m , K_{ic} y K_{iu} , μM . UN, inhibición incompetitiva; C, inhibición competitiva.

Sustrato variable	NAD ⁺	BAL
Sustrato fijo	BAL (100 μM)	NAD ⁺ (25 μM)
V_{\max}	2.8 \pm 0.1	3.6 \pm 0.1
K_m	11.6 \pm 0.8	89.1 \pm 5.9
K_{ic}	—	2,201 \pm 201
K_{iu}	1,987 \pm 154	—
Tipo de inhibición	UN	C

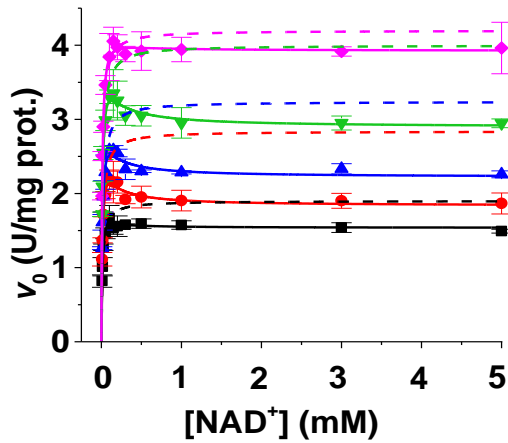
VI.2. Inhibición por NAD⁺ y BAL en la reacción NAD⁺-dependiente

Para continuar con la caracterización cinética de la *SoBADH* y la determinación de su mecanismo cinético, se estudió la inhibición por los sustratos NAD⁺ y BAL. Como se describe más adelante, el estudio de la inhibición por sustrato puede proporcionar evidencia de complejos no productivos y de rutas de reacción alternas menores que pueden brindar información acerca del mecanismo cinético.

VI.2.1. Inhibición por NAD^+

Se saturó a la enzima con NAD^+ usando un intervalo de concentración muy amplio para determinar si el nucleótido oxidado causa inhibición y, en su caso, a través de qué mecanismo. Los resultados (**Figura 13; Tabla VI**) muestran que sí existe inhibición por NAD^+ en la *S*oBADH y que es parcial (la saturación con el sustrato no provoca que la v_0 descienda hasta cero, sino que la v_0 se estaciona en un valor fijo) con valores de β de 0.7 a 0.9 (**Figura 14**). Hasta la fecha, no se ha propuesto un mecanismo cinético que explique la inhibición por el NAD^+ en las enzimas ALDH. Con ayuda de los resultados obtenidos en la inhibición por NAD^+ en presencia de NADH, se propone más adelante un mecanismo que involucra la formación de complejos centrales (**Esquema 6**).

A



B

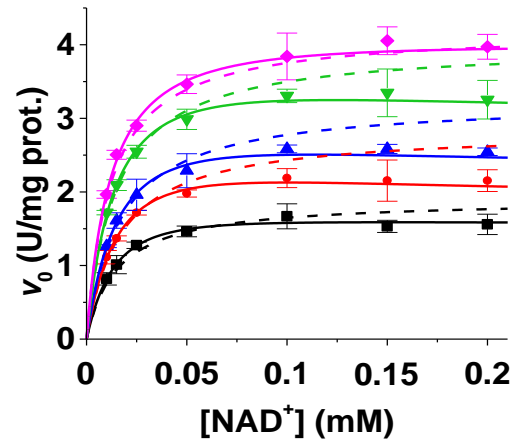


Figura 13. Efecto de la concentración de BAL subinhibitorio sobre la inhibición por el sustrato NAD^+ . **A** y **B**, NAD^+ variable con BAL \blacksquare 50, \bullet 75, \blacktriangle 100, \blacktriangledown 200 o \blacklozenge 400 μM . **A**, gráfico completo; **B**, acercamiento al gráfico completo. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente, las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores. Las líneas continuas son el resultado del ajuste individual a la **Ecuación 6**; las líneas con guiones muestran el comportamiento teórico de la enzima si no existiera inhibición por sustrato, y se obtienen mediante simulaciones usando la **Ecuación 1** y los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la **Ecuación 6**.

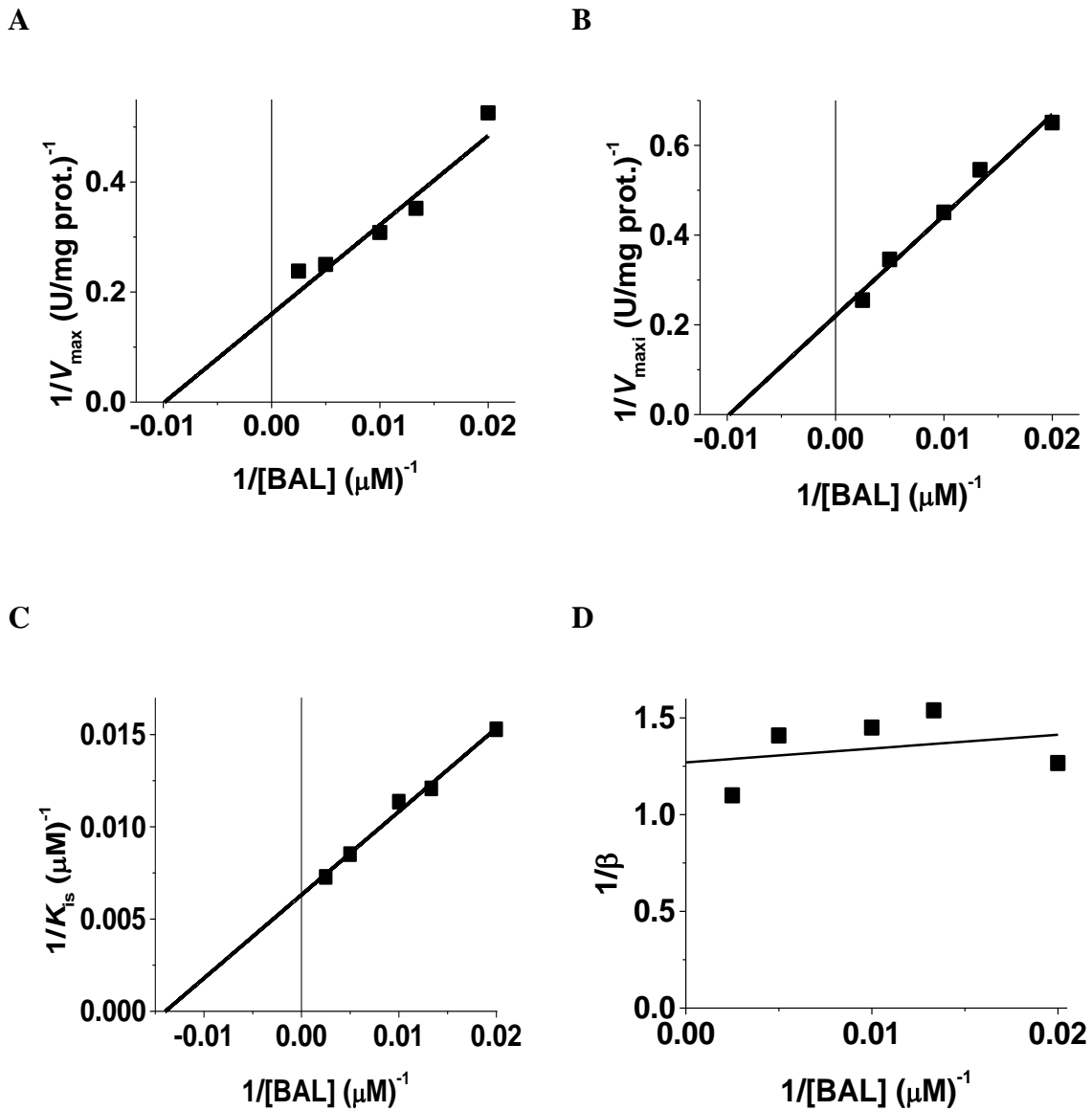


Figura 14. Regráficos de los parámetros aparentes de la concentración de BAL subinhibitorio sobre la inhibición por el sustrato NAD^+ . **A**, V_{\max} ; **B**, $V_{\max i}$; **C**, K_{is} y **D**, β con respecto a la concentración de BAL. Los parámetros aparentes se obtuvieron a partir del ajuste individual a la **Ecuación 6** de los datos mostrados en la **Figura 13**.

Tabla VI. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de BAL subinhibitorio sobre la inhibición por el sustrato NAD⁺. Los valores de los parámetros se estimaron a partir de los regráficos de los parámetros aparentes mostrados en la **Figura 14** que se obtuvieron a partir del ajuste individual a la **Ecuación 6** de los datos mostrados en la **Figura 13**.

V_{\max} (U/mg prot.)	6.3 ± 0.3
$V_{\max i}$ (U/mg prot.)	4.5 ± 0.2
β	0.78 ± 0.16
K_m^{BAL} (μM)	65 ± 15
$K_{is}^{\text{NAD}^+}$ (μM)	162 ± 4

VI.2.2. Inhibición por NAD⁺ en presencia de NADH

La saturación por NAD⁺ también se determinó en presencia de NADH (**Figura 15**) para investigar si la inhibición por sustrato que exhibe el NAD⁺ está relacionada con la inhibición mixta por NADH frente a NAD⁺ observada en los experimentos donde se usaron concentraciones subinhibitorias del nucleótido oxidado (**Figuras 5B y D**). El NADH eliminó la inhibición por sustrato NAD⁺ y los valores de V_{\max} en presencia de NADH fueron los mismos independientemente de la concentración del NADH en el medio de ensayo, lo que indica inhibición competitiva del NADH frente al NAD⁺ en estas condiciones. El que el NADH elimine la inhibición por NAD⁺ sugiere que el NADH se une a la misma especie de la enzima a la que se une la molécula de NAD⁺ inhibidora, que lógicamente no es la enzima

libre porque la molécula del NAD^+ que se une a esta especie lo hace en forma productiva (**Esquema 6**). Debido a que los datos de la **Figura 15** no se ajustaron a mismo tipo de curva, puesto que en ausencia de NADH se presentó inhibición por sustrato y en presencia de NADH no, no se pudieron realizar los regráficos de los parámetros aparentes. En la **Tabla VII** se presentan los valores individuales de los parámetros cinéticos obtenidos.

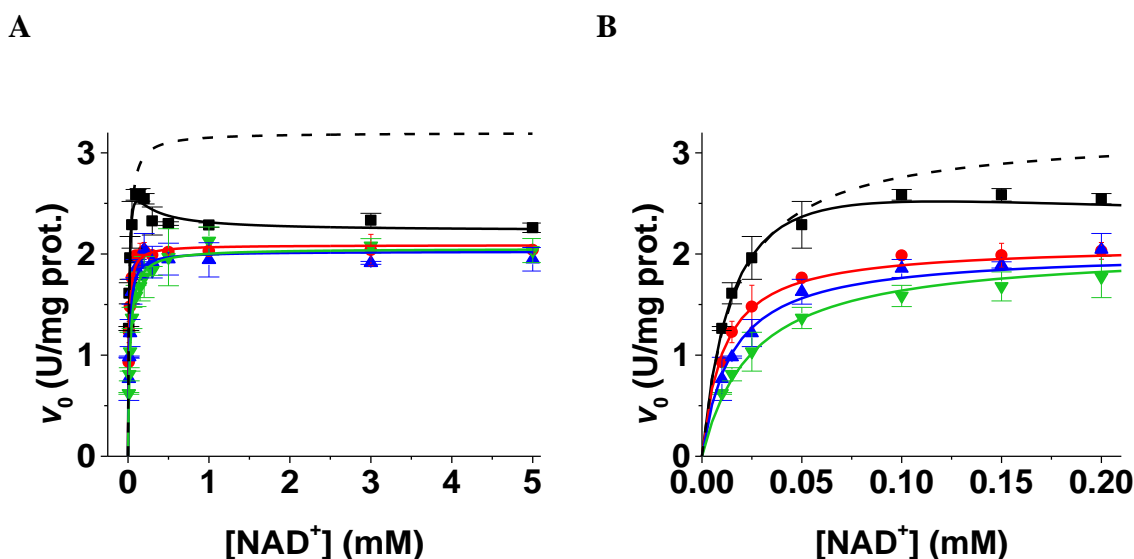


Figura 15. Efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato NAD^+ a una concentración subinhibitoria de BAL. A y B, NAD^+ variable con BAL 100 μM y NADH \blacksquare 0, \bullet 50, \blacktriangle 100 o \blacktriangledown 150 μM . A, gráfico completo; B, acercamiento al gráfico completo. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente, las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores. Las líneas continuas son el resultado del ajuste individual a la **Ecuación 6** en ausencia de NADH y a la **Ecuación 1** en presencia de NADH; las líneas con guiones muestran el comportamiento teórico de la enzima si no existiera inhibición por sustrato, y se obtienen mediante simulaciones usando la **Ecuación 1** y los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la **Ecuación 6**.

Tabla VII. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato NAD⁺ a una concentración subinhibitoria de BAL.

Los valores de los parámetros se estimaron a partir del ajuste individual con las **Ecuaciones 1 y 6** de los datos mostrados en la **Figura 15**.

NADH (μM)	0	50	100	150
V_{\max} (U/mg prot.)	3.2 ± 0.3	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2	2.05 ± 0.0
$V_{\max i}$ (U/mg prot.)	2.2 ± 0.1	—	—	—
β	0.7 ± 0.1	—	—	—
$K_m^{\text{NAD}^+}$ (μM)	16.4 ± 3.8	10.5 ± 0.7	15.2 ± 1.5	25.3 ± 1.9
$K_{is}^{\text{NAD}^+}$ (μM)	99.2 ± 67.1	—	—	—

Por otra parte, se examinó si una concentración inhibitoria de BAL afectaba la inhibición por el sustrato NAD⁺ y el tipo de inhibición por NADH frente al NAD⁺. La inhibición por NADH, aparentemente continuó siendo mixta y al igual que se observó a una concentración subinhibitoria de BAL, el NADH eliminó la inhibición por sustrato NAD⁺ (**Figura 16**). Un resultado interesante e inesperado fue que la saturación por NAD⁺ mostró una aparente cooperatividad negativa en presencia de NADH (**Figura 16; Tabla VIII**). Estos datos se ajustaron bien a la ecuación de cooperatividad negativa (**Ecuación 6**) así como a la suma de dos hipérbolas (**Ecuación 1**; $V_{\max}^1 = 1.5 \pm 0.1$, $V_{\max}^2 = 1.3 \pm 0.1$, $K_m^1 = 12.8 \pm 1.4$ y $K_m^2 = 496 \pm 84$). Esto podría deberse a que el NAD⁺ es capaz de unirse a dos formas de la enzima por las cuales presenta distinta afinidad.

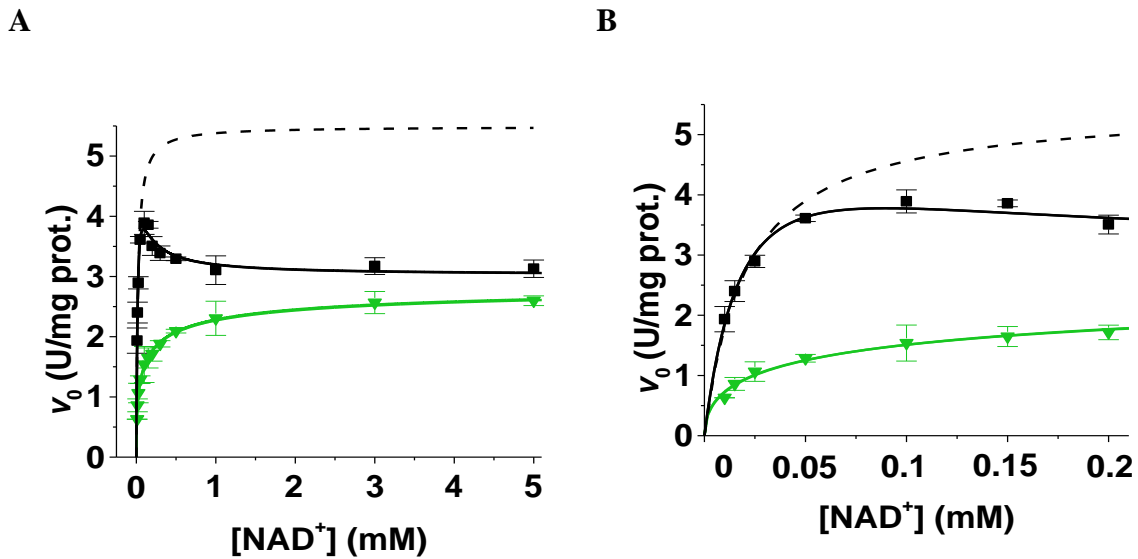


Figura 16. Efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato NAD^+ a una concentración inhibitoria de BAL. A y B, NAD^+ variable con BAL 2 mM y NADH \blacksquare 0 o \blacktriangledown 150 μM . A, gráfico completo; B, acercamiento al gráfico completo. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente; las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores. Los datos sin NADH se ajustaron a la **Ecuación 6 y los datos con NADH 150 μM a la **Ecuación 7** debido a la ausencia de inhibición por sustrato y a la cooperatividad negativa que presentaron. Las líneas continuas son el resultado del ajuste individual, las líneas con guiones muestran el comportamiento teórico de la enzima si no existiera inhibición por sustrato, y se obtienen en simulaciones usando la **Ecuación 1** y los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la **Ecuación 6**.**

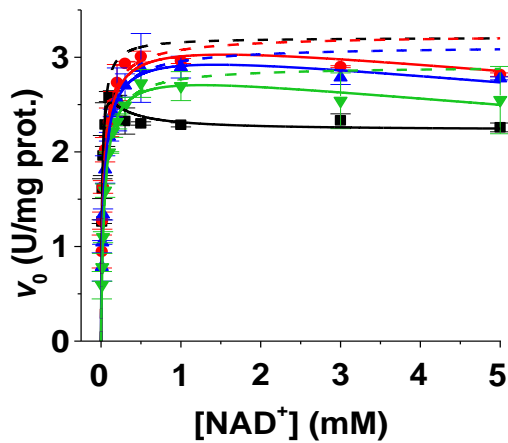
Tabla VIII. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato NAD⁺ a una concentración inhibitoria de BAL. Los valores de los parámetros se estimaron a partir del ajuste individual con las **Ecuaciones 6** y **7** de los datos mostrados en la **Figura 16**.

NADH (μM)	0	150
V_{max} (U/mg prot.)	5.5 ± 0.7	3.6 ± 0.1
V_{maxi} (U/mg prot.)	3.0 ± 0.1	—
β	0.6 ± 0.1	—
$K_{\text{m}}(\text{S}_{0.5})^{\text{NAD}^+}$ (μM)	20.4 ± 5.3	92.5 ± 0.0
$K_{\text{is}}^{\text{NAD}^+}$ (μM)	78.6 ± 42.1	—
n_{H}	—	0.5 ± 0.0

VI.2.3. Inhibición por NAD⁺ en presencia de AMP

Para explorar con más detalle la inhibición por NADH frente al NAD⁺ se evaluó la inhibición por NAD⁺ en presencia de AMP (**Figura 17**; **Tabla IX**). A diferencia del NADH, la inhibición por AMP frente a NAD⁺ a concentraciones subinhibitorias de este fue competitiva (**Figura 9B**), un resultado interesante ya que el NADH y el AMP son moléculas análogas. El AMP disminuyó significativamente la inhibición por NAD⁺, pero no la eliminó (valores de K_{IS} en **Tabla IX**). Estos resultados sugieren que el AMP y el NAD⁺ inhibidor se unen a la misma forma de la enzima pero que el AMP tiene un efecto inhibitorio menor que el NAD⁺ inhibidor.

A



B

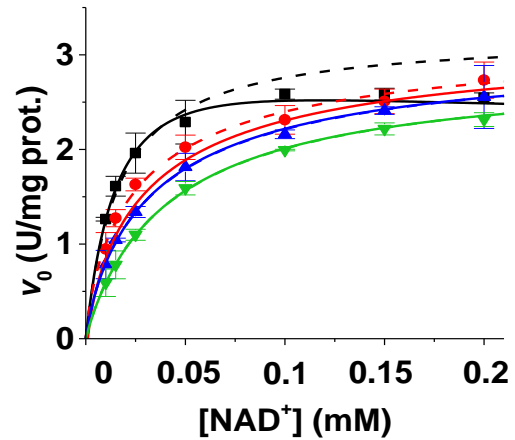


Figura 17. Efecto de la concentración de AMP sobre la inhibición por el sustrato NAD^+ a una concentración subinhibitoria de BAL. A y B, NAD^+ variable con BAL 100 μM y AMP \blacksquare 0, \bullet 0.5, \blacktriangle 1.0 o \blacktriangledown 1.5 mM. A, gráfico completo; B, acercamiento al gráfico completo. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente; las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores. Los datos en ausencia de AMP se ajustaron a la **Ecuación 6** y en presencia de AMP a la **Ecuación 8**. Las líneas continuas son el resultado del ajuste individual a las **Ecuaciones 6 u 8**, las líneas con guiones muestran el comportamiento teórico de la enzima si no existiera inhibición por sustrato, y se obtienen en simulaciones usando la **Ecuación 1** y los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos experimentales a las **Ecuaciones 6 u 8**.

Tabla IX. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de AMP sobre la inhibición por el sustrato NAD⁺ a una concentración subinhibitoria de BAL.

Los valores de los parámetros se estimaron a partir del ajuste individual con las **Ecuaciones 6 y 8** de los datos mostrados en la **Figura 17**.

AMP (mM)	0	0.5	1.0	1.5
V_{\max} (U/mg prot.)	3.2 ± 0.3	3.3 ± 0.1	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1
$V_{\max i}$ (U/mg prot.)	2.2 ± 0.1	—	—	—
β	0.7 ± 0.0	—	—	—
$K_m(S_{0.5})^{NAD^+}$ (μ M)	16.4 ± 3.8	27.4 ± 3.2	35.4 ± 2.6	42.7 ± 3.5
$K_{is}^{NAD^+}$ (mM)	0.1 ± 0.0	169.7 ± 78.9	131.9 ± 37.3	149.4 ± 17.9
n_H	—	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.1

VI.2.4. Inhibición por BAL

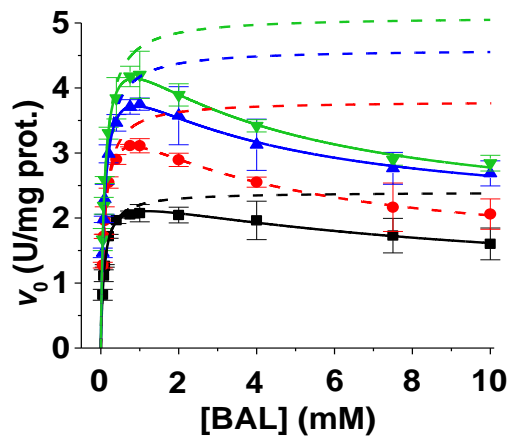
La inhibición por el sustrato aldehído parece ser una generalidad de las enzimas ALDH y la SoBADH no fue la excepción (**Figura 18**). En la **Figura 19** se muestran los regráficos con los que posteriormente se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos de la inhibición por BAL (**Tabla X**).

El valor de la K_{IS}^{BAL} disminuye a medida que aumenta la concentración de NAD⁺, lo que indica que a altas concentraciones del nucleótido se aumentan los niveles de estado

estacionario de la especie de la enzima a la que se une el aldehído como inhibidor. Asumiendo que el mecanismo de la SoBADH es Bi Bi secuencial en estado estacionario, este resultado descarta el que la inhibición por BAL se deba a su unión a la enzima libre en competencia con NAD^+ y que la ruta en la que el NAD^+ se una a la enzima después de BAL sea más lenta que la ruta en la que NAD^+ sea el primer sustrato en unirse a la enzima. Si este fuese el caso, aumentos en la concentración de NAD^+ disminuirían la inhibición por sustrato de BAL. Pero si asumimos que el mecanismo es ordenado tanto en la unión de los sustratos como en la liberación de los productos, siendo el último producto en liberarse el NADH y que BAL puede unirse al complejo E-NADH como se une al complejo E- NAD^+ , un aumento en la concentración de NAD^+ lleva a un aumento en los niveles de estado estacionario del complejo E-NADH, lo que explicaría por qué se favorece la inhibición por BAL (**Esquema 5**). Este mecanismo de inhibición también es consistente con el patrón incompetitivo de la inhibición por BAL frente a NAD^+ cuando los ensayos se hacen a concentraciones subinhibitorias del nucleótido. (**Figura 20**).

El amplio intervalo de concentraciones de BAL que se utilizó en estos experimentos permitió observar que la inhibición por el aldehído es parcial. Este resultado puede explicarse como se había propuesto previamente para otras enzimas ALDH: que el complejo no productivo E-NADH-BAL no es un complejo sin salida, sino que puede liberar el NADH, de manera que se establece una ruta alterna de liberación de producto dando así lugar a inhibición parcial por el aldehído (**Esquema 5**; Dickinson, 1986; Vojtěchová *et al.*, 1997).

A



B

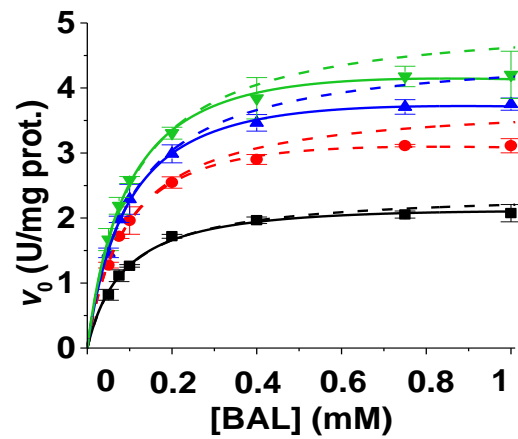


Figura 18. Efecto de la concentración de NAD^+ subinhibitorio sobre la inhibición por el sustrato BAL. A y B, BAL variable con NAD^+ \blacksquare 10 \bullet 25, \blacktriangle 50 o \blacktriangledown 100 μM . A, gráfico completo; B, acercamiento al gráfico completo. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente; las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores. Las líneas continuas son el resultado del ajuste individual a la **Ecuación 6**, las líneas con guiones muestran el comportamiento teórico de la enzima si no existiera inhibición por sustrato, y se obtienen en simulaciones usando la **Ecuación 1** y los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la **Ecuación 6**.

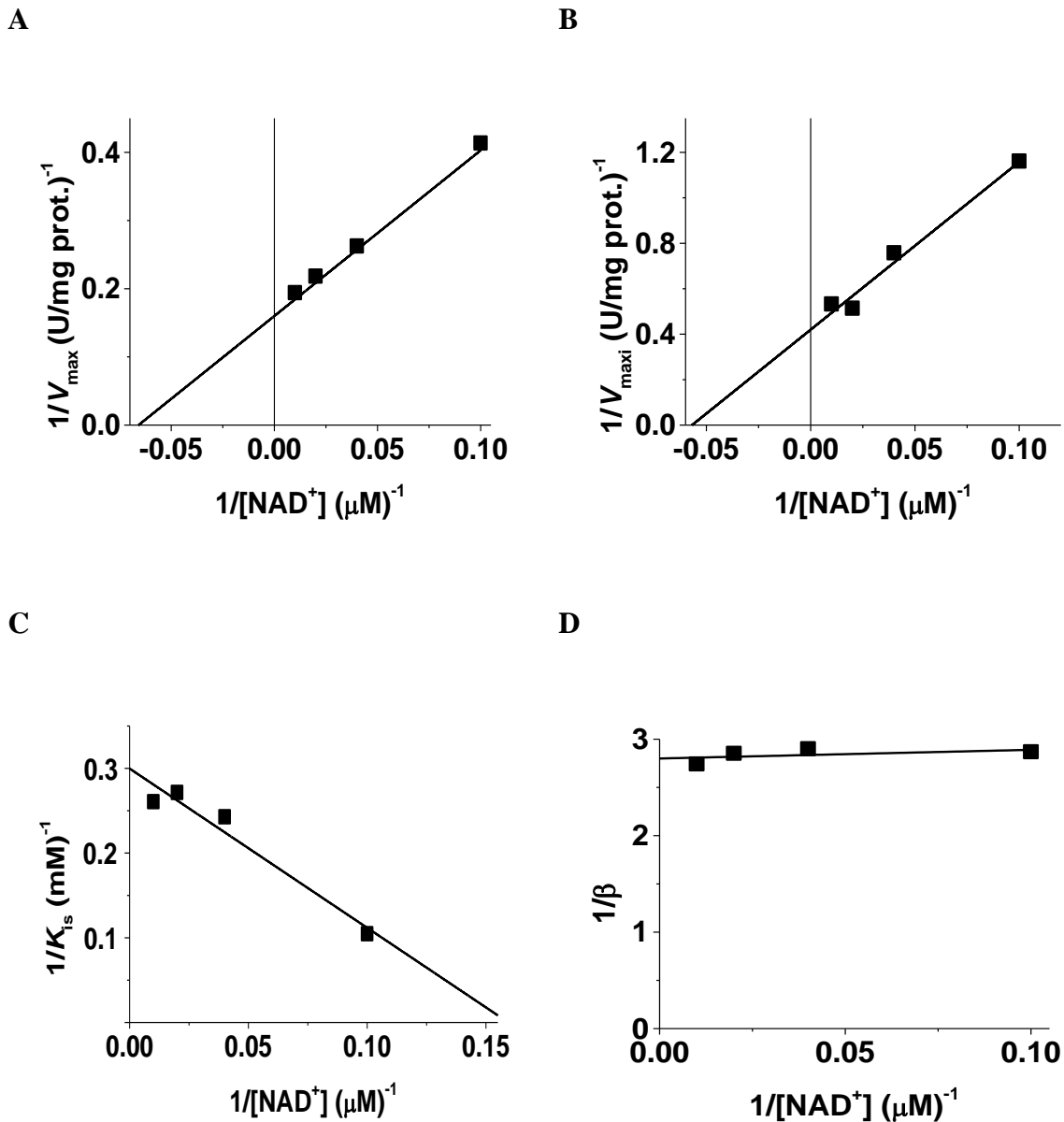


Figura 19. Regráficos de los parámetros aparentes de la saturación por BAL con NAD^+ fijo-variable y subinhibitorio. Regráficos de **A**, V_{\max} ; **B**, $V_{\max i}$; **C**, K_{is} y **D**, β con respecto a la concentración de NAD^+ . Los parámetros aparentes se obtuvieron a partir del ajuste individual a la **Ecuación 6** de los datos mostrados en la **Figura 18**.

Tabla X. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de NAD⁺ subinhibitorio sobre la inhibición por el sustrato BAL. Los valores de los parámetros se estimaron a partir de regráficos de los parámetros aparentes mostrados en la **Figura 19** que se estimaron con el ajuste individual a la **Ecuación 6** de los datos mostrados en la **Figura 18**.

V_{\max} (U/mg prot.)	5.8 ± 0.1
$V_{\max i}$ (U/mg prot.)	2.3 ± 0.3
β	0.35 ± 0.05
$K_m^{\text{NAD}^+}$ (μM)	14.0 ± 0.5
K_{is}^{BAL} (μM)	$3,344 \pm 606$

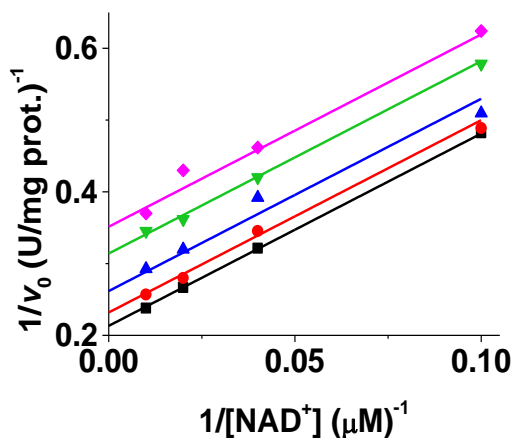
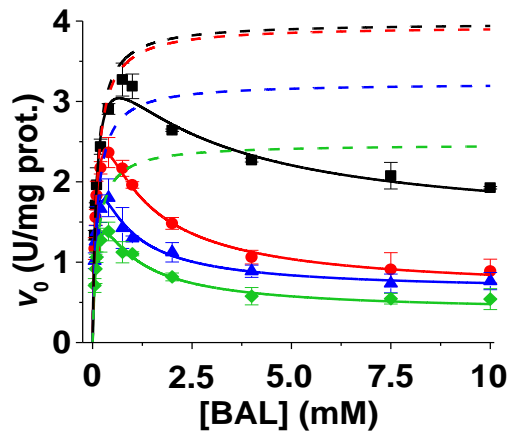


Figura 20. Patrón de inhibición por BAL a nivel inhibitorio frente a NAD⁺ a concentraciones subinhibitorias. Las concentraciones utilizadas de BAL fueron \blacksquare 1, \bullet 2, \blacktriangle 4, \blacktriangledown 7.5 o \blacklozenge 10 mM. Las líneas trazadas son las resultantes del ajuste global a la **Ecuación 4**.

VI.2.5. Inhibición por BAL en presencia de NADH

En la sección anterior se describió que el BAL produce inhibición por sustrato parcial en la enzima SoBADH. El mecanismo por el cual podría ocurrir esto consiste en la formación de un complejo E-NADH-BAL (**Esquema 5**; Dickinson, 1986; Vojtěchová *et al.*, 1997). Para probar esta hipótesis se saturó a la SoBADH con BAL en presencia de diferentes concentraciones de NADH (**Figura 21**). Los parámetros cinéticos se obtuvieron con los regráficos de la **Figura 22** y se reportan en la **Tabla XI**. Los resultados confirmaron la hipótesis anterior puesto que el NADH favorece la inhibición por BAL. Además, se observó que el NADH sigue comportándose como un inhibidor mixto frente a BAL cuando se observa la inhibición por el aldehído (**Figura 23**). Al comparar los resultados incluidos en las **Tablas II y XI** se encontró que el NADH en realidad es un mejor inhibidor de lo que se observa cuando sólo se consideran concentraciones de BAL subinhibitorias.

A



B

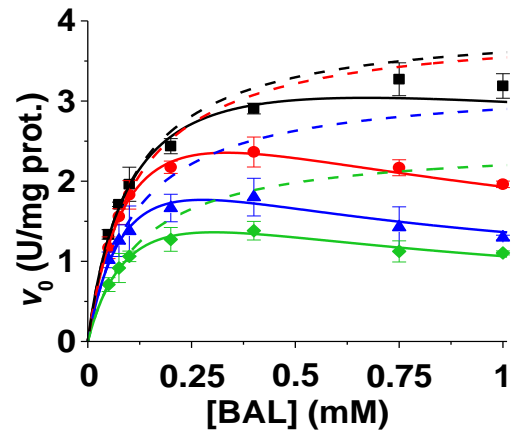
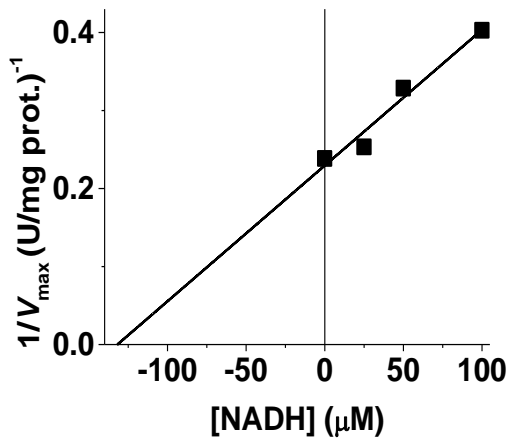
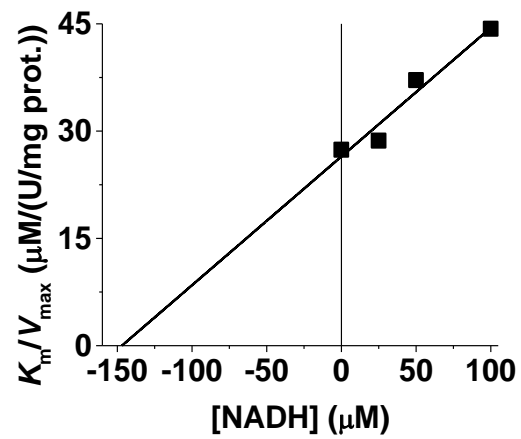


Figura 21. Efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato BAL a una concentración subinhibitoria de NAD^+ . A y B, BAL variable con NAD^+ 25 μM y NADH \blacksquare 0, \bullet 25, \blacktriangle 50 o \blacktriangledown 100 μM . A, gráfico completo; B, acercamiento al gráfico completo. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente; las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores. Las líneas continuas son el resultado del ajuste individual a la **Ecuación 6**, las líneas con guiones muestran el comportamiento teórico de la enzima si no existiera inhibición por sustrato, y se obtienen en simulaciones usando la **Ecuación 1** y los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la **Ecuación 6**.

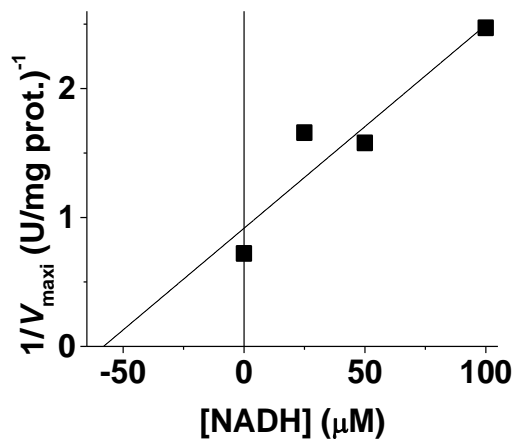
A



B



C



D

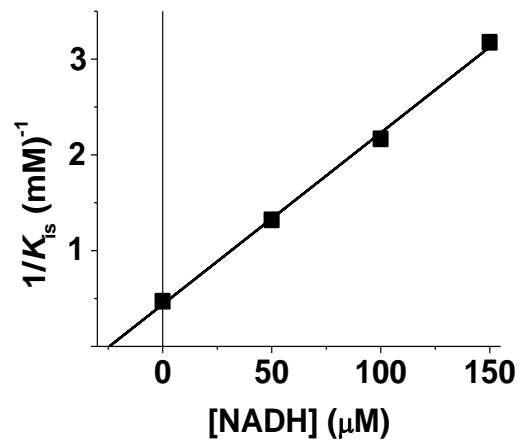


Figura 22. Regráficos de los parámetros aparentes de la saturación por BAL con NAD^+ $25 \mu\text{M}$ en presencia de NADH. Regráficos de **A**, V_{\max} ; **B**, V_{\max}/K_m ; **C**, $V_{\max i}$ y **D**, K_{is} con respecto a la concentración de NADH. Los parámetros aparentes se obtuvieron a partir del ajuste individual a la **Ecuación 6** de los datos mostrados en la **Figura 21**.

Tabla XI. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato BAL a una concentración subinhibitoria de NAD⁺.

Los valores de los parámetros se estimaron a partir de regráficos de los parámetros aparentes mostrados en la **Figura 22** que se estimaron con el ajuste individual a la **Ecuación 6** de los datos mostrados en la **Figura 21**.

V_{\max} (U/mg prot.)	4.3 ± 0.7
$V_{\max i}$ (U/mg prot.)	1.1 ± 0.5
β	0.29 ± 0.06
K_m^{BAL} (μM)	115 ± 3
K_{is}^{BAL} (μM)	$2,277 \pm 19$
K_{ic}^{NADH} (μM)	146 ± 12
K_{iu}^{NADH} (μM)	135 ± 24

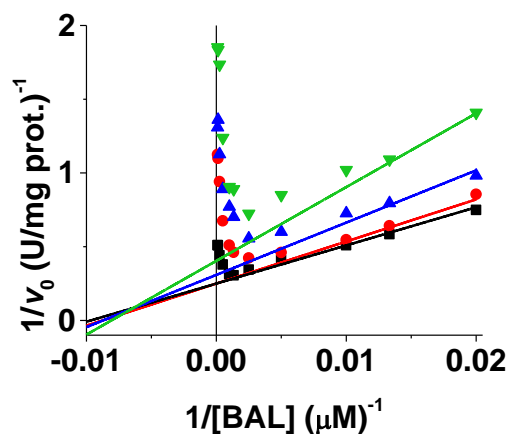
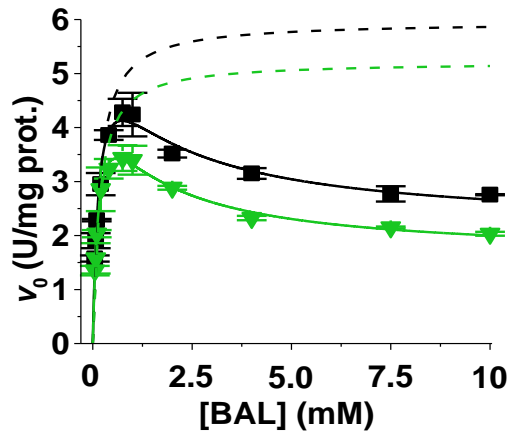


Figura 23. Patrón de inhibición por NADH frente a BAL con NAD⁺ subinhibitorio. BAL variable con NAD⁺ 25 μM y NADH = 0, ● 25, ▲ 50 o ▼ 100 μM. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente y las líneas trazadas muestran el comportamiento teórico de la enzima si no existiera inhibición por sustrato, y se obtienen en simulaciones usando la **Ecuación 1** y los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la **Ecuación 6**.

Para explorar el efecto de altas concentraciones de NAD⁺ sobre la inhibición por BAL en ausencia y presencia de NADH se realizaron los experimentos que se muestran en la **Figura 24**. Bajo estas condiciones el NADH también favorece la inhibición por BAL.

A



B

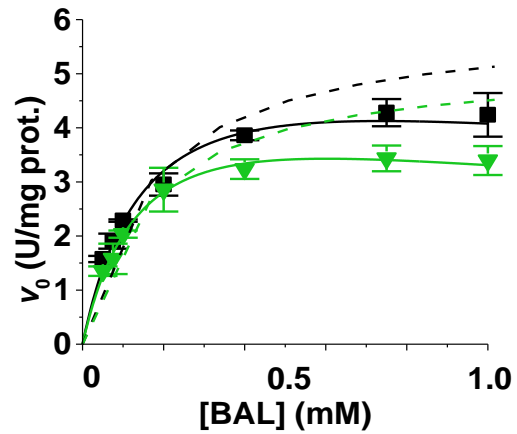


Figura 24. Efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato BAL a una concentración inhibitoria de NAD^+ . **A** y **B**, BAL variable con NAD^+ 1 mM y NADH \blacksquare 0 o \blacktriangledown 150 μM . **A**, gráfico completo; **B**, acercamiento al gráfico completo. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente; las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores. Las líneas continuas son el resultado del ajuste individual a la **Ecuación 6**, las líneas con guiones muestran el comportamiento teórico de la enzima si no existiera inhibición por sustrato, y se obtienen en simulaciones usando la **Ecuación 1** y los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la **Ecuación 6**.

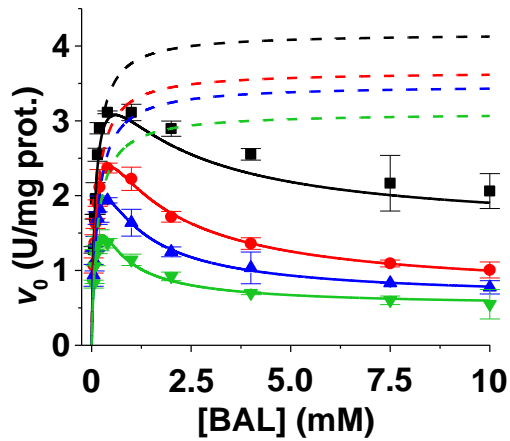
Tabla XII. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de NADH sobre la inhibición por el sustrato BAL a una concentración inhibitoria de NAD⁺. Los valores de los parámetros se estimaron a partir del ajuste individual con la **Ecuación 6** de los datos mostrados en la **Figura 24**.

NADH (μM)	0	150
V_{max} (U/mg prot.)	5.9 ± 0.6	5.2 ± 0.4
V_{maxi} (U/mg prot.)	2.1 ± 0.3	1.6 ± 0.1
β	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0
$K_{\text{m}}^{\text{BAL}}$ (μM)	164 ± 34	159 ± 23
$K_{\text{is}}^{\text{BAL}}$ (μM)	$1,580 \pm 869$	$1,271 \pm 381$

VI.2.6. Inhibición por BAL en presencia de AMP

Para continuar con la determinación del mecanismo por el que ocurre la inhibición por el sustrato aldehído, se evaluó la inhibición por BAL en presencia de AMP (**Figura 25**). Los parámetros cinéticos se obtuvieron con los regráficos de la **Figura 26** y se reportan en la **Tabla XIII**. Se observó que el AMP sigue comportándose como un inhibidor mixto frente a BAL cuando se observa la inhibición por el aldehído (**Figura 27**). La **Figura 26** muestra que a medida que la concentración de AMP aumenta, el valor de $K_{\text{is}}^{\text{BAL}}$ disminuye, por lo tanto, el AMP favorece la inhibición por el aldehído. Esto sugiere que el BAL se une al complejo E-AMP, lo que por sí solo ya produce inhibición por BAL, que se sumaría a la inhibición producida por la unión del BAL al complejo E-NADH que se forma durante el curso normal de la reacción.

A



B

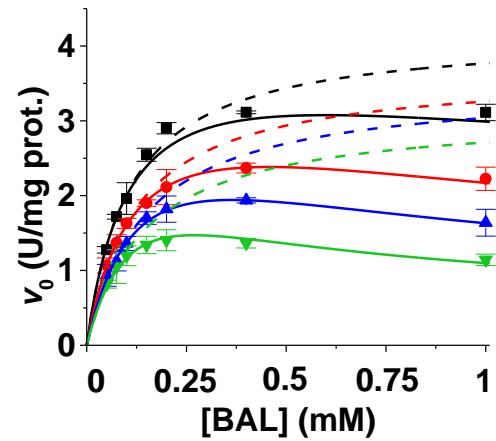


Figura 25. Efecto de la concentración de AMP sobre la inhibición por el sustrato BAL a una concentración subinhibitoria de NAD^+ . A y B, BAL variable con NAD^+ 25 μM y AMP \square 0, \bullet 0.5, \blacktriangle 1.0 o \blacktriangledown 1.5 mM. A, gráfico completo; B, acercamiento al gráfico completo. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente; las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores. Las líneas continuas son el resultado del ajuste individual a la **Ecuación 6**, las líneas con guiones muestran el comportamiento teórico de la enzima si no existiera inhibición por sustrato, y se obtienen en simulaciones usando la **Ecuación 1** y los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la **Ecuación 6**.

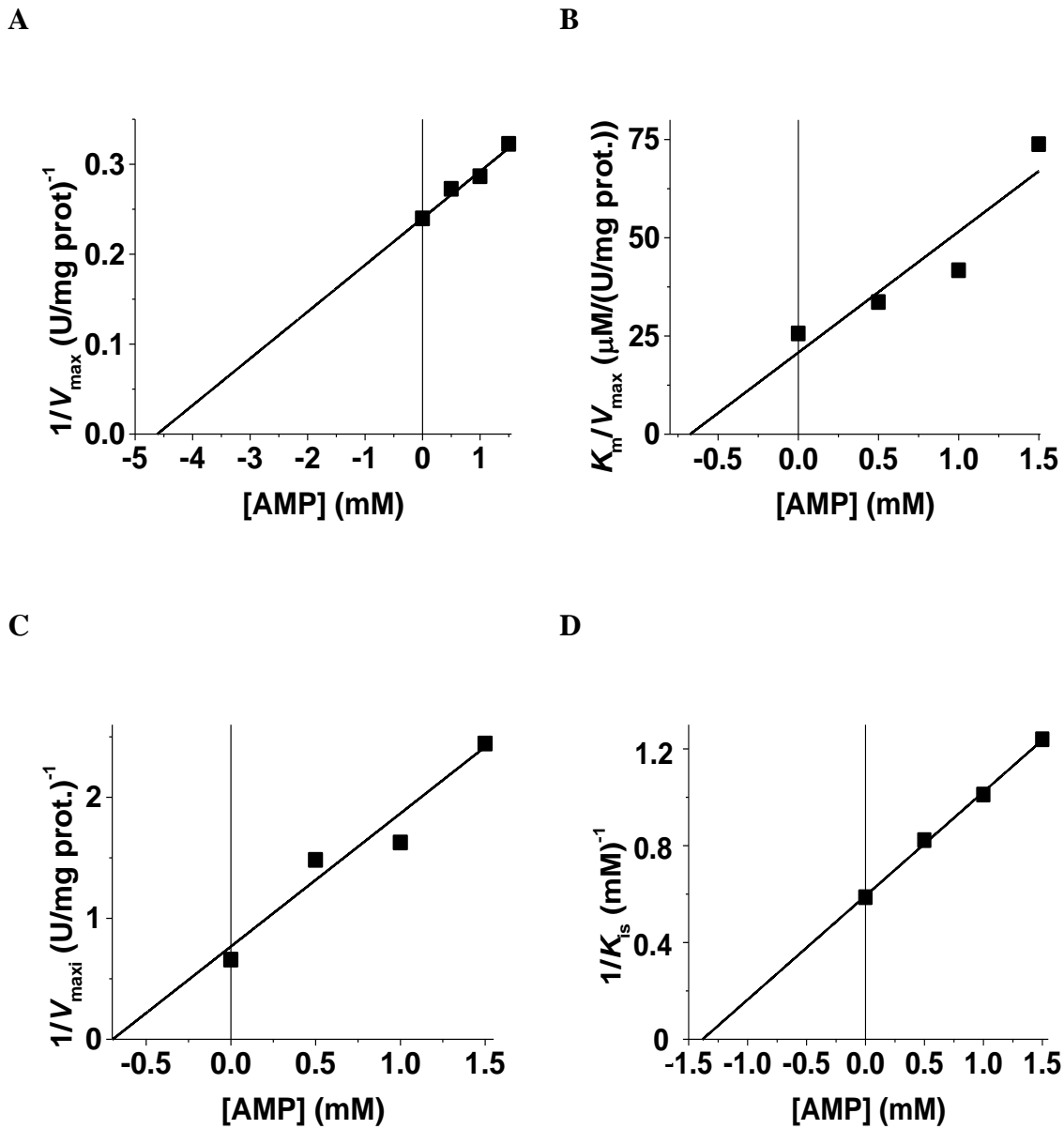


Figura 26. Regráficos de los parámetros aparentes de la saturación por BAL con NAD^+ subinhibitorio en presencia de AMP. Regráficos de **A**, V_{\max} ; **B**, V_{\max}/K_m , **C**, $V_{\max i}$ y **D**, K_{is} con respecto a la concentración de AMP. Los parámetros aparentes se obtuvieron a partir del ajuste individual a la **Ecuación 6** de los datos mostrados en la **Figura 25**.

Tabla XIII. Parámetros cinéticos estimados del efecto de la concentración de AMP sobre la inhibición por el sustrato BAL a una concentración subinhibitoria de NAD⁺.

Los valores de los parámetros se estimaron a partir de regráficos de los parámetros aparentes mostrados en la **Figura 26** que se estimaron con el ajuste individual a la **Ecuación 6** de los datos mostrados en la **Figura 25**.

V_{\max} (U/mg prot.)	4.1 ± 0.2
$V_{\max i}$ (U/mg prot.)	1.4 ± 0.1
β	0.3 ± 0.0
K_m^{BAL} (μM)	110 ± 26
K_{is}^{BAL} (μM)	$1,683 \pm 85$
K_{ic}^{AMP} (mM)	4.8 ± 0.8
K_{iu}^{AMP} (mM)	0.7 ± 0.1

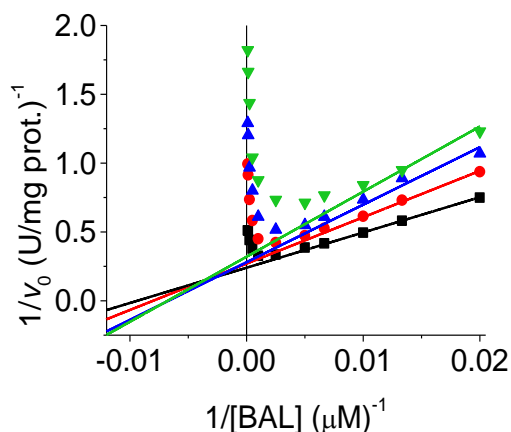


Figura 27. Patrón de inhibición por AMP frente a BAL con NAD⁺ subinhibitorio. Las concentraciones de AMP utilizadas fueron \blacksquare 0, \bullet 0.5, \blacktriangle 1.0 o \blacktriangledown 1.5 mM con NAD⁺ 25 μ M. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente y las líneas trazadas muestran el comportamiento teórico de la enzima si no existiera inhibición por sustrato, y se obtienen en simulaciones usando la **Ecuación 1** y los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la **Ecuación 6**.

VI.3. Reacción NADP⁺-dependiente

VI.3.1. Patrones de velocidad inicial de la reacción NADP⁺-dependiente

Los estudios reportados con NADP(H) son limitados en las enzimas ALDH hidrolíticas debido a que son pocas las enzimas que pueden unirlos. Previamente, se había predicho que el NADP⁺ tendría dificultades para unirse a la SoBADH debido al residuo Glu que se encuentra en la posición 185 que con base en su tamaño y carga no permite que se una el NADP⁺ con facilidad y a que este residuo tiene poca flexibilidad conformacional por la

existencia de un residuo de Leu en la posición 214 (**Figura 1**; [González-Segura et al., 2015](#)). Los patrones de velocidad inicial obtenidos para la reacción NADP⁺-dependiente (**Figura 28**) son cualitativamente iguales a los obtenidos para la reacción NAD⁺-dependiente (**Figura 4**), por lo que se asumió que en esta reacción el NADP⁺ es el primer sustrato, como ya se había demostrado para el NAD⁺. Los parámetros cinéticos estimados a partir de estos datos se reportan en el **Tabla XIV**.

El valor de la k_{cat} estimado para la reacción NADP⁺-dependiente fue menor a la estimada en la reacción NAD⁺-dependiente (3.9 respecto a 4.9 s⁻¹; **Tablas I y XIV**). El valor de $K_{ia}^{NADP^+}$ que se estimó fue unas 47 veces más alto que el estimado para el NAD⁺ (620 ± 73 respecto a 13.3 ± 1.6 μM; **Tablas I y XIV**) lo que indica que, respecto a las condiciones *in vivo*, la concentración del NADP⁺ dentro del estroma de espinaca (0.6 ± 0.1 mM; [Heineke et al., 1991](#)) sería limitante mientras que la concentración de NAD⁺ sería óptima (0.2 ± 0.0 mM; [Heineke et al., 1991](#)). Además, la eficiencia catalítica mostró que el NADP⁺ es unas 50 veces peor sustrato que el NAD⁺ (9.5 × 10³ respecto a 4.5 × 10⁵ M⁻¹ s⁻¹; **Tablas I y XIV**).

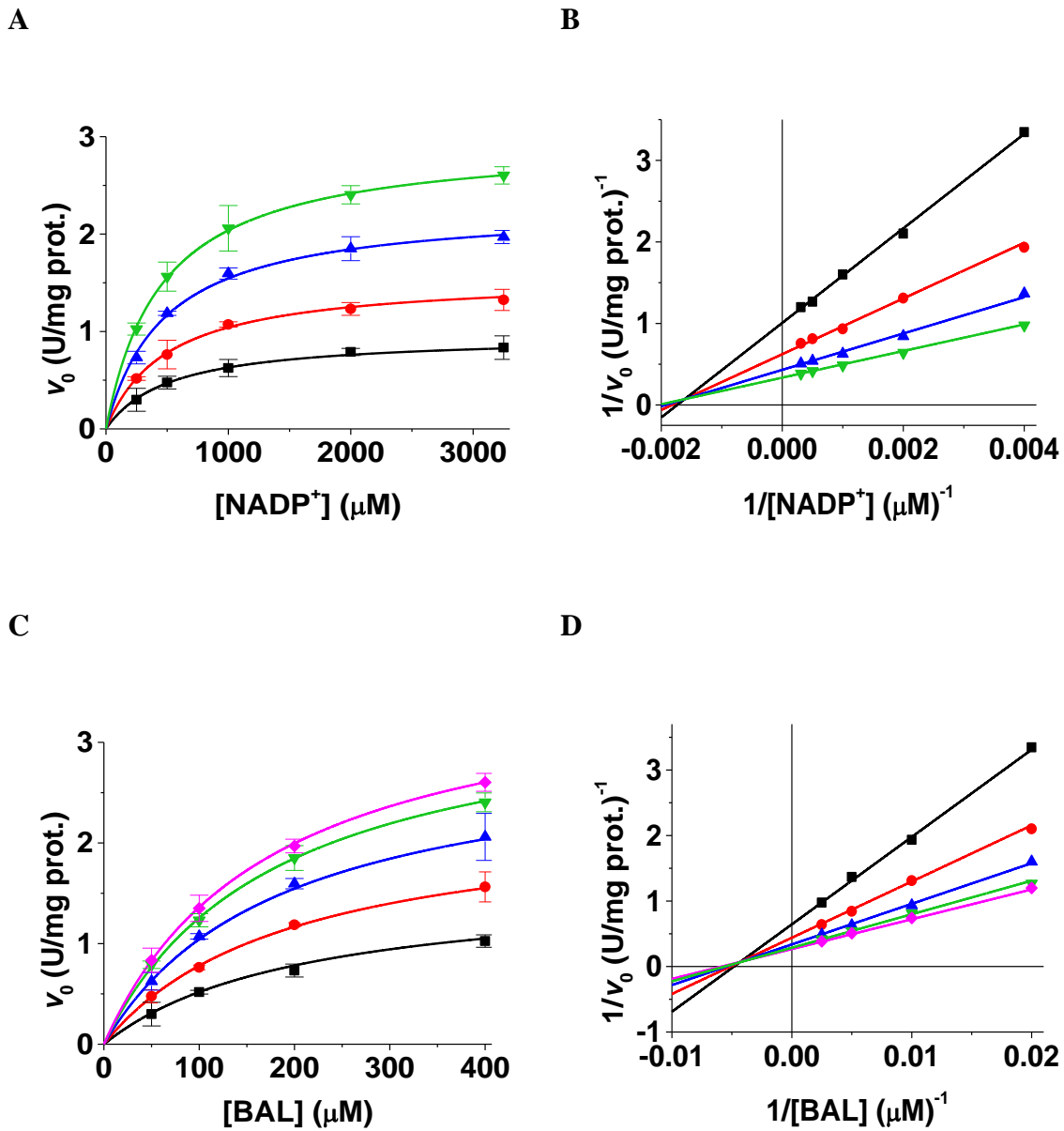


Figura 28. Patrones de velocidad inicial de la reacción NADP⁺-dependiente con BAL. **A** y **B**, gráficos directo y de dobles recíprocos cuando NADP⁺ es el sustrato variable y BAL el fijo-variable (■ 50, ● 100, ▲ 200 o ▼ 400). **C** y **D**, gráficos directo y de dobles recíprocos cuando BAL es el sustrato variable y NADP⁺ el fijo-variable (■ 0.25, ● 0.5, ▲ 1.0, ▼ 2.0 o ◆ 3.25 mM). Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente; las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores y las líneas trazadas son las resultantes del ajuste global a la **Ecuación 2**.

Tabla XIV. Parámetros cinéticos de los patrones de velocidad inicial con NADP⁺ y BAL. Los valores de los parámetros se estimaron mediante el ajuste global de los datos experimentales mostrados en la **Figura 28** con la **Ecuación 2**.

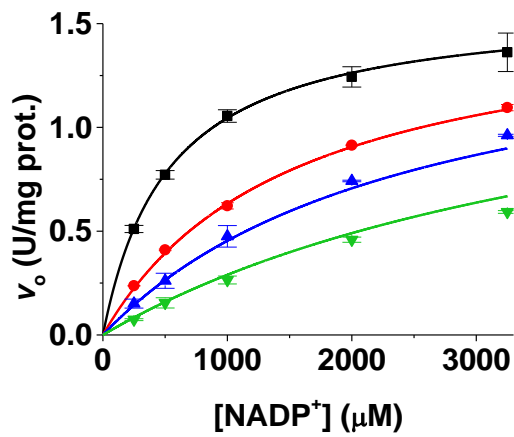
Sustrato A	NADP ⁺	BAL
Sustrato B	BAL	NADP ⁺
V_{\max} (U/mg prot.)	4.2 ± 0.5	4.2 ± 0.5
K_{ia} (μM)	620 ± 73	233 ± 33
K_{mA} (μM)	409 ± 38	167 ± 9
K_{mB} (μM)	167 ± 9	409 ± 38
k_{cat} (s^{-1})	3.9	3.9
k_{cat}/K_{mA} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	9.5×10^3	2.3×10^4
k_{cat}/K_{mB} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	2.3×10^4	9.5×10^3
$k_{\text{cat}}/K_{ia} K_{mB}$ ($\text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$)	3.7×10^7	4.1×10^7

VI.3.2. Inhibición por NADH en la reacción NADP⁺-dependiente

Nos interesó estudiar si el NADH frente al NADP⁺ también exhibía la atípica inhibición mixta que habíamos observado frente al NAD⁺ (**Figuras 5B y D**). Sin embargo, e inesperadamente, el NADH fue un inhibidor competitivo frente al NADP⁺ (**Figura 29; Tabla**

XV). La posible razón de esta diferencia estriba en la mucha menor afinidad de la enzima por el NADP⁺ que por el NAD⁺, como se discutirá más adelante en la sección **VI.5. Unión al equilibrio de los nucleótidos a la SoBADH**. No pudimos estudiar la inhibición por el producto NADPH, ya que no encontramos inhibición tanto en la reacción NAD⁺-dependiente como en la NADP⁺-dependiente, a pesar de que se ensayaron concentraciones de hasta 0.8 mM que es la concentración máxima que se puede utilizar con el método empleado. Esto indica que la afinidad de la enzima por el NADPH es también muy baja, lo que es fisiológicamente relevante para evitar la inhibición de la SoBADH que ocurriría de no ser este el caso, dadas las altas concentraciones de NADPH que se producen en el cloroplasto durante el periodo de luz (0.29 ± 0.03 mM; Heineke *et al.*, 1991), que es cuando ocurre la síntesis de GB en la que participa esta enzima.

A



B

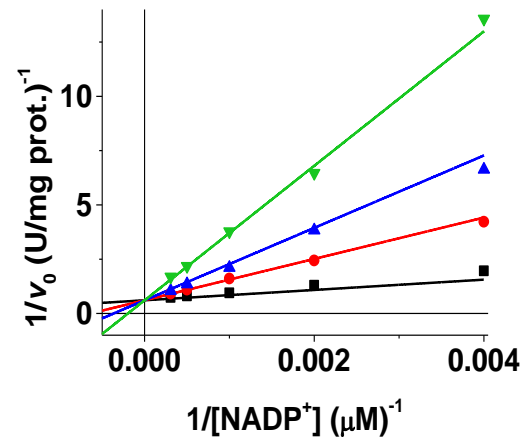


Figura 29. Patrón de inhibición por NADH frente a NADP⁺ con BAL. A y B, NADP⁺ variable con BAL 100 μM y NADH = 0, ● 5, ▲ 10 o ▼ 20 μM. A, gráfico directo; B, gráfico de dobles recíprocos. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente; las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores y las líneas trazadas son las resultantes del ajuste global a la **Ecuación 3**.

Tabla XV. Parámetros cinéticos de la inhibición por NADH frente a NADP⁺ con BAL. Los valores de los parámetros se estimaron mediante el ajuste global de los datos experimentales mostrados en la **Figura 29** con la **Ecuación 3**.

V_{\max} (U/mg prot.)	1.6 ± 0.0
$K_m^{\text{NADP}^+}$ (μM)	526 ± 40
K_{ic}^{NADH} (μM)	2.6 ± 0.2

VI.4. Saturación por NADH en las reacciones NAD(P)⁺-dependientes

Tratando de obtener más datos que nos permitieran entender las diferencias en el tipo de inhibición por NADH frente a NAD⁺ y NADP⁺, se realizó la saturación de la *SoBADH* por NADH en las reacciones NAD⁺ y NADP⁺-dependientes, partiendo de una velocidad similar (valores de k_{cat} similares) en ambas reacciones en ausencia de inhibidor debido a que la I_{50} aumenta al aumentar el grado de saturación por el sustrato cuando la inhibición es competitiva o mixta (**Figura 30**).

En las condiciones de estos ensayos (BAL 100 μM con NAD⁺ 10 μM o NADP⁺ 3,250 μM) el valor de I_{50} fue $52.0 \pm 2.3 \mu\text{M}$ en la reacción NAD⁺-dependiente, y $20.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$ en la NADP⁺-dependiente. A pesar de que se utilizó una concentración de NADP⁺ de unas 5 veces su K_{ia} , NADP⁺ mostró que es un peor competidor respecto a NADH que el NAD⁺ que se utilizó a una concentración ligeramente por debajo de su K_{ia} . Lo anterior es congruente con los resultados de las constantes de disociación que mostraron que la $K_d^{\text{NADP}^+}$ es más de 200

veces más alta que la K_d^{NADH} , mientras que la $K_d^{\text{NAD}^+}$ es muy similar a la del nucleótido reducido (ver **VI.5. Unión al equilibrio de los nucleótidos a la SoBADH**).

Además, en los gráficos de Dixon de la **Figura 30**, los valores de $1/v_0$ respecto a la concentración de NADH se ajustaron a una recta, lo que indica que el NADH es un inhibidor total en ambas reacciones; es decir, la saturación del NADH provoca la inhibición total de la enzima, confirmando así los resultados obtenidos mediante los patrones de inhibición. Sin embargo, estos experimentos no proporcionaron algún resultado que pudiera relacionarse con las diferencias que existen en la inhibición por NADH en las reacciones NAD^+ - y NADP^+ -dependientes.

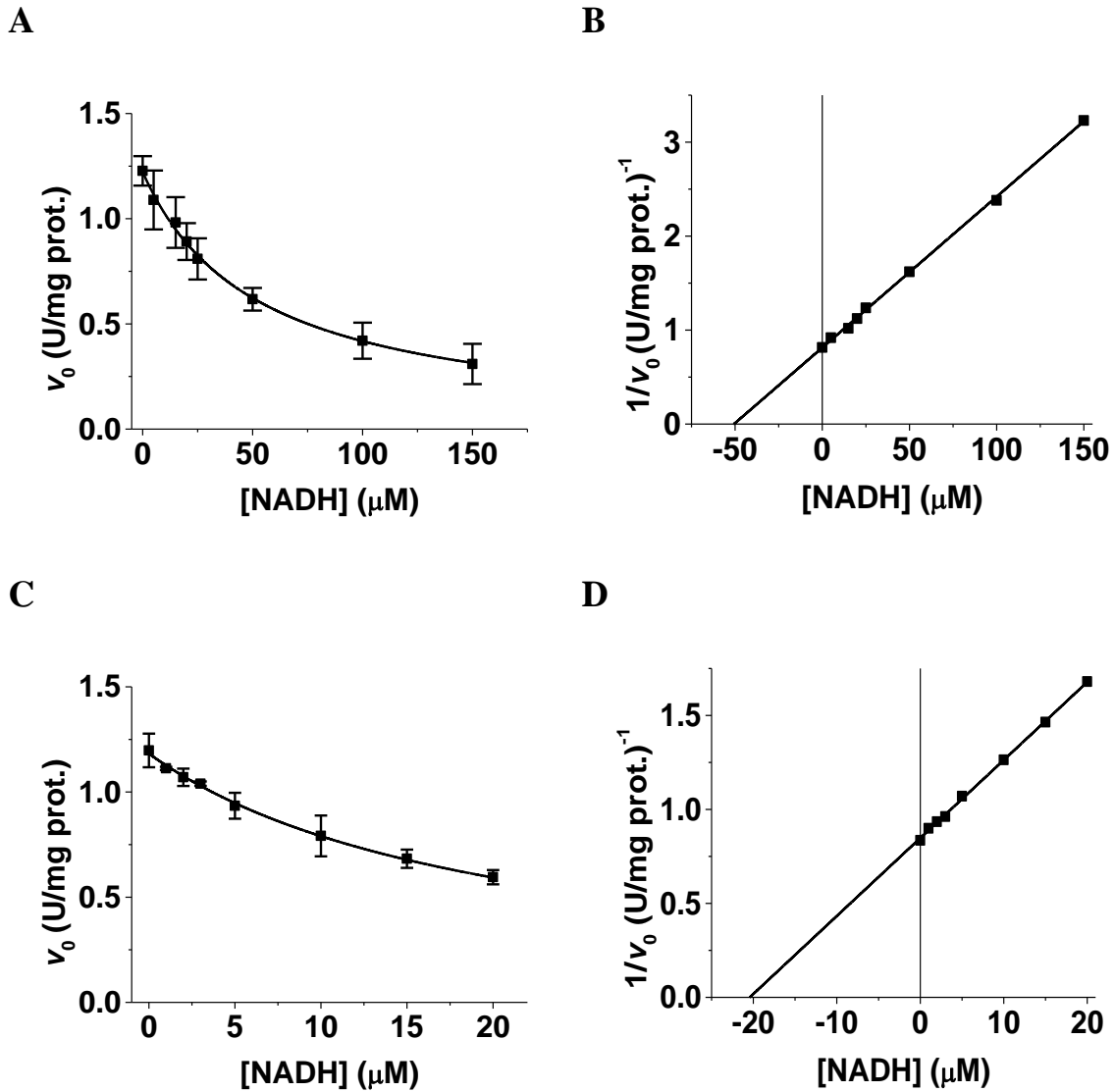


Figura 30. Saturación de la SoBADH por NADH en las reacciones NAD⁺- y NADP⁺- dependientes. A, saturación por NADH con NAD⁺ 10 μM y BAL 100 μM . **B,** gráfico de Dixon para la saturación por NADH con NAD⁺ 10 μM y BAL 100 μM ; **C,** saturación por NADH con NADP⁺ 3,250 μM y BAL 100 μM . **D,** gráfico de Dixon para la saturación por NADH con NADP⁺ 3,250 μM y BAL 100 μM . Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente; las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores y las líneas trazadas son las resultantes del ajuste a la **Ecuación 12**.

VI.5. Unión al equilibrio de los nucleótidos a la SoBADH

VI.5.1. Constantes de disociación por NAD(P)(H) medidas por fluorescencia

Los valores de $K_{ia}^{NAD(P)+}$ y de K_{ic}^{NADH} estimados en este trabajo en los estudios de velocidad inicial y de inhibición por producto podrían ser considerados como constantes de disociación de los nucleótidos de los complejos que forman con la enzima libre. Para confirmar esto, se determinaron los valores de K_d de los complejos SoBADH-NAD(P)(H) titulando a la enzima con los nucleótidos y cuantificando el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la proteína provocado por la unión de los nucleótidos. La SoBADH cuenta con 13 residuos de Trp que se distribuyen por toda la enzima, de los cuales Trp158 y Trp456 interaccionan estrechamente con el nucleótido que se une a la enzima (**Figura 31**).

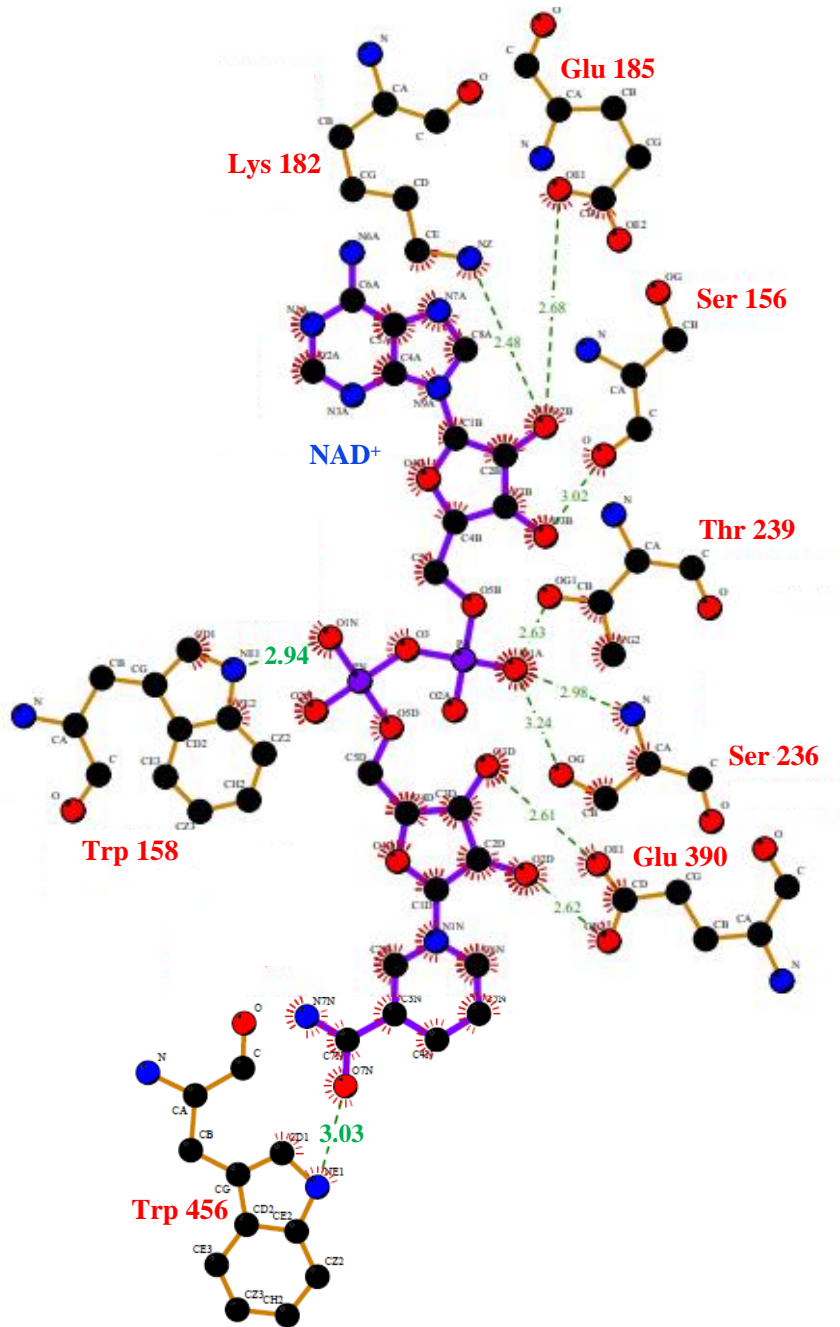


Figura 31. Interacción entre los residuos de Trp de la SoBADH y el nucleótido unido.

En la figura se muestra que los residuos Trp158 y Trp456 interactúan directamente con el nucleótido. En este caso se muestra un modelo de la SoBADH con el NAD⁺ unido (4A0M; figura modificada de PDBsum).

A ninguna de las diferentes concentraciones de nucleótidos usadas se observó un corrimiento de la longitud máxima de emisión, la cual se encontró a 340 nm en todos los casos y que corresponde a la longitud máxima de emisión teórica del Trp (**Figura 31A**). La dependencia hiperbólica del cambio de la fluorescencia intrínseca a 340 nm de la concentración del nucleótido (**Figuras 32 B-D**) nos permitió determinar los siguientes valores de las constantes de disociación: $K_d^{\text{NAD}^+} = 2.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$, $K_d^{\text{NADP}^+} = 709 \pm 62 \mu\text{M}$ y $K_d^{\text{NADH}} = 3.0 \pm 0.3 \mu\text{M}$ (**Figura 32 B-D**). El valor de la $K_d^{\text{NAD}^+}$ obtenida por fluorescencia fue aproximadamente 5 veces menor que el de $K_{ia}^{\text{NAD}^+}$ (13.3 μM ; **Tabla I**), mientras que el valor de $K_d^{\text{NADP}^+}$ coincide con el valor de $K_{ia}^{\text{NADP}^+}$ (620 μM , **Tabla XIV**). Además, el valor más cercano a la K_d^{NADH} determinado por fluorescencia es el de la $K_{ic}^{\text{NADH}} = 2.6 \pm 0.2$, estimado en la reacción NADP⁺-dependiente, en la que el NADH se comportó como inhibidor competitivo frente al NADP⁺. Estos resultados indican que el comportamiento de la enzima en la reacción NADP⁺-dependiente es el esperado Bi Bi ordenado en estado estacionario (**Esquema 3A**) y sugieren que el comportamiento atípico en la reacción NAD⁺-dependiente se debe a la existencia de la inhibición por sustrato en esta reacción, lo cual se discutirá a mayor profundidad en la sección **VII. Discusión General**.

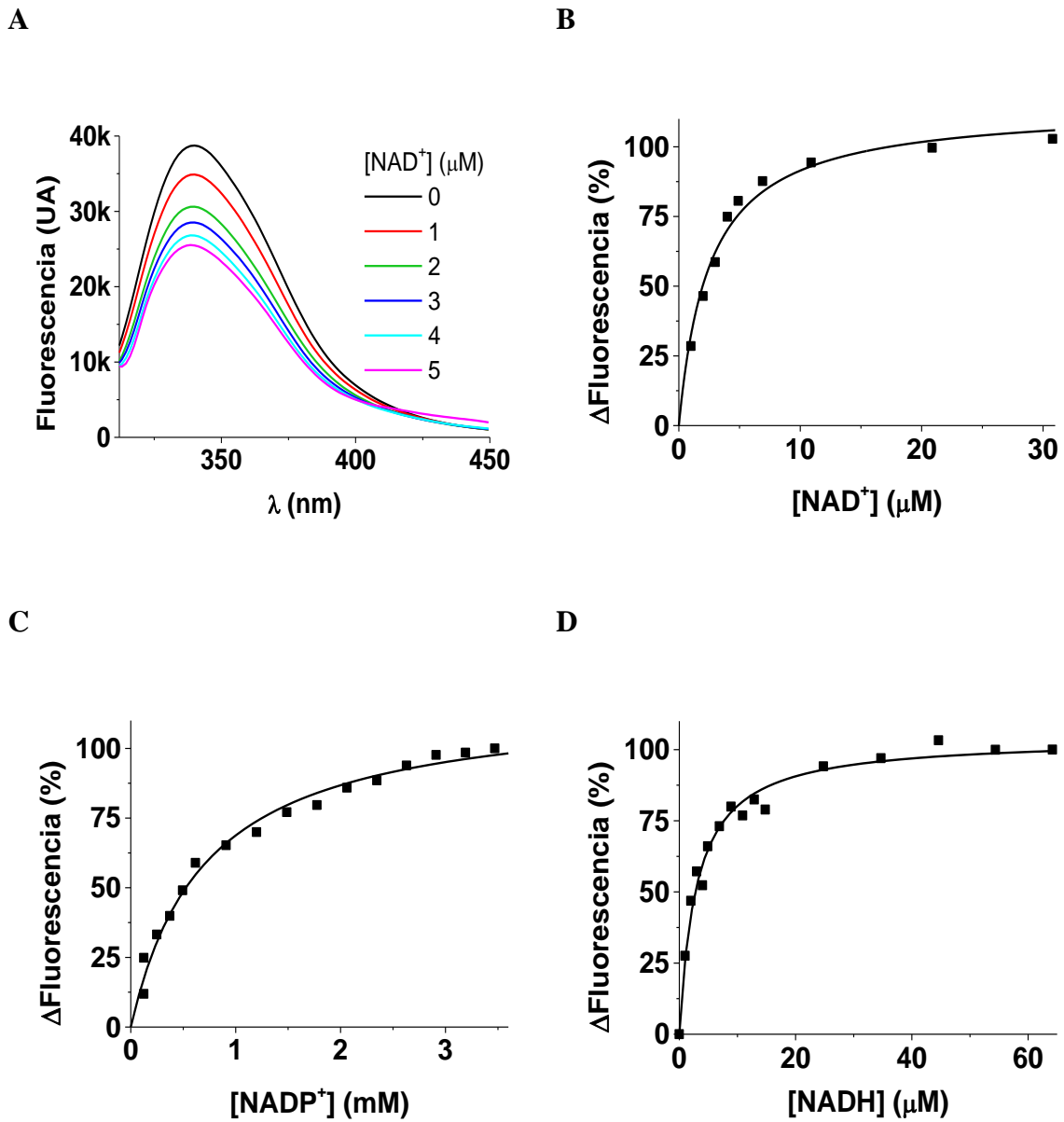


Figura 32. Fluorescencia intrínseca de la SoBADH en presencia de NAD(P)(H). A, figura representativa de los espectros de emisión mostrando el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la proteína a medida que aumenta la concentración del nucleótido en el medio; B, C y D, cambios en la fluorescencia inducidos por la unión del NAD⁺, NADP⁺ y NADH, respectivamente. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente de dos experimentos independientes y las líneas trazadas son las resultantes del ajuste a la **Ecuación 14**.

VI.6. Importancia del estudio de la inhibición por el sustrato aldehído para la correcta estimación de parámetros cinéticos y determinación de mecanismos cinéticos

Un número sorprendentemente elevado de enzimas presentan inhibición por sustrato. Particularmente, en las enzimas ALDH hidrolíticas, la inhibición por el sustrato aldehído tiene una alta incidencia, pero no ha sido caracterizada con detalle en la mayoría de los estudios. Comúnmente se hace la caracterización cinética de una enzima usando concentraciones de sustrato que aparentemente son subinhibitorias, debido a que muchos enzimólogos consideran que la inhibición por sustrato es, en general, un fenómeno sin relevancia que se presenta a concentraciones de sustrato más altas que las que existen *in vivo*. Sin embargo, en el grupo de trabajo, el estudio detallado de la inhibición por sustrato se ha considerado como una herramienta muy informativa para la determinación de mecanismos cinéticos y la estimación correcta de los parámetros cinéticos de las enzimas. Debido a esto, en la presente sección se muestra un resumen de los resultados experimentales y simulaciones que forman parte de un artículo del grupo de trabajo ([Muñoz-Clares y Casanova-Figueroa; 2019](#); ver **Anexo**).

VI.6.1. Resultados experimentales

Con el fin de ejemplificar los errores en la estimación de los parámetros cinéticos V_{\max} , K_m y V_{\max}/K_m que se obtienen al analizar únicamente los datos que aparentemente no muestran inhibición por sustrato, se analizó la saturación de la SoBADH con BAL y APAL (3-aminopropionaldehído). A una concentración de NAD^+ saturante (0.2 mM,

aproximadamente 10 veces su K_m), se obtuvo que ambos sustratos aldehído provocan inhibición parcial (**Figuras 33A, B, E y F; líneas continuas**). Con el ajuste de todos los datos de la saturación se pudo trazar una curva que simula cómo sería la cinética si no existiera la inhibición por sustrato (**Figuras 33A, B, E y F; líneas con puntos**) cuyos valores de V_{max} y K_m son mayores que los obtenidos al ajustar únicamente aquellos datos de la saturación que son ascendentes, es decir, los que aparentemente no muestran inhibición por sustrato (**Figuras 33A, B, E y F; líneas con guiones**).

A pesar de que la inhibición por sustrato parcial es de carácter incompetitivo, es decir, que tanto V_{max} como K_m son afectadas por el mismo factor ($apV_{max} = V_{max}/(1+K_m/K_{IS})$ y $apK_m = K_m/(1+K_m/K_{IS})$), se obtuvo que al considerar únicamente los datos que aparentemente no muestran inhibición por sustrato se subestima más el parámetro K_m que V_{max} (**Figuras 33C y G**). Esto es debido a que el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten causa una sobreestimación de la velocidad a bajas concentraciones de sustrato (**Figuras 33D y H**).

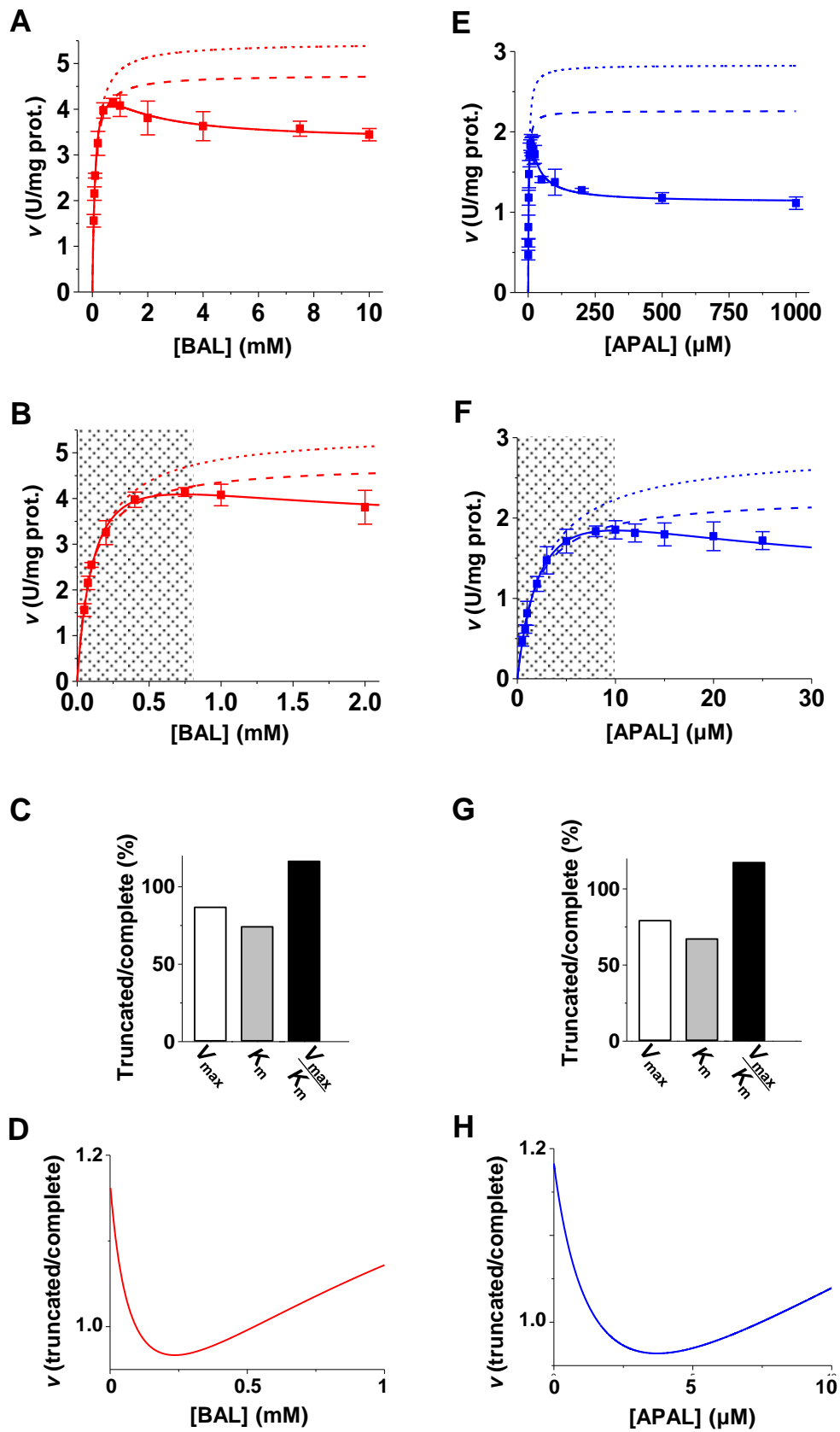


Figura 33. Pie de figura en la siguiente página.

Figura 33. Inhibición por el sustrato aldehído en la SoBADH a 0.2 mM de NAD⁺. A-D, saturación por BAL; **E-H,** saturación por APAL. **A** y **E**, gráficos completos; **B** y **F**, acercamientos a los gráficos completos. Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente; las barras corresponden a la desviación estándar de esos valores. Las líneas continuas son el resultado del ajuste individual a la **Ecuación 6** de todos los puntos de la saturación; las líneas con puntos muestran el comportamiento teórico de la enzima si no existiera inhibición por sustrato, y se obtienen en simulaciones usando la **Ecuación 1** y los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la **Ecuación 6**; las líneas con guiones son el resultado del ajuste individual a la **Ecuación 1** de únicamente los puntos que aparentemente no presentan inhibición por sustrato. **C** y **G**, porcentaje del valor de los parámetros cinéticos estimados utilizando únicamente los datos que aparentemente no presentan inhibición por sustrato (truncated) con respecto a los obtenidos con todos los puntos de la saturación (complete). **D** y **H**, cociente de la velocidad estimada a bajas concentraciones de sustrato a partir de los datos que aparentemente no presentan inhibición por sustrato (truncated) con respecto a los obtenidos con todos los puntos de la saturación (complete).

Los errores en la estimación de los parámetros V_{max} , K_m y V_{max}/K_m también se presentan cuando el inhibidor NADH es añadido al medio de ensayo (**Figura 34A**) y estos tienen gran impacto sobre el patrón de inhibición NADH frente al aldehído a una concentración de NAD⁺ constante. De manera interesante, si se consideraran para el análisis únicamente los datos que sin un análisis de inhibición previo parecería que no muestran inhibición, el patrón NADH frente a BAL sería incompetitivo (**Figura 34C, líneas con guiones**), lo que sugeriría que el BAL es el primer sustrato en unirse a la enzima. Al analizar todos los datos se obtiene el

patrón correcto (**Figura 34C, líneas continuas**) donde NAD^+ es el primer sustrato en unirse y el NADH es el último producto en ser liberado, lo que es consistente con el resto de los resultados mostrados en las secciones anteriores.

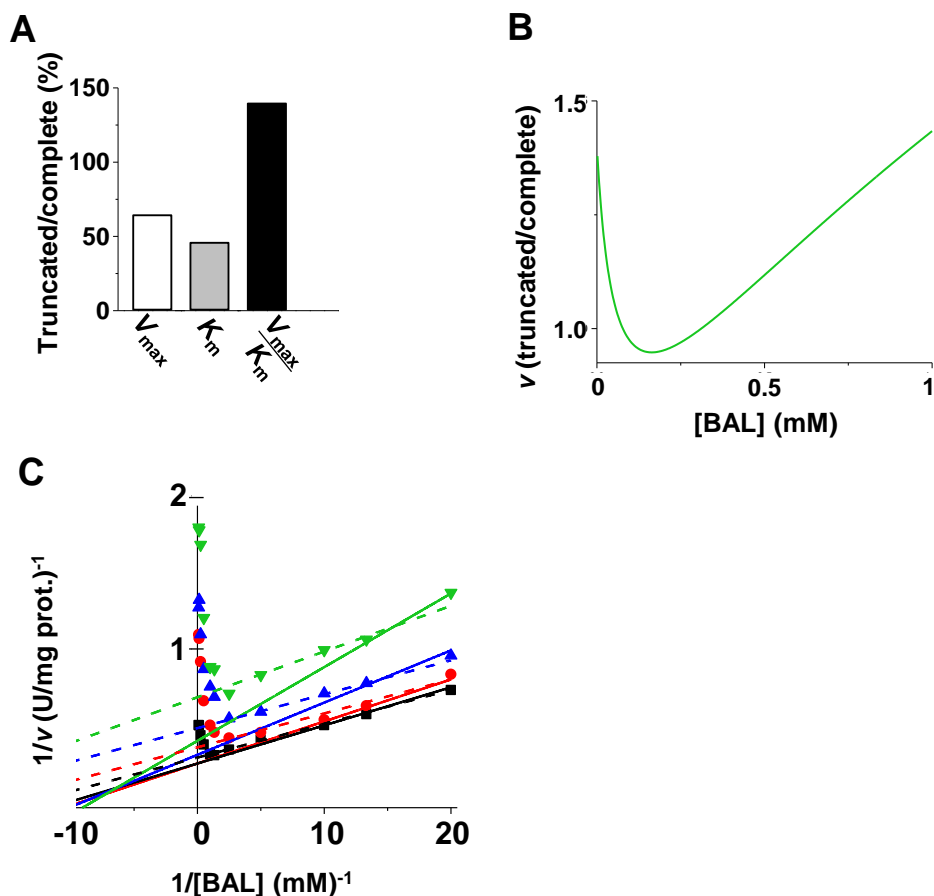


Figura 34. Efecto del NADH sobre el grado de inhibición por BAL en la *SoBADH*. **A**, porcentaje del valor de los parámetros cinéticos estimados utilizando únicamente los datos que aparentemente no presentan inhibición por sustrato (truncated) con respecto a los obtenidos con todos los puntos de la saturación (complete). **B**, cociente representativo (NADH 100 μM) de la velocidad estimada a bajas concentraciones de sustrato a partir de los datos que aparentemente no presentan inhibición por sustrato (truncated) con respecto a los obtenidos con todos los puntos de la saturación (complete). *El pie de figura continúa en la siguiente página.*

C, patrón de inhibición por NADH frente a BAL con NAD^+ 25 μM . Las concentraciones de NADH utilizadas fueron \blacksquare 0, \bullet 25, \blacktriangle 50 o \blacktriangledown 100 μM . Los puntos son los valores promedio obtenidos experimentalmente. Las líneas continuas muestran el comportamiento teórico de la enzima si no existiera inhibición por sustrato, y se obtienen en simulaciones usando la **Ecuación 1** y los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la **Ecuación 6**; las líneas con guiones son el resultado del ajuste individual a la **Ecuación 1** de únicamente los puntos que aparentemente no presentan inhibición por sustrato

VI.6.2. Simulaciones teóricas de los diferentes mecanismos cinéticos de inhibición por sustrato en reacciones monosustrato

Para explorar el tipo y la extensión de los errores que surgen al estimar los parámetros cinéticos y al determinar los mecanismos cinéticos si la inhibición por sustrato se ignora intencionalmente o no, se realizaron simulaciones teóricas de los posibles mecanismos de inhibición por sustrato en reacciones monosustrato. En estas reacciones, los únicos mecanismos plausibles de inhibición por sustrato son la inhibición total o parcial incompetitiva. Las simulaciones para las reacciones monosustrato descritas pueden representar una reacción de bisustrato si al variar la concentración del sustrato que provoca inhibición por sustrato, el otro sustrato se mantiene fijo.

Se simularon curvas de inhibición por sustrato parcial ($\beta = 0.5$) con valores de K_{IS} de K_m , $2.5K_m$, $10K_m$ y $25K_m$ (**Figura 35A y B**) así como curvas de inhibición por sustrato a una K_{IS} fija ($K_{IS} = 10K_m$) con valores de β de 0, 0.25, 0.5 y 0.75 (**Figura 35D y E**). El resultado fue consistente con los obtenidos a partir del análisis de los datos experimentales. Los parámetros V_{\max} y K_m se subestiman en diferente proporción dando como resultado una sobreestimación

del valor de V_{\max}/K_m (**Figura 35C y F**) cuando se comparan considerando únicamente los datos que aparentemente no presentan inhibición (**Figura 35, líneas con guiones**) con respecto a todos los datos (**Figura 35, líneas continuas**).

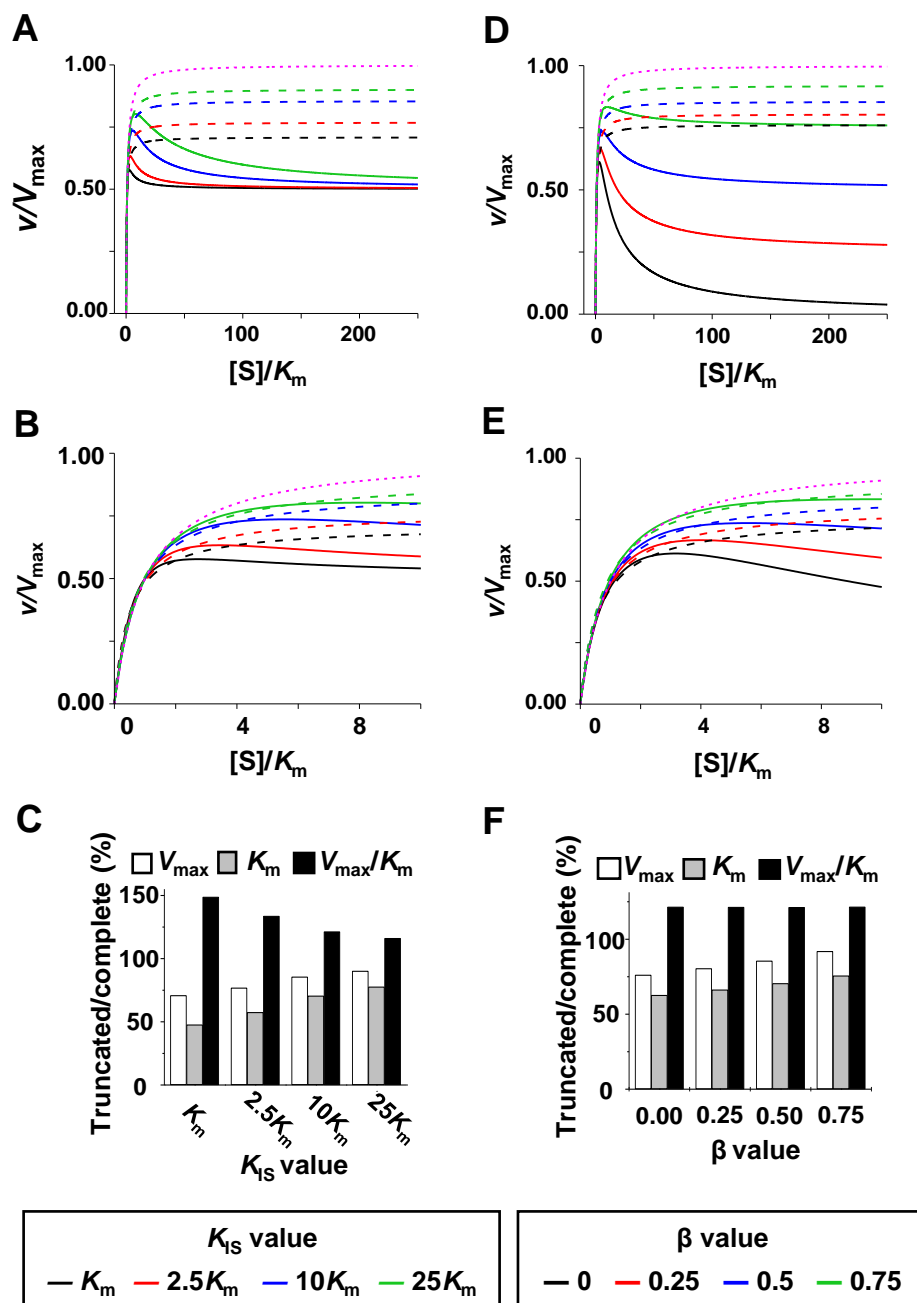


Figura 35. Pie de figura en la siguiente página.

Figura 35. Simulaciones de la inhibición incompetitiva por sustrato en reacciones monosustrato. A-C, $\beta = 0.5$ y K_{IS} variable; D-F, $K_{IS} = 10K_m$ y β variable. A y D, gráficos completos; B y E, acercamientos a los gráficos completos. Las líneas con puntos son el resultado de la simulación sin inhibición por sustrato con la **Ecuación 1; las líneas continuas son el resultado de la simulación de inhibición por sustrato con la **Ecuación 6**; las líneas con guiones son el resultado del ajuste a la **Ecuación 1** de los datos que aparentemente no presentan inhibición por sustrato y que fueron generados por la simulación con la **Ecuación 6**. C y F, porcentaje del valor de los parámetros cinéticos estimados utilizando únicamente los datos que aparentemente no presentan inhibición por sustrato (truncated) con respecto a los obtenidos con todos los puntos de la saturación (complete).**

VI.6.3. Simulaciones teóricas de los errores generados por ignorar la inhibición por sustrato en la cinética de los inhibidores

Para estudiar qué efecto puede tener el ignorar la inhibición por sustrato sobre la inhibición causada por otros inhibidores se realizaron otras simulaciones. Como se ha descrito anteriormente, la estimación errónea de los parámetros cinéticos que se presenta cuando no se considera la inhibición por sustrato provoca que los patrones de inhibición cambien (**Figuras 36A-C**). Así mismo, los valores de las constantes de inhibición se ven afectados (**Figura 36D-G**). Un patrón competitivo (**Figura 36A**) podría ser confundido con un patrón mixto. Un patrón incompetitivo cambiaría su pendiente de tal modo que la intersección de la familia de rectas sería en algún punto del primer cuadrante (**Figura 36B**). Mientras un patrón mixto se conservaría cualitativamente, pero el valor de sus constantes de inhibición, K_{ic} y K_{iu} cambiarían (**Figura 36C**).

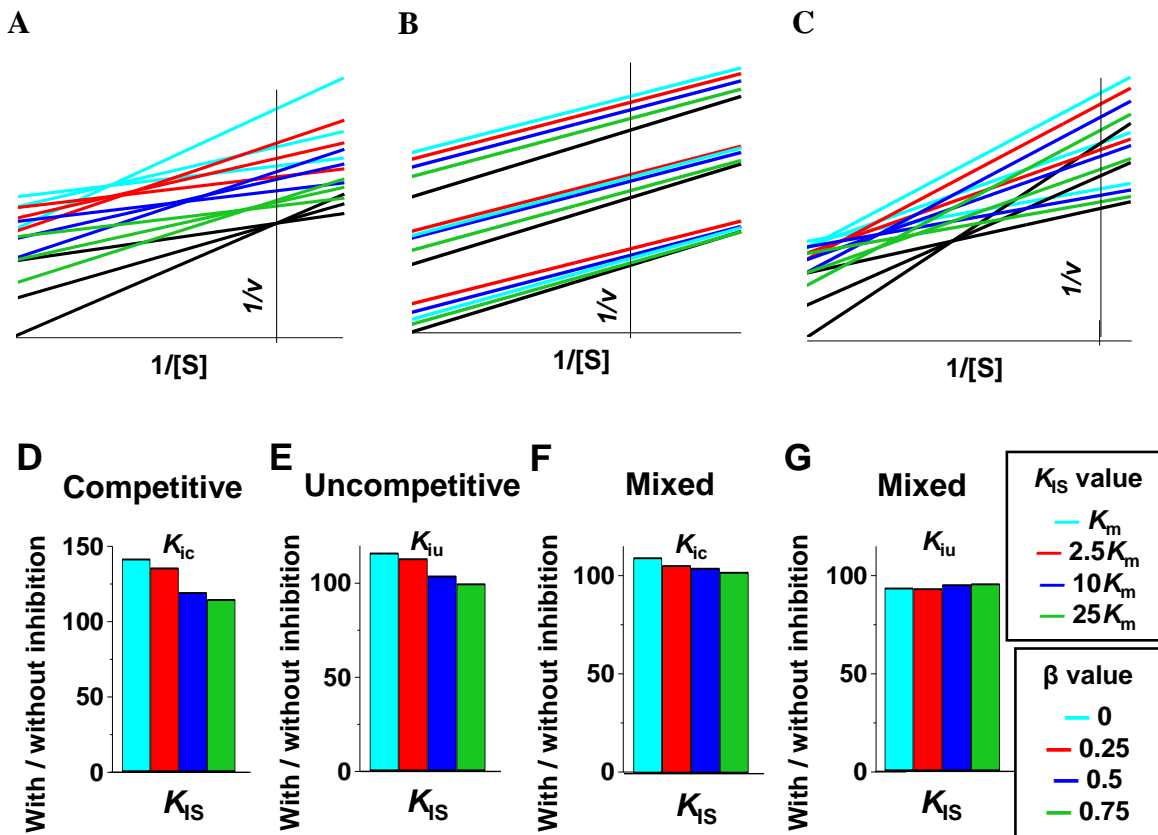


Figura 36. Efectos de la inhibición parcial incompetitiva sobre la cinética en presencia de un inhibidor. A y D, inhibición competitiva; B y E, inhibición incompetitiva; C, F y G, inhibición mixta. Las líneas negras corresponden a la ausencia de inhibición por sustrato; las líneas de color corresponden a cinéticas con inhibición parcial incompetitiva por sustrato con $\beta = 0.5$ y valores de K_{IS} variables. D-G, porcentaje del valor de las constantes de inhibición estimadas utilizando únicamente los datos que presentan inhibición por sustrato (with inhibition) con respecto a los que no presentan inhibición (without inhibition).

VI.6.4. Simulaciones teóricas de la inhibición por sustrato en mecanismos cinéticos Bi Bi ordenados en estado estacionario

Debido a que las enzimas ALDH siguen un mecanismo Bi Bi ordenado en estado estacionario, se simularon los efectos que puede tener la variación de la concentración del sustrato A (nucleótido) sobre la inhibición provocada por el sustrato B (aldehído). Se consideraron los mecanismos competitivo total, incompetitivo total e incompetitivo parcial.

En la inhibición competitiva total se observó que cuando B es el sustrato variable y A el fijo-variable la inhibición por el sustrato B disminuye a medida que la concentración de A aumenta ($\text{app}K_{IS}/K_{IS}$ aumenta su valor; **Figura 37B**). Esto es debido a que la creciente concentración de A favorece la formación del complejo productivo E-A sobre la formación del complejo no productivo E-B (**Esquema 4A**). También en la inhibición competitiva total, pero cuando A es el sustrato variable y B el fijo variable se observó que valores menores o iguales a la K_B no tienen efecto inhibitorio; pero cuando la concentración de B fue mayor a su K_B sí tuvo efecto inhibitorio y fue más notorio a medida que la concentración de B lo hizo (**Figura 37C**). Lo anterior es debido a que altas concentraciones de B favorecen la formación del complejo no productivo E-B sobre el complejo productivo E-A.

En las inhibiciones incompetitivas completa y parcial se observó que cuando B es el sustrato variable y A el fijo-variable la inhibición por el sustrato B se ve favorecida a medida que la concentración del sustrato A aumenta ($\text{app}K_{IS}/K_{IS}$ se acerca a 1; **Figura 37E y H**). Esto debido a que la alta concentración de A aumenta la concentración en estado estacionario del complejo E-Q al cual se une B como inhibidor (**Esquema 4B-D**). Por otra parte, cuando el

sustrato A es el variable y B el fijo-variable se observó que concentraciones menores o iguales a la K_B no tienen efecto inhibitor; pero cuando la concentración de B fue mayor a su K_B sí tuvo efecto inhibitor que lógicamente fue más notoria a medida que la concentración de B aumentó (**Figura 37F e I**).

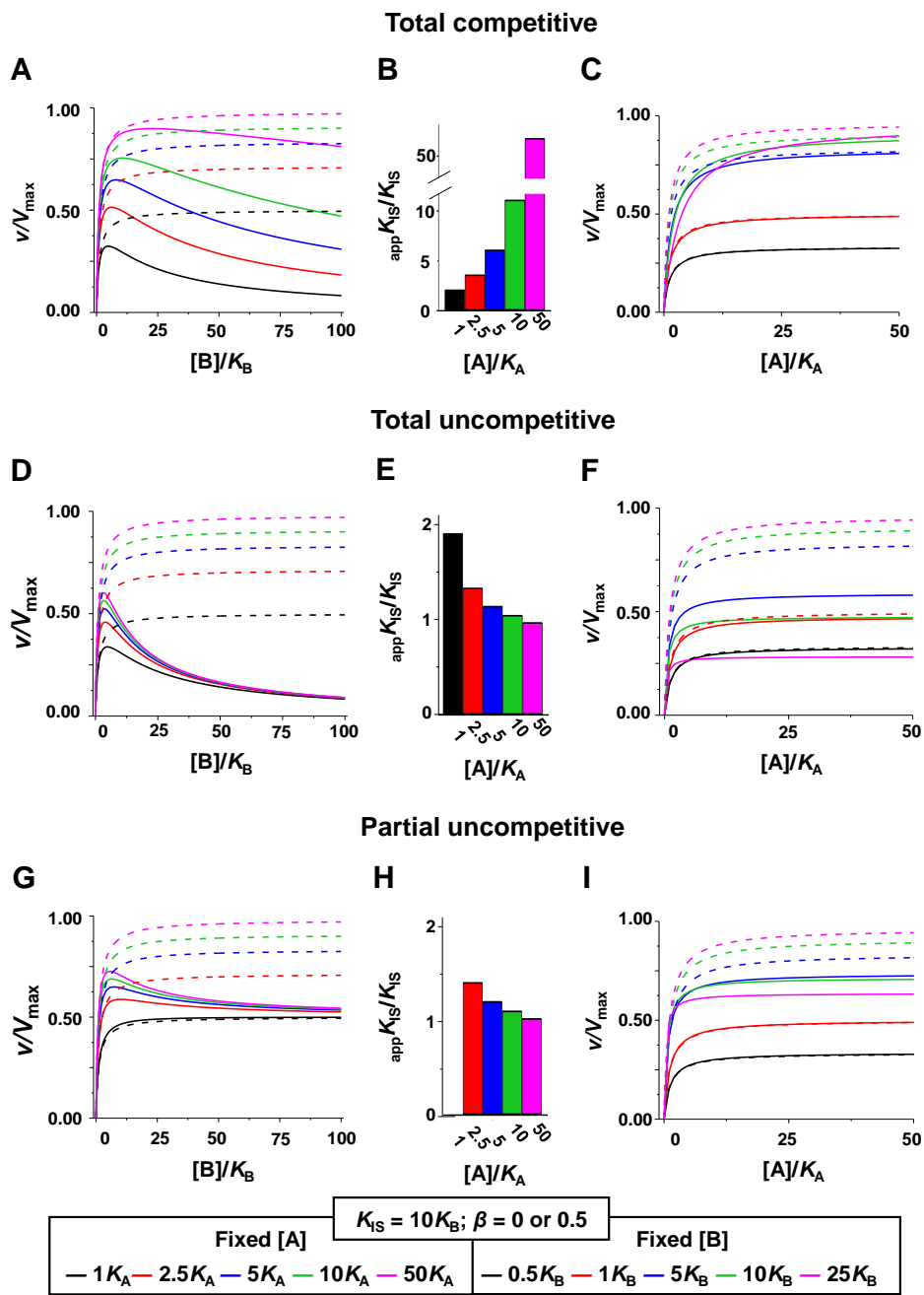


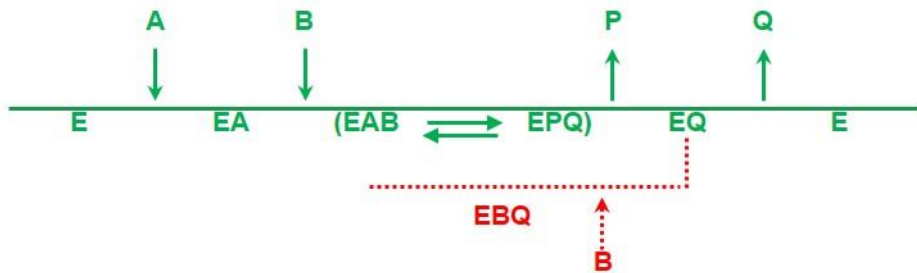
Figura 37. Pie de figura en la siguiente página.

Figura 37. Simulaciones de la inhibición por el sustrato B en reacciones Bi Bi ordenadas en estado estacionario. A-C, inhibición competitiva total; D-F, inhibición incompetitiva total; G-I, inhibición incompetitiva parcial. A, D y G, saturación por el sustrato B inhibidor con A fijo-variable. B, E y H, $appK_{IS}/K_{IS}$ obtenida a partir del ajuste a la Ecuación 6 de los datos que fueron generados por la simulación con las Ecuaciones 9-11. C, F e I, saturación por el sustrato A con B inhibidor fijo-variable. Las líneas discontinuas son el resultado de la simulación sin inhibición por sustrato con la Ecuación 1; las líneas continuas son el resultado de la simulación de inhibición por sustrato con las Ecuaciones 9-11.

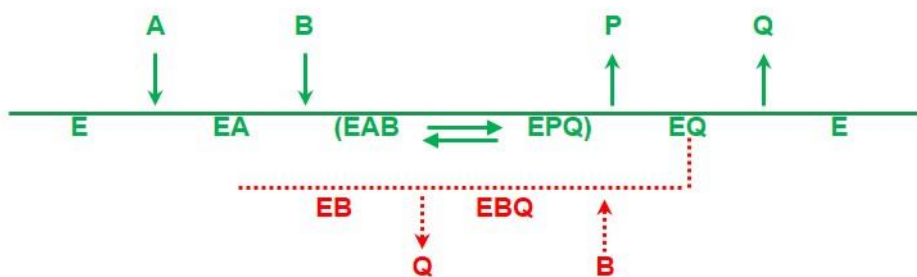
A) Total competitive



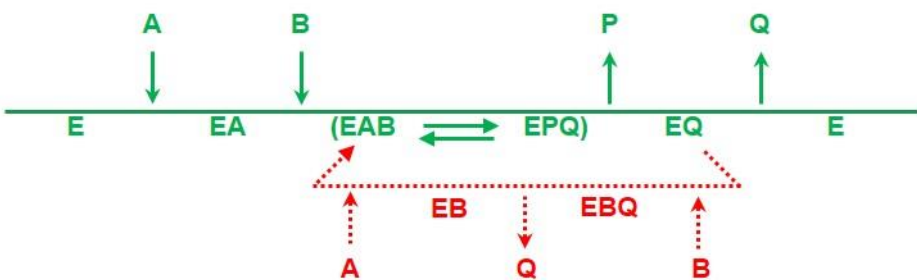
B) Total uncompetitive



C) Total uncompetitive



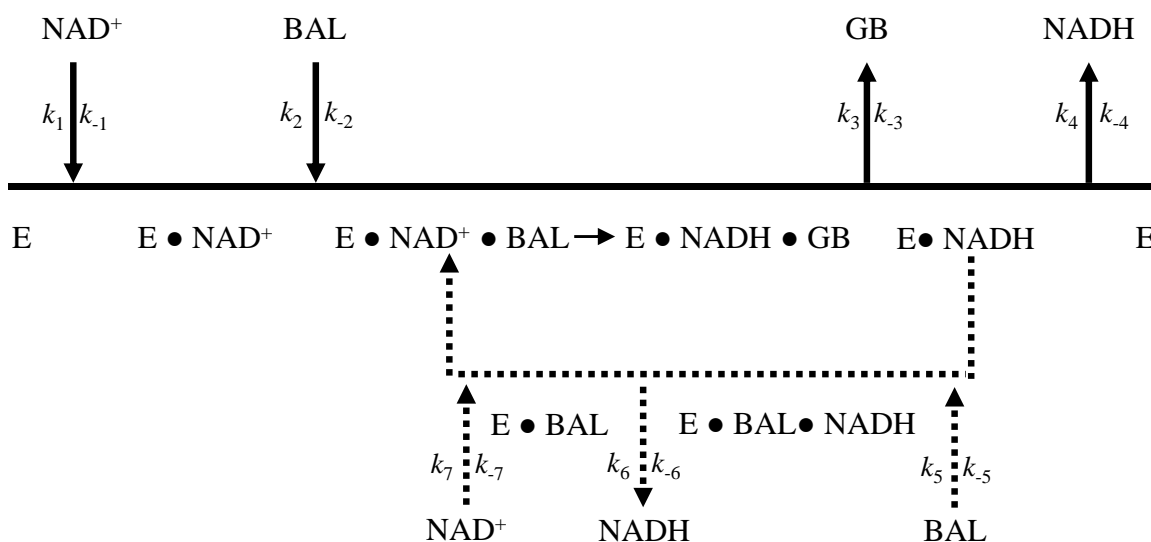
D) Partial uncompetitive



Esquema 4. Mecanismos de inhibición por el sustrato B en mecanismos cinéticos Bi Bi ordenados en estado estacionario. A, mecanismos competitivo total; B y C, incompetivo total; D, incompetivo parcial, respectivamente.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

El comportamiento cinético de la *SoBADH* es verdaderamente complejo, de modo que los análisis cinéticos convencionales como los patrones de velocidad inicial, de inhibición por producto e inhibición por análogos de sustrato fueron insuficientes para determinar un mecanismo cinético sólido (**Figuras 4-12; Tablas I-V**). El estudio de la inhibición por sustrato arrojó información acerca de la formación de rutas alternas de reacción, las cuales, se hicieron evidentes hasta que se utilizó un amplio intervalo de concentración de ambos sustratos (**Figuras 13-27; Tablas VI-XIII**). Para la inhibición parcial por el sustrato aldehído se pudo concluir que ocurre mediante un mecanismo Bi Bi ordenado que implica la formación de un complejo E-BAL-NADH del cual se libera NADH (k_6 del **Esquema 5**) de manera más lenta con respecto a cómo se libera del complejo E-NADH (k_4 del **Esquema 5**). Al complejo E-BAL resultante se le une NAD^+ (k_7 del **Esquema 5**) dando lugar al complejo productivo E-NAD⁺-BAL, de manera que la reacción sigue.



Esquema 5. Diagrama de Cleland mostrando el mecanismo Bi Bi ordenado en estado estacionario con una ruta alterna propuesta para explicar la inhibición parcial por el sustrato BAL. En líneas sólidas se representa la ruta principal y en líneas con guiones la ruta alterna por la que ocurre la inhibición por el sustrato BAL.

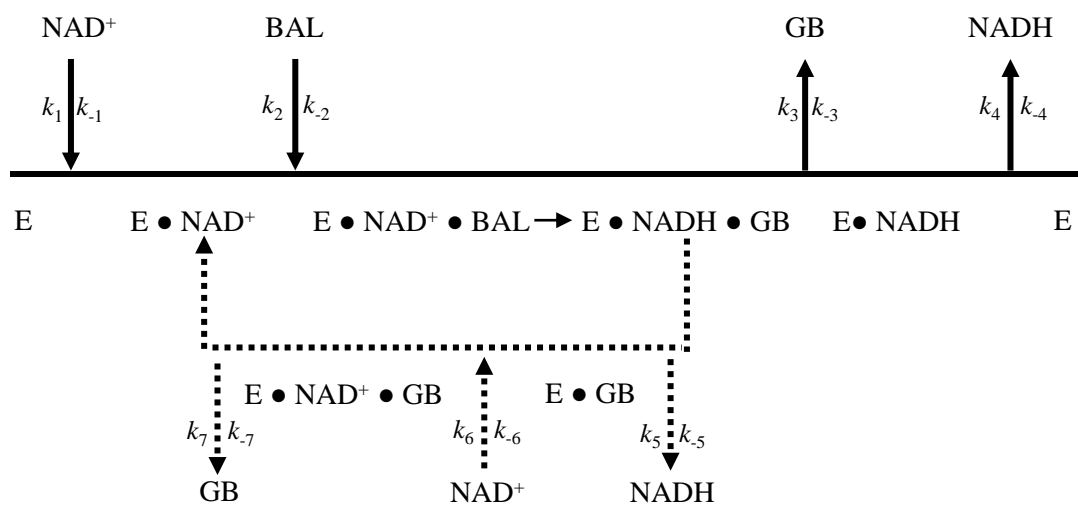
Comprender el comportamiento de la enzima con el sustrato NAD^+ fue aún más difícil debido a que se observó una atípica inhibición mixta en el patrón de inhibición NADH frente a NAD^+ (**Figura 5; Tabla II**) e inhibición parcial por NAD^+ (**Figuras 13 y 14; Tabla VI**). Sin embargo, el hallazgo de que tanto NADH como AMP contrarrestan la inhibición por NAD^+ sugirió que ambos compuestos se unen a la misma forma de la enzima a la que se une la molécula de NAD^+ inhibidora y esta no puede ser la enzima libre porque el complejo $\text{E} \cdot \text{NAD}^+$ no es abortivo. Esto nos llevó a proponer que la *S*oBADH tiene un mecanismo cinético Bi Bi ordenado en estado estacionario, el cual posee una ruta principal donde el primer ligando en unirse es NAD^+ y el último en liberarse es NADH; pero además existe una

alterna en donde el NADH puede liberarse del complejo E-tioéster-NADH (k_5 del **Esquema 6**) para dar lugar al complejo E-tioéster al que puede unirse el NAD^+ (k_6 del **Esquema 6**).

La unión del NAD^+ al complejo enzima-tioéster podría explicar, en primera instancia, la inhibición incompetitiva por el sustrato NAD^+ y el hecho de que esta sea parcial se explicaría, si el NAD^+ unido al complejo enzima-tioéster entorpeciera, pero no impidiera a la molécula de agua catalítica realizar la hidrólisis. Es conocido que los nucleótidos oxidados y reducidos unidos a la enzima poseen diferente flexibilidad conformacional ([Hammen *et al.*, 2002](#); [Perez-Miller y Hurley, 2003](#); [González-Segura y Muñoz-Clares, datos no publicados](#)). El NAD^+ unido al complejo enzima-tioéster podría adoptar su típica conformación extendida llamada de transferencia del hidruro (“HT”) que posiciona al anillo de la nicotinamida más adentro del sitio activo que la posición que ocupa el anillo del NADH en cualquiera de sus conformaciones de hidrólisis (“Hyd”).

Así mismo, la inhibición mixta del NADH frente a NAD^+ podría deberse a: 1) el componente competitivo causado por la unión mutuamente excluyente de ambos nucleótidos a la enzima libre y 2) el componente incompetitivo causado por la unión de ambos al complejo E-tioéster, puesto que, aunque la molécula de NADH del complejo E-tioéster-NADH sea sustituida por una molécula de NAD^+ , el complejo resultante, E-tioéster- NAD^+ es también inhibitorio. La competencia del NADH y NAD^+ por este complejo enzima-tioéster también explica que el NADH elimine la inhibición por sustrato del NAD^+ . En el caso del AMP, también podría formar un complejo enzima-tioéster-AMP en competencia con el NAD^+ y por tanto eliminar la inhibición por sustrato del NAD^+ , pero, al no poseer la mitad de nicotinamida, su unión no

estorbaría el paso de hidrólisis como si lo hace el NAD^+ , lo que se refleja en una aparente activación a las altas concentraciones del NAD^+ .



Esquema 6. Diagrama de Cleland con una ruta alterna propuesta para explicar la inhibición parcial por el sustrato NAD^+ . En este esquema los complejos E-NADH-tioéster y E- NAD^+ -tioéster se representan por E.NADH.GB y E.NAD⁺.GB, respectivamente. En este mecanismo el paso de hidrólisis del complejo E- NAD^+ -tioéster es mucho más lento que el del complejo E-NADH-tioéster

Por otra parte, la inhibición competitiva del NADH frente al NADP^+ podría deberse a la mucha menor afinidad de la enzima por el NADP^+ respecto al NAD^+ , como se determinó por fluorescencia ($K_d^{\text{NAD}^+} = 2.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$, $K_d^{\text{NADP}^+} = 709 \pm 62 \mu\text{M}$). Además, no se pudo determinar la inhibición por el NADPH por lo que sugerimos que, en las condiciones de nuestros ensayos, las concentraciones del complejo E-tioéster-NADP(H) son muy bajas, por lo que no se puede observar el componente incompetitivo de la inhibición por el NADH.

VIII. CONCLUSIONES

En la *SoBADH*, la unión del NAD^+ al complejo central enzima-tioéster podría ser la responsable de la inhibición parcial por NAD^+ y del componente incompetitivo que se presenta en la inhibición mixta por el NADH frente al NAD^+ .

El efecto de la inhibición por sustrato afecta incluso cuando se trabaja a concentraciones de sustrato que aparentemente son subinhibitorias.

Al ignorar la inhibición por sustrato se subestima el valor de V_{\max} y K_m mientras el valor de V_{\max}/K_m se sobrestima.

Omitir el estudio de la inhibición por sustrato también provoca errores en la estimación de las constantes de inhibición y en la determinación del mecanismo cinético.

IX. REFERENCIAS

- Ahvazi, B., Coulombe, R., Delarge, M., Vedadi, M., Zhang, L., Meighen, E., Vrielink, A. (2000). Crystal structure of the NADP⁺-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity. *Biochemical Journal*, 349, 853-861.
- Ashibe, B., Hirai, T., Higashi, K., Sekimizu, K., Motojima, K. (2007). Dual subcellular localization in the endoplasmic reticulum and peroxisomes and a vital role in protecting against oxidative stress of fatty aldehyde dehydrogenase are achieved by alternative splicing. *The Journal of Biological Chemistry*. 282: 20763–20773.
- Blackwell, L. F., Bennett, A. F., Buckley, P. D. (1983). Relationship between the mechanisms of the esterase and dehydrogenase activities of the cytoplasmic aldehyde dehydrogenase from sheep liver. An alternative view. *Biochemistry*, 22, 3784-3791.
- Blackwell, L. F., Motion, R. L., MacGibbon, A. K. H., Hardman, M. J., Buckley, P. D. (1987). Evidence that the slow conformation change controlling NADH release from the enzyme is rate-limiting during the oxidation of propionaldehyde by aldehyde dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 242, 803-808.
- 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. *Archives of Microbiology*, 168, 282-289.
- Bradbury, S. L., Jakoby, W. B. (1971). Ordered binding of substrates to yeast aldehyde dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 246, 1834-1840.
- Burnet, M., Lafontaine, P. J., Hanson, A. D. (1995). Assay, purification, and partial characterization of choline monooxygenase from spinach. *Plant physiology*, 108, 581-588.
- Cardona-Cardona, Y. V. (2017). Clonación, sobreexpresión y caracterización cinética y estructural de la enzima aminoaldehído deshidrogenasa PA5312 (PAKAUB) de *Pseudomonas aeruginosa* (Tesis de maestría). UNAM, México.
- Carrillo-Campos, J., Riveros-Rosas, H., Rodríguez-Sotres, R., Muñoz-Clares, R. A. (2018). Bona fide choline monooxygenases evolved in Amaranthaceae plants from oxygenases of unknown function: Evidence from phylogenetics, homology modeling and docking studies. *PloS One*, 13, e0204711.
- Chambers, S., Kunin, C. M. (1985). The osmoprotective properties of urine for bacteria: the protective effect of betaine and human urine against low pH and high concentrations of electrolytes, sugars, and urea. *The Journal of Infectious Diseases*, 152, 1308-1316.
- 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 3992-4002.

- Cleland, W. W. (1963). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 67, 188-196.
- Cleland, W. W. (1977). Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 45, 273-387.
- Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, S., Branlant, G., Aubry, A. (2000). Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Journal of Molecular Biology*, 300, 141-152.
- Courtenay, E. S., Capp, M. W., Anderson, C. F., Record, M. T. (2000). Vapor pressure osmometry studies of osmolyte– protein interactions: implications for the action of osmoprotectants *in vivo* and for the interpretation of “osmotic stress” experiments *in vitro*. *Biochemistry*, 39, 4455-4471.
- De Carvalho, L. P. S., Linga, Y., Shen, C., Warren, J.D., Rhee, K. Y. (2011). On the chemical mechanism of succinic semialdehyde dehydrogenase (GabD1) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 509, 90–99.
- 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 Physiology*, 158, 1570-1582.
- Díaz-Sánchez, Á. 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. *Biochemical Journal*, 439, 443-455.
- Dickinson, F. M. (1986). Studies on the mechanism of sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase. The effect of pH on the aldehyde binding reactions and a re-examination of the problem of the site of proton release in the mechanism. *Biochemical Journal*, 238, 75-82.
- Duncan, R. J. S., Tipton, K. F. (1971). The kinetics of pig brain aldehyde dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, 22, 538-543.
- Falkenberg, P., Strøm, A. R. (1990). Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1034, 253-259.
- Feldman, R. I., Weiner, H. (1972). Horse liver aldehyde dehydrogenase II. Kinetics and mechanistic implications of the dehydrogenase and esterase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 247, 267-272.
- Figueroa-Soto, C. G., Valenzuela-Soto, E. M. (2000). Kinetic study of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 269, 596-603.

- Flores, H. E., Filner P. (1985). Polyamine catabolism in higher plants: characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Regulation*, 3, 277-291.
- Forte-McRobbie, C. M., Pietruszko, R. (1986). Purification and characterization of human liver "high K_m " aldehyde dehydrogenase and its identification as glutamic gamma-semialdehyde dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 261, 2154-2163.
 - Forte-McRobbie, C., Pietruszko, R. (1989). Human glutamic- γ -semialdehyde dehydrogenase. Kinetic mechanism. *Biochemical Journal*, 261, 935-943.
 - Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31, 3784-3788.
 - Gillyon, C., Haywood, G. W., Large, P. J., Nellen, B., Robertson, A. (1987). Putrescine breakdown in the yeast *Candida boidinii*: subcellular location of some of the enzymes involved and properties of two acetamidoaldehyde dehydrogenases. *Journal of General Microbiology*, 133, 2477-2485.
 - González-Segura, L., Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., Muñoz-Clares, R. A. (2015). Residues that influence coenzyme preference in the aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions*, 234, 59-74.
 - 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⁺ and a novel cation binding site. *Journal of Molecular Biology*, 385, 542-557.
 - Hammen, P. K., Allali-Hassani, A., Hallenga, K., Hurley, T. D., Weiner, H. (2002). Multiple conformations of NAD and NADH when bound to human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry*, 41, 7156-7168.
 - Hanson, A. D., May, A. M., Grumet, R., Bode, J., Jamieson, G. C., Rhodes, D. (1985). Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 3678-3682.
 - Hart, G. J., Dickinson, F. M. (1982). Kinetic properties of highly purified preparations of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 203, 617-627.
 - Heineke, D., Riens, B., Grosse, H., Hoferichter, P., Peter, U., Flügge, U. I., Heldt, H. W. (1991). Redox transfer across the inner chloroplast envelope membrane. *Plant Physiology*, 95, 1131-1137.
 - Hempel, J., Nicholas, H., Lindahl, R. (1993). Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Protein Science*, 2, 1890-1900.
 - Henehan, G. T. M., Tipton, K. F. (1992). Steady-state kinetic analysis of aldehyde dehydrogenase from human erythrocytes. *Biochemical Journal*, 287, 145-150.

- Inagaki, E., Ohshima, N., Takahashi, H., Kuroishi, C., Yokoyama, S., Tahirov, T. H. (2006). Crystal structure of *Thermus thermophilus* Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. *Journal of Molecular Biology*, 362, 490-501.
- 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. *Human Genomics*, 5, 283-303.
- Jang, E. H., Park, S. A., Chi, Y. M., Lee, K. S. (2015). Structural insight into the substrate inhibition mechanism of NADP⁺-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from *Streptococcus pyogenes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46, 487-493.
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jörnvall, H. Eklund, H., (1998). Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Science*, 7, 2106-2117.
- Julián-Sánchez, A., Riveros-Rosas, H., Martínez-Castilla, L. P., Velasco-García, R., Muñoz-Clares, R. A. (2007). Phylogenetic and structural relationships of the betaine aldehyde dehydrogenases. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, 13, 64-76.
- Kang, H., Cho, Y. D. (1994). The kinetic mechanism and chemical modification of γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase from soybean (*Glycine max*) axes. *Korean Biochemical Journal*, 27, 526-533.
- Kopečný, D., Končítíková, R., Tylichová, M., Vigouroux, A., Moskalíková, H., Soural, M., Šebela, M., Moréra, S. (2013). Plant ALDH10 family: identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 9491-9507.
- Kopečný, D., Tylichová, M., Snegaroff, J., Popelková, H., Šebela, M. (2011). Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of ω -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. *The FEBS Journal*, 278, 3130-3139.
- Krupenko, N. I., Holmes, R. S., Tsybovsky, Y., Krupenko, S. A. (2015). Aldehyde dehydrogenase homologous folate enzymes: evolutionary switch between cytoplasmic and mitochondrial localization. *Chemico-Biological Interactions*, 234, 12-17.
- Kumar, S., Kumar, S., Punekar, N. S. (2015). Characterization of succinic semialdehyde dehydrogenase from *Aspergillus niger*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 53, 67-74.
- Landfald, B., Strøm, A. R. (1986). Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 165, 849-855.
- Lee, B. R., Hong, J. W., Yoo, B. K., Lee, S. J., Cho, S. W., Choi, S. Y. (1995). Bovine brain succinic semialdehyde dehydrogenase; purification, kinetics and reactivity of lysyl residues connected with catalytic activity. *Molecules and Cells*, 5, 611-617.
- Liu, F., Schnable, P. S. (2002). Functional specialization of maize mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Plant Physiology*, 130, 1657-1674.

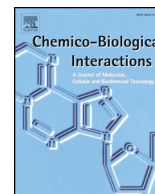
- Liu, Z. J., Sun, Y. J., Rose, J., Chung, Y. J., Hsiao, C. D., Chang, W. R., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J., Wang, B. C. (1997). The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nature Structural and Molecular Biology*, 4, 317-326.
- Livingstone, J. R., 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*. *Journal of Plant Research*, 116, 133-140.
- Long, M. C., Nagegowda, D. A., Kaminaga, Y., Ho, K. K., Kish, C. M., Schnepp, J., Sherman, D., Weiner, H., Rhodes D., Dudareva N. (2009) Involvement of snapdragon benzaldehyde dehydrogenase in benzoic acid biosynthesis. *The Plant Journal* 59, 256–265.
- MacGibbon, A. K. H., Blackwell, L. F., Buckley, P. D. (1977). Kinetics of sheep-liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, 77, 93-100.
- 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 Science*, 8, 1922-1929.
- Marchal, S., Rahuel-Clermont, S., Branlant, G. (2000). Role of glutamate-268 in the catalytic mechanism of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry*, 39, 3327-3335.
- Moore, S. A., Baker, H. M., Blythe, T. J., Kitson, K. E., Kitson, T. M., Baker, E. N. (1998). Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure*, 6, 1541-1551.
- Moore, S. M., Liang, T., Graves, T. J., McCall, K. M., Carr, L. G., Ehlers, C. L. (2009). Identification of a novel cytosolic aldehyde dehydrogenase allele, ALDHIAI*4. *Human Genomics*, 3, 304-307.
- Mori, N., Fuchigami, S., Kitamoto, Y. (2002). Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase with high affinity for NADP from *Arthrobacter globiformis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93, 130-135.
- Mori, N., Kawakami, B., Hyakutome, K., Tani, Y., Yamada, H. (1980). Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpum didymum* M-1. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44, 3015-3016.
- Muñoz-Clares, R. A. (2015). Betaine in food plants: a focus on synthesis and content, en “Food and Nutritional Components in Focus No 7. Betaine: Chemistry, Analysis, Function and Effects” (V. R. Preddy, editor). Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge, UK, 29-44.
- Muñoz-Clares, R. A., Casanova-Figueroa, K. (2019). The importance of assessing aldehyde substrate inhibition for the correct determination of kinetic parameters and mechanisms: the case of the ALDH enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, 305, 86-97.

- Muñoz-Clares, R. A., Díaz-Sánchez, Á. G., González-Segura, L., Montiel, C. (2010). Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: mechanistic and regulatory implications. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 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. *Chemico-Biological Interactions*, 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. *Chemico-biological interactions*, 234, 45-58.
- Muñoz-Clares, R. A., Riveros-Rosas, H., Garza-Ramos, G., González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C., Julián-Sánchez, A. (2014). Exploring the evolutionary route of the acquisition of betaine aldehyde dehydrogenase activity by plant ALDH10 enzymes: implications for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *BMC Plant Biology*, 14, 149.
- Pan, S. M., Moreau, R. A., Yu, C., Huang, A. H. C. (1981). Betaine accumulation and betaine-aldehyde dehydrogenase in spinach leaves. *Plant Physiology*, 67, 1105-1108.
- Park, S. A., Park, Y. S., Lee K. S. (2014). Kinetic characterization and molecular modeling of NAD(P)⁺-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis* as an ortholog YneI. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 954–958.
- Perez-Miller, S. J., Hurley, T. D. (2003). Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry*, 42, 7100-7109.
- Perozich, J., Kuo, I., Wang, B. C., Boesch, J. S., Lindahl, R., Hempel, J. (2000). Shifting the NAD/NADP preference in class 3 aldehyde dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, 267, 6197-6203.
- Petronini, P. G., de Angelis, E. M., Borghetti, P., Borghetti, A. F., Wheeler, K. P. (1992). Modulation by betaine of cellular responses to osmotic stress. *Biochemical Journal*, 282, 69-73.
- Reed, M. C., Lieb, A., Nijhout, H. F. (2010). The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. *Bioessays*, 32, 422-429.
- 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. *Chemico-Biological Interactions*, 202, 51-61.
- Rivett, A. J., Tipton, K. F. (1981). Kinetic Studies with rat-brain succinic-semialdehyde dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, 117, 187-193.
- Rossmann, M. G., Moras, D., Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature*, 250, 194-199.
- Rueda-Sanabria, C. A. (2017). Clonación, sobreexpresión y caracterización cinética de la enzima aldehído deshidrogenasa PA2125 de *Pseudomonas aeruginosa* (Tesis de maestría). UNAM, México.

- Samsonova, N. N., Smirnov, S. V., Novikova, A. E., Ptitsyn, L. R. (2005). Identification of *Escherichia coli* K12 YdcW protein as a γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase. *FEBS Letters*, 579, 4107-4112.
- Segel, I. H. (1975). Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. Wiley, New York.
- Sidhu, R. S., Blair, A. H. (1975). Human liver aldehyde dehydrogenase. Kinetics of aldehyde oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 7899-7904.
- Singh, S., Brocker, C., Koppaka, V., Chen, Y., Jackson, B., Matsumoto, A., Thompson, D. C., Vasiliou, V. (2013). Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free radical biology and medicine*, 56, 89-101.
- Sophos, N. A., & Vasiliou, V. (2003). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chemico-biological interactions*, 143, 5-22.
- Stagos, D., Chen, Y., Cantore, M., Jester, J. V., & Vasiliou, V. (2010). Corneal aldehyde dehydrogenases: multiple functions and novel nuclear localization. *Brain Research Bulletin*, 81, 211-218.
- 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.
- Stines-Chaumeil, C., Talfournier, F., Branlant, G. (2006). Mechanistic characterization of the MSDH (methylmalonate semialdehyde dehydrogenase) from *Bacillus subtilis*. *Biochemical Journal*, 395, 107-115.
- Tuck, L. R., Altenbach, K., Ang, T. F., Crawshaw, A. D., Campopiano, D. J., Clarke, D. J., Marles-Wright, J. (2016). Insight into coenzyme A cofactor binding and the mechanism of acyl-transfer in an acylating aldehyde dehydrogenase from *Clostridium phytofermentans*. *Scientific Reports*, 6, 22108.
- Valenzuela-Soto, E. M., Munoz-Clares, R. A. (1993). Betaine-aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an Iso Ordered Bi Bi steady state mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 23818-23824.
- Valenzuela-Soto, E. M., Muñoz-Clares, R. A. (1994). Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *Journal of Plant Physiology*, 143, 145-152.
- Vallari, R. C., Pietruszko, R. (1981). Kinetic mechanism of the human cytoplasmic aldehyde dehydrogenase E1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 212, 9-19.
- Vasiliou, V., Bairoch, A., Tipton, K. F., Nebert, D. W. (1999). Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics*, 9, 421-434.

- Velasco-García, R., González-Segura, L., Muñoz-Clares, R. A. (2000). Steady-state kinetic mechanism of the NADP⁺- and NAD⁺-dependent reactions catalysed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Journal*, 352, 675-683.
- Vojtěchová, M., Hanson, A. D., Muñoz-Clares, R. A. (1997). Betaine-aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD-dependent oxidation of dimethylsulfonylpropionaldehyde to dimethylsulfonylpropionate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 337, 81-88.
- Vojtěchová, 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. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1341, 49-57.
- Wang, M. F., Han, C. L., Yin, S. J. (2009). Substrate specificity of human and yeast aldehyde dehydrogenases. *Chemico-biological interactions*, 178, 36-39.
- 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.
- Weiner, H., Hu, J. H., Sanny, C. G. (1976). Rate-limiting steps for the esterase and dehydrogenase reaction catalyzed by horse liver aldehyde dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 251, 3853-3855.

X. ANEXO



The importance of assessing aldehyde substrate inhibition for the correct determination of kinetic parameters and mechanisms: the case of the ALDH enzymes



Rosario A. Muñoz-Clares^{*}, Karla Casanova-Figueroa

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Aldehyde dehydrogenases
Competitive and uncompetitive substrate inhibition
Substrate inhibition and inhibitors
Theoretical saturation curves
Fitting errors

ABSTRACT

Substrate inhibition by the aldehyde has been observed for decades in NAD(P)⁺-dependent aldehyde dehydrogenase (ALDH) enzymes, which follow a Bi Bi ordered steady-state kinetic mechanism. In this work, by using theoretical simulations of different possible substrate inhibition mechanisms in monosubstrate and Bi Bi ordered steady-state reactions, we explored the kind and extent of errors arising when estimating the kinetic parameters and determining the kinetic mechanisms if substrate inhibition is intentionally or unintentionally ignored. We found that, in every mechanism, fitting the initial velocity data of apparently non-inhibitory substrate concentrations to a rectangular hyperbola produces important errors, not only in the estimation of V_{\max} values, which were underestimated as expected, but, surprisingly, even more in the estimation of K_m values, which led to overestimation of the V_{\max}/K_m values. We show that the greater errors in K_m arises from fitting data that do experience substrate inhibition, although it may not be evident, to a Michaelis-Menten equation, which causes overestimation of the data at low substrate concentrations. Similarly, we show that if substrate inhibition is not fully assessed when inhibitors are evaluated, the estimated inhibition constants will have significant errors, and the type of inhibition could be grossly mistaken. We exemplify these errors with experimental results obtained with the betaine aldehyde dehydrogenase from spinach showing the errors predicted by the theoretical simulations and that these errors are increased in the presence of NADH, which in this enzyme favors aldehyde substrate inhibition. Therefore, we strongly recommend assessing substrate inhibition by the aldehyde in every ALDH kinetic study, particularly when inhibitors are evaluated. The common practices of using an apparently non-inhibitory concentration range of the aldehyde or a single high concentration of the aldehyde or the coenzyme when varying the other to determine true kinetic parameters should be abandoned.

1. Introduction

A common complication of the kinetics of the NAD(P)⁺-dependent aldehyde dehydrogenase (ALDH) enzymes is substrate inhibition by the aldehyde, but, in spite of its high occurrence, it has been neglected in most of the reported kinetic studies. Most likely, inhibition by the aldehyde substrate is a general feature of these enzymes as a consequence of both their ordered steady-state kinetic mechanism and structural features. A search in the literature showed that inhibition of ALDHs by high concentrations of the aldehyde substrate has been reported for decades [1–29], but a complete kinetic characterization of this behavior was seldom performed. A few studies addressed the mechanism involved in substrate inhibition, which was proposed to be caused by (i)

formation of the non-productive ternary complex E-NAD(P)H-aldehyde from which NAD(P)H can be released [3,4,7,12]; (ii) binding of the aldehyde to the free enzyme in competition with the coenzyme [10,14,26]; (iii) non-productive binding [24] or binding of two aldehyde molecules [19] in the aldehyde-binding site; and (iv) binding of the inhibitor substrate molecule to an inhibitory allosteric site [6]. Regardless of the mechanism and possible physiological relevance, if any, of substrate inhibition, and of its value as a tool to establish a kinetic mechanism—three aspects which are out of the scope of this work—we reasoned that if this phenomenon is not taken into account in kinetic studies of ALDHs, and of enzymes in general, important errors in the determination of the kinetic parameters and even in the determination of the kinetic mechanism will ensue. Here, we explored the kind

Abbreviations: ALDH, Aldehyde dehydrogenase; APAL, 3-Aminopropionaldehyde; BAL, Betaine aldehyde; SoBADH, Betaine aldehyde dehydrogenase from *Spinacia oleracea*

^{*} Corresponding author.

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

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.03.024>

Received 25 October 2018; Received in revised form 23 February 2019; Accepted 25 March 2019

Available online 27 March 2019

0009-2797/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

and extent of these errors using theoretical simulations of the substrate saturation kinetics with different possible mechanisms of substrate inhibition in monosubstrate and Bi Bi ordered steady-state reactions. In addition, we exemplify these errors with experimentally determined initial velocity data obtained studying the betaine aldehyde dehydrogenase from *Spinacia oleracea* (SoBADH), an enzyme belonging to the family 10 of the ALDH superfamily.

2. Materials and methods

2.1. Materials

HEPES, EDTA, betaine aldehyde (BAL) chloride, 3-aminopropionaldehyde (APAL) diethylacetal, 2-mercaptoethanol, NAD⁺ and NADH were obtained from Sigma-Aldrich. The exact concentration of NADH was measured at 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), and that of NAD⁺ was determined by its absorbance at 260 nm ($\epsilon_{260} = 18,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). APAL was prepared freshly by hydrolyzing the corresponding diethylacetal following the method described [30]. The exact concentration of the aldehyde was measured in each experiment by determining the amount of NADH produced after its complete oxidation by pure SoBADH and using the standard assay conditions described below.

2.2. Enzyme purification and kinetic studies

Recombinant SoBADH was over-expressed in BL21(DE3) *E. coli* cells (Agilent) transformed with the plasmid pET28-SoBADH, which contains the full sequence of the *S. oleracea* BADH gene with an N-terminal His-tag, and purified to homogeneity as previously described [21]. SoBADH protein concentration was determined spectrophotometrically, using the molar absorptivity at 280 nm ($\epsilon_{280} = 86,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) predicted from amino acid sequence with ExPASy ProtParam [31].

The dehydrogenase activity was measured spectrophotometrically at 30 °C as reported [21] by monitoring the increase in the absorbance at 340 nm in a mixture (0.5 mL) consisting of 100 mM HEPES-KOH buffer, pH 8, 1 mM EDTA and the indicated aldehyde, NAD⁺ and NADH concentrations. All assays were initiated by addition of the enzyme. One unit of activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μmol of NADH per min under our assay conditions.

2.3. Data analysis

The fitting procedure of the experimentally obtained initial velocity data, or the simulations of saturation curves constructed with fixed theoretical kinetic parameters, was performed using non-linear regression calculations based on the algorithm of Marquardt [32] and the velocity equations given below. In order to evaluate the kind and extent of errors arising if substrate inhibition is ignored, in a second step, from the theoretical curves resulting from the best fit of the complete data set, we selected the estimated velocity data corresponding to a substrate concentration range in which apparently substrate inhibition does not take place (truncated set of data), and then fitted these data to the Michaelis-Menten equation (Eq. (1)). Finally, the estimated apparent kinetic parameters for the truncated data set were compared with those estimated in the first round of fitting using the complete data set, and the differences between these parameters were analyzed. Percentage errors were calculated as $(X_{\text{truncated}} - X_{\text{complete}})/X_{\text{complete}}$, where X is the estimated parameter.

For simulations of the effects of substrate inhibition on the kinetic parameters of monosubstrate reactions, the Michaelis-Menten equation (Eq. (1)) or the modified equations that account for total or partial uncompetitive substrate inhibition (Eqs. (2) and (3), respectively) were used:

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

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

$$v = V_{\max}[S](1 + \beta[S]/K_{IS})/\{K_m + [S](1 + [S]/K_{IS})\} \quad (3)$$

where v is the initial velocity, V_{\max} is the maximal velocity, $[S]$ is the concentration of the variable substrate, β is the factor that describes the effect of substrate inhibition on V_{\max} , K_m is the concentration of substrate at half-maximal velocity, and K_{IS} is the substrate inhibition constant. In Eqs. (2) and (3), and in the equations below corresponding to different mechanisms of substrate inhibition, V_{\max} is the maximal velocity that will be estimated if substrate inhibition does not occur. In Eq. (3), and in other equations corresponding to partial substrate inhibition, the maximal velocity that can be experimentally observed is $V_{\max} \times \beta$. Eq. (3) was also used for the non-linear regression fitting of experimental initial velocity data of the SoBADH enzyme obtained varying the aldehyde substrate at fixed concentration of NAD⁺. Eqs. (2) and (3) were used for simulations of the effects that an inhibitor changed in a constant proportion to the variable substrate has on the kinetic parameters of this substrate. In this case, the term $[S]/K_{IS}$ was substituted by $n[S]/K_{iu}$, in which n is the factor relating the concentration of the inhibitor I to the concentration of the substrate (i.e., $[I] = n[S]$) and K_{iu} is the uncompetitive inhibition constant.

Eqs. (4)–(6) were used for simulations of the effect of uncompetitive substrate inhibition on the kinetic parameters in the presence of competitive, uncompetitive or mixed inhibitors, respectively.

$$v = V_{\max}[S]/\{K_m(1 + [I]/K_{ic}) + [S](1 + [S]/K_{IS})\} \quad (4)$$

$$v = V_{\max}[S]/\{K_m + [S](1 + [I]/K_{iu})(1 + [S]/K_{IS})\} \quad (5)$$

$$v = V_{\max}[S]/\{K_m(1 + n[S]/K_{ic}) + [S](1 + n[S]/K_{iu})(1 + [S]/K_{IS})\} \quad (6)$$

where K_{ic} and K_{iu} are the competitive and uncompetitive inhibition constants, respectively, and the other parameters as defined above.

For simulations of the effects that substrate inhibition has on the apparent kinetic parameters of the other substrate in a Bi Bi steady-state ordered mechanism, Eq. (7) was used for the no-substrate inhibition case, Eq. (8) [33] for competitive total substrate inhibition, and Eqs. (9) and (10) [34] for total and partial uncompetitive substrate inhibition, respectively,

$$v = V_{\max}[A][B]/(K_{iA}K_B + K_B[A] + K_A[B] + [A][B]) \quad (7)$$

$$v = V_{\max}[A][B]/\{K_{iA}K_B(1 + [B]/K_{IS}) + K_B[A] + K_A[B](1 + [B]/K_{IS}) + [A][B]\} \quad (8)$$

$$v = V_{\max}[A][B]/\{K_{iA}K_B + K_B[A] + K_A[B] + [A][B](1 + [B]/K_{IS})\} \quad (9)$$

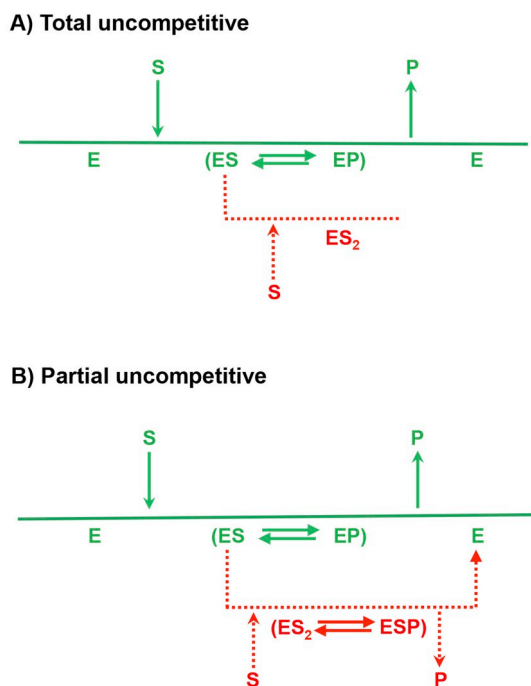
$$v = V_{\max}[A][B](1 + \beta[B]/K_{IS})/\{K_{iA}K_B + K_B[A] + K_A[B] + [A][B](1 + [B]/K_{IS})\} \quad (10)$$

where A is the first substrate to bind to the enzyme, B is the second substrate and the one that exhibits substrate inhibition, K_A and K_B are the Michaelis-Menten constants for substrates A and B, respectively, and K_{iA} is the dissociation constant of A from its complex with the enzyme. The other parameters are as defined above.

3. Results and discussion

3.1. Theoretical simulations of the different kinetic mechanisms of substrate inhibition in monosubstrate reactions

In order to explore the kind and extent of errors arising when estimating the kinetic parameters and determining the kinetic mechanisms if substrate inhibition is intentionally or unintentionally ignored, we first performed theoretical simulations of the possible substrate inhibition mechanisms in monosubstrate reactions. In these reactions, the only plausible mechanisms for substrate inhibition are total or partial



Scheme 1. Mechanisms of substrate inhibition in monosubstrate reactions. A) Total uncompetitive. When the inhibitor substrate molecule binds to the productive enzyme-substrate complex the reaction does not occur. B) Partial uncompetitive. When the inhibitor substrate molecule binds to the productive enzyme-substrate complex the reaction occurs at a decreased rate. The value of the factor β , which is the ratio $V_{\max}^{\text{inhibited}}/V_{\max}^{\text{non-inhibited}}$, indicates the degree of inhibition. In total substrate inhibition $\beta = 0$; in partial substrate inhibition $\beta < 1$.

uncompetitive inhibition (Scheme 1). This is because competitive inhibition—caused either by non-productive binding to the active site or by binding to an allosteric site—does not produce substrate inhibition given that the initial velocity equation for this kind of inhibition is:

$$v = V_{\max}[S]/\{K_m(1 + [S]/K_i) + [S]\}$$

And, therefore, the apparent V_{\max} and K_m values will be both decreased by the same term:

$$\text{app}V_{\max} = V_{\max}/(1 + K_m/K_i); \text{app}K_m = K_m/(1 + K_m/K_i)$$

Since the term $(1 + K_m/K_i)$ does not include the concentration of S ($[S]$), the degree of inhibition is the same at any $[S]$ and substrate inhibition will not be observed. Indeed, the non-productive binding of the substrate or allosteric competitive inhibition by the substrate may not be recognized when studying the kinetics of saturation by S .

The results of uncompetitive substrate inhibition simulations using K_{IS} values equal to K_m , $2.5K_m$, $10K_m$ or $25K_m$, at a fixed β equal to 0.5 (partial inhibition) are shown in Figs. 1A, B, C and D. The results of the simulations varying the β value (zero, 0.25, 0.5 or 0.75) at a fixed K_{IS} equal to $10K_m$ are shown in Figs. E, F, G and H. Panels B and F are an enlargement of panels A and E, respectively, to better show the curves in the low substrate concentration range. The theoretical saturation curves of panels A, B, E and F are depicted by three kinds of lines: the solid ones correspond to those constructed using Eq. (2) or (3), i.e. assuming partial or total uncompetitive substrate inhibition; the dotted lines were constructed using the true kinetic parameters and Eq. (1), i.e., assuming that there is no substrate inhibition; and the dashed lines are the theoretical curves constructed using Eq. (1) and a truncated set of velocity data taken from the simulations of the complete sets of data and selected using the criterion that they apparently do not show substrate inhibition. It can be seen at a glance that, in every one of the simulated conditions, the $\text{app}V_{\max}$ value is well below the true one,

shown by the dotted line, and that can be estimated only when the complete data set showing substrate inhibition is used in the fitting procedure. Also, the dashed-line curves show that the V_{\max} value would be importantly underestimated if the truncated set of data were instead used, even though the higher substrate concentration selected appears to be almost saturating. The errors in the estimation of V_{\max} , K_m and V_{\max}/K_m are shown as percentage of the true values in Figs. 1C and G. As expected, the errors were higher as K_{IS} or β decreased, because of an increased degree of substrate inhibition. Surprisingly, K_m was underestimated in a higher extent than V_{\max} , although Eqs. (2) or (3) show that both parameters will be decreased by the same factor $(1 + [S]/K_{IS})$. This in turn leads to overestimation of V_{\max}/K_m values, regardless of inhibition being total or partial. Interestingly, the percentage of error in the V_{\max}/K_m does not change for a given value of K_{IS} , regardless of the β value, i.e. regardless of β being zero or any other value (Fig. 1G). A closer look to the theoretical curves showed that the initial velocity values estimated at low substrate concentrations when the truncated substrate concentration range was used in the simulation have higher values than those estimated at the same substrate concentrations if the complete concentration range was used (Figs. 1D and H). This is an artifact resulting from the fitting procedure, when the truncated data are attempted to be fitted to the rectangular hyperbola of the Michaelis-Menten equation (Eq. (1)), from which these data deviate, although this deviation is not perceived by visual inspection of the data. The degree of deviation is similar in the total and partial substrate inhibition at a given K_{IS} value, because the initial velocity data measured at substrate concentrations lower than those at which substrate inhibition becomes apparent are only affected by the K_{IS}/K_m ratio.

To explore in more depth these results, we simulate the saturation kinetics when an uncompetitive inhibitor is changed in a constant proportion to the substrate (i.e., $[I] = n[S]$), which is a situation that produces an apparent substrate inhibition. In these simulations we used n values of 1 or 0.2, which are equivalent to a K_{IS} value equal to K_m or $5K_m$, respectively, in substrate inhibition. As can be seen in Fig. 2, the same general behavior was observed, and also the errors in K_m were greater than in V_{\max} when the truncated range of substrate concentration was used in the simulation, regardless of the inhibition being total (shown in Fig. 2B) or partial (Fig. 2E). Again, these different effects can be explained by the fitting of the data of a mechanism exhibiting substrate inhibition to the Michaelis-Menten equation (Eq. (1)). These results clearly show that substrate inhibition does have an impact in the initial velocity data even at apparently not inhibitory concentrations of this substrate. Hence, it is clear the importance of detecting substrate inhibition—by using a concentration range of the substrate as wide as practically reasonable—and considering this phenomenon in the fitting process.

3.2. Theoretical simulations of the effects of ignoring substrate inhibition on the kinetics of inhibitors in monosubstrate reactions

Disregarding substrate inhibition when studying the kinetics of the enzyme in the presence of an inhibitor will also lead to errors in the inhibition constant and inhibition mechanism. We examine these possible errors simulating the effects of total competitive, uncompetitive or mixed inhibitors on the kinetics of an enzyme that exhibits total or partial uncompetitive substrate inhibition, and assuming that the inhibitors do not affect the degree of substrate inhibition. The double reciprocal plots in Fig. 3 show the results of these simulations in the absence of the inhibitor or in its presence, at concentrations equal to K_i (either K_{ic} or $K_{iu} = 5K_m$ in the case of competitive or uncompetitive inhibitors; $K_{ic} = 5K_m$ and $K_{iu} = 10K_m$ in the case of mixed type inhibitors) or $2K_i$, varying K_{IS} from a value equal to K_m to $25K_m$ and keeping β constant at 0.5. Qualitatively similar double reciprocal plots were obtained when β was varied from zero to 0.75 and K_{IS} kept fixed at $10K_m$ (not shown). The most striking result was that a competitive inhibitor could be mistaken for a mixed inhibitor if the truncated set of

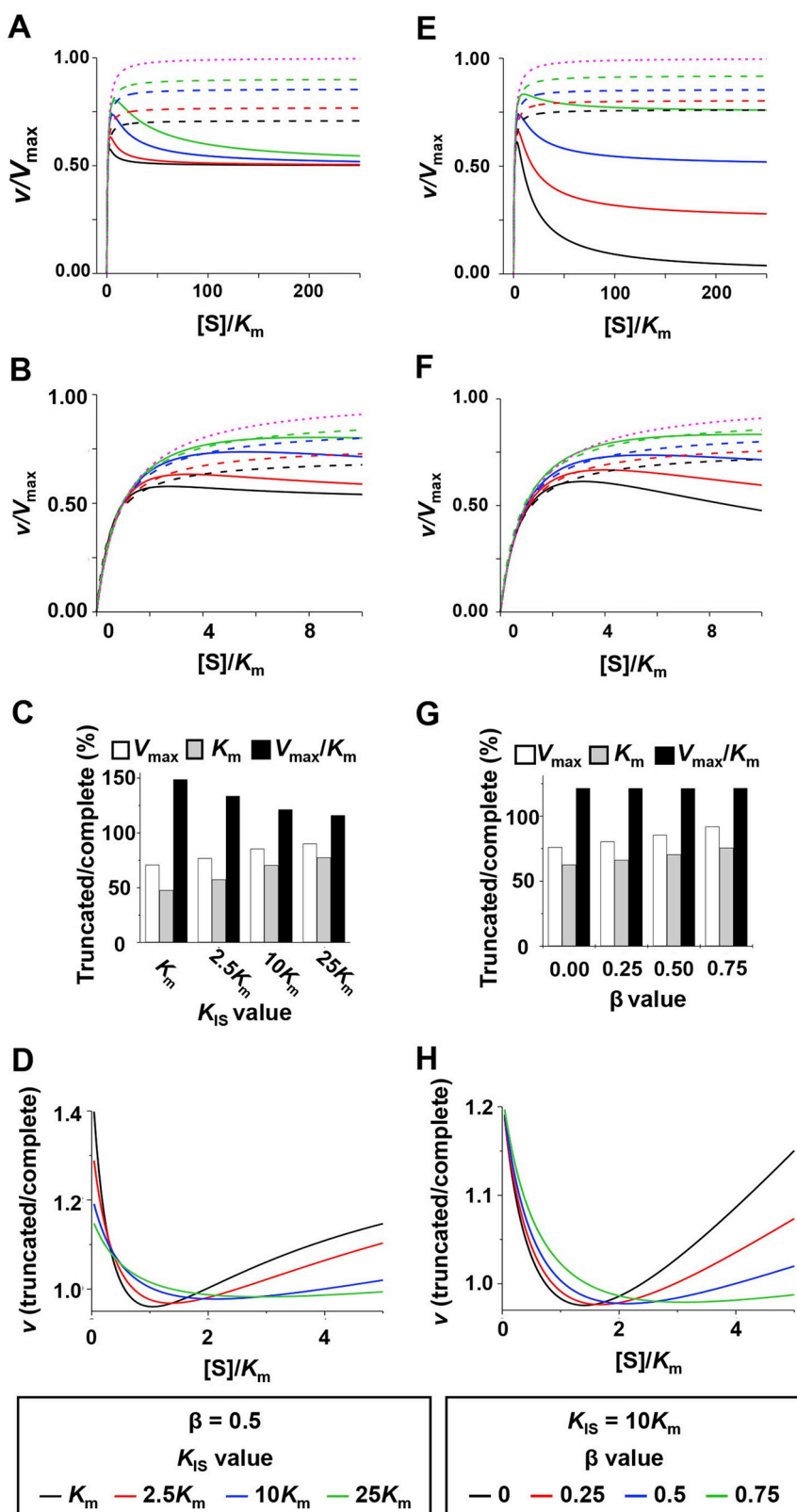


Fig. 1. Simulations of uncompetitive substrate inhibition in monosubstrate reactions. A) Theoretical saturation curves at fixed $\beta = 0.5$ and K_{IS} values from K_m to $25K_m$. B) Enlargement of the data shown in panel A to better depict the saturation curves in the lower substrate concentration range. In both panels, the dotted magenta line is the saturation curve corresponding to a reaction that does not exhibit substrate inhibition, and was generated using Eq. (1) and V_{max} and K_m values arbitrarily fixed at 100 and 1, respectively; solid lines are saturation curves showing substrate inhibition and were generated using Eq. (3) and the same V_{max} and K_m values; dashed lines were generated using a truncated set of the data comprising only those substrate concentrations that apparently do not exhibit substrate inhibition and fitting these data to Eq. (1). C) Values of the apparent kinetic parameters estimated using the truncated sets of data fitted to Eq. (1) as percentage of the values estimated using the complete sets of data fitted to Eq. (2); β was fixed at 0.5 and K_{IS} was varied as in panels A and B. D) Quotients resulting from dividing the velocity values at low substrate concentrations estimated using the truncated set of data and Eq. (1) by the velocity values estimated using the complete set of data and Eq. (3). E, F, G, and H) Same as A, B, C and D, respectively, but fixing $K_{IS} = 10K_m$ and varying β values as indicated.

initial velocity data is used in the simulations (Fig. 3A). This is because the effects that truncating the data has on the estimation of the kinetic parameters are greater in the presence of the inhibitor than in its absence, thus leading to a progressive decrease in the $appV_{max}$ as $[I]$ increases (Fig. 3B). The $appK_m$ values estimated with the truncated data set in the absence of the inhibitor are lower than the real value, again

because of the effects of ignoring substrate inhibition, and although they increase as $[I]$ increases as expected for a competitive inhibitor, they always remain below the apparent value estimated at a particular inhibitor concentration (Fig. 3C). As a consequence, V_{max}/K_m is overestimated at any inhibitor concentration (Fig. 3D). The inhibition pattern of uncompetitive inhibition (Fig. 3E) is also changed although in a

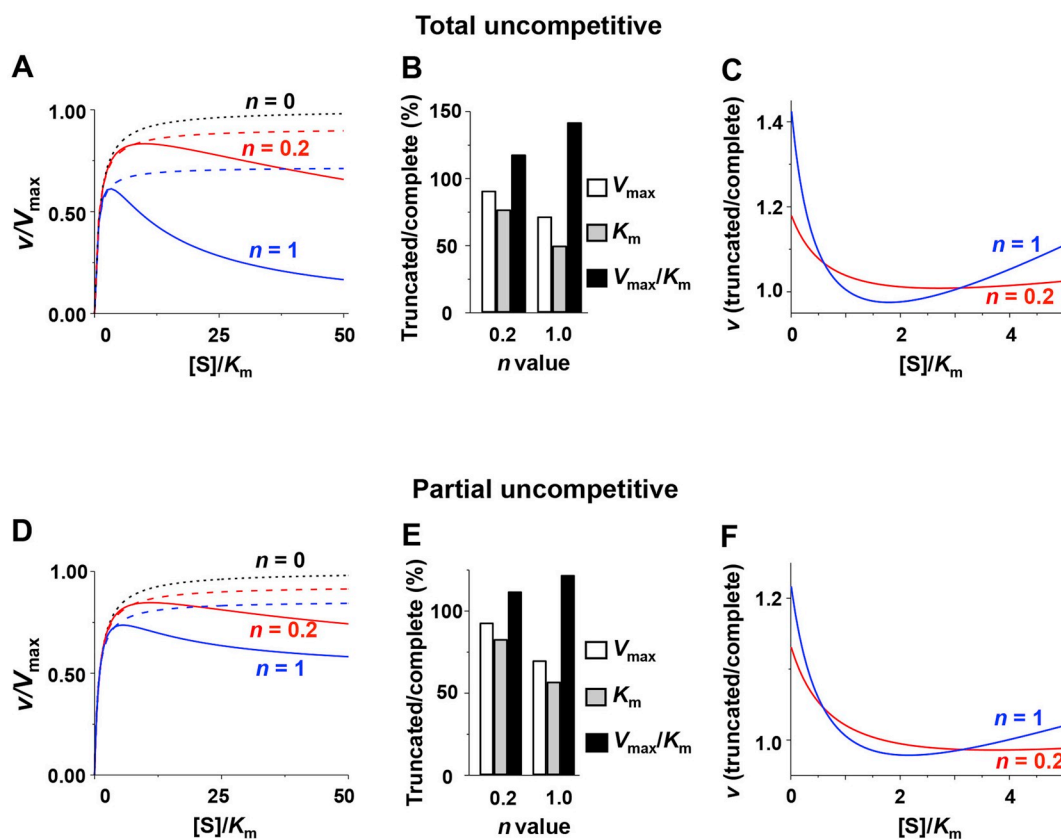


Fig. 2. Effects of an uncompetitive inhibitor varied in a constant proportion to the substrate in monosubstrate reactions. A) Theoretical saturation curves constructed in the presence of a total uncompetitive inhibitor. The dotted black line is the saturation curve in the absence of the inhibitor ($n = 0$), and was generated using Eq. (1). Solid lines are those simulated in the presence of inhibitor and were generated using Eq. (2) and assuming $K_i = 10K_m$. Dashed lines were simulated using truncated sets of the data comprising only those substrate concentrations that apparently do not show inhibition and fitting these data to Eq. (1). B) Values of the apparent kinetic parameters estimated using the truncated sets of data fitted to Eq. (1), expressed as percentage of the values estimated using the complete sets of data fitted Eq. (2). C) Quotients resulting from dividing the velocity values at low substrate concentrations estimated using the truncated set of data and Eq. (1) by the velocity values estimated using the complete set of data and Eq. (2). D, E and F) Same as in A, B and C, respectively, but for a partial uncompetitive inhibitor. Eq. (3) was used to generate the saturation curves in the presence of the inhibitor (solid lines).

minor degree than that of competitive inhibition, so that a parallel pattern could still be considered. But in fact the simulated lines intersect in some point in the first quadrant! This is because the decrease of the estimated $\text{app}V_{\max}$ value when the truncated set of data is fitted to the Michaelis-Menten equation (Eq. (1)) in the absence of the inhibitor becomes progressively less important as the concentration of the inhibitor increases (Fig. 3F), even though the changes are small and may be unnoticed. Similarly, there is a small change provoked by the presence of the inhibitor in the $\text{app}K_m$ values estimated with the truncated set of data, which slightly increase with respect to the expected ones (Fig. 3G). As the inhibitor concentration has similar effects on the estimation of both apparent parameters using the truncated data set, the V_{\max}/K_m remains constant, although overestimated, at any inhibitor concentration (Fig. 3H). In regard to the mixed inhibitor, the characteristic pattern of intersecting lines is conserved (Fig. 3I), and the effects of truncating the data in the estimation of the apparent kinetic parameters are slightly affected by the presence of the inhibitor (Figs. 3J, K and L). In summary, the general trends are that the errors in the estimation of the true kinetic parameters of the enzyme would be increased in the presence of a competitive inhibitor and almost not affected in the presence of uncompetitive or mixed inhibitors. But still, the inhibition patterns are clearly affected, particularly in the case of competitive and mixed inhibitors.

With respect to the errors in the estimation of K_i values, Fig. 3M shows that the estimated $\text{app}K_{ic}$ value for a competitive inhibitor when the truncated data set was used is significantly higher than that estimated for the complete data set at the β and K_{IS} values of our

simulations, and also a non-existent uncompetitive component of the inhibition appeared (values not-shown). For an uncompetitive inhibitor the K_{iu} value is overestimated at the lower K_{IS} values used in the simulations but this effect is reverted when these values are increased (Fig. 3N). With respect to the mixed inhibitor, the K_{ic} value is overestimated at low K_{IS} , although not as much as in the case of a competitive inhibitor, but this effect was reverted at higher K_{IS} values (Fig. 3O). On the contrary, the K_{iu} value is slightly underestimated regardless of K_{IS} values (Fig. 3P). Again, qualitatively similar results were obtained when β was varied from zero to 0.75 and K_{IS} kept fixed at $10K_m$ (not shown).

3.3. Theoretical simulations of the different kinetic mechanisms of substrate inhibition by substrate B in Bi Bi ordered steady-state reactions

The simulations for the monosubstrate reactions described above could be used in a bisubstrate reaction if when varying the concentration of the substrate that exhibits substrate inhibition the other substrate is kept fixed. But since ALDH enzymes follow a Bi Bi ordered steady-state mechanism in which the aldehyde is the second substrate to add to the enzyme (substrate B), we were interested in exploring the effects that varying the concentration of substrate A may have on the substrate inhibition by B, as well as the effects that substrate inhibition by B may have on the estimation of the apparent kinetic parameters for A. In these simulations we only consider the three mechanisms of substrate inhibition depicted in Scheme 2: total competitive against substrate A, and total and partial uncompetitive, both against substrate

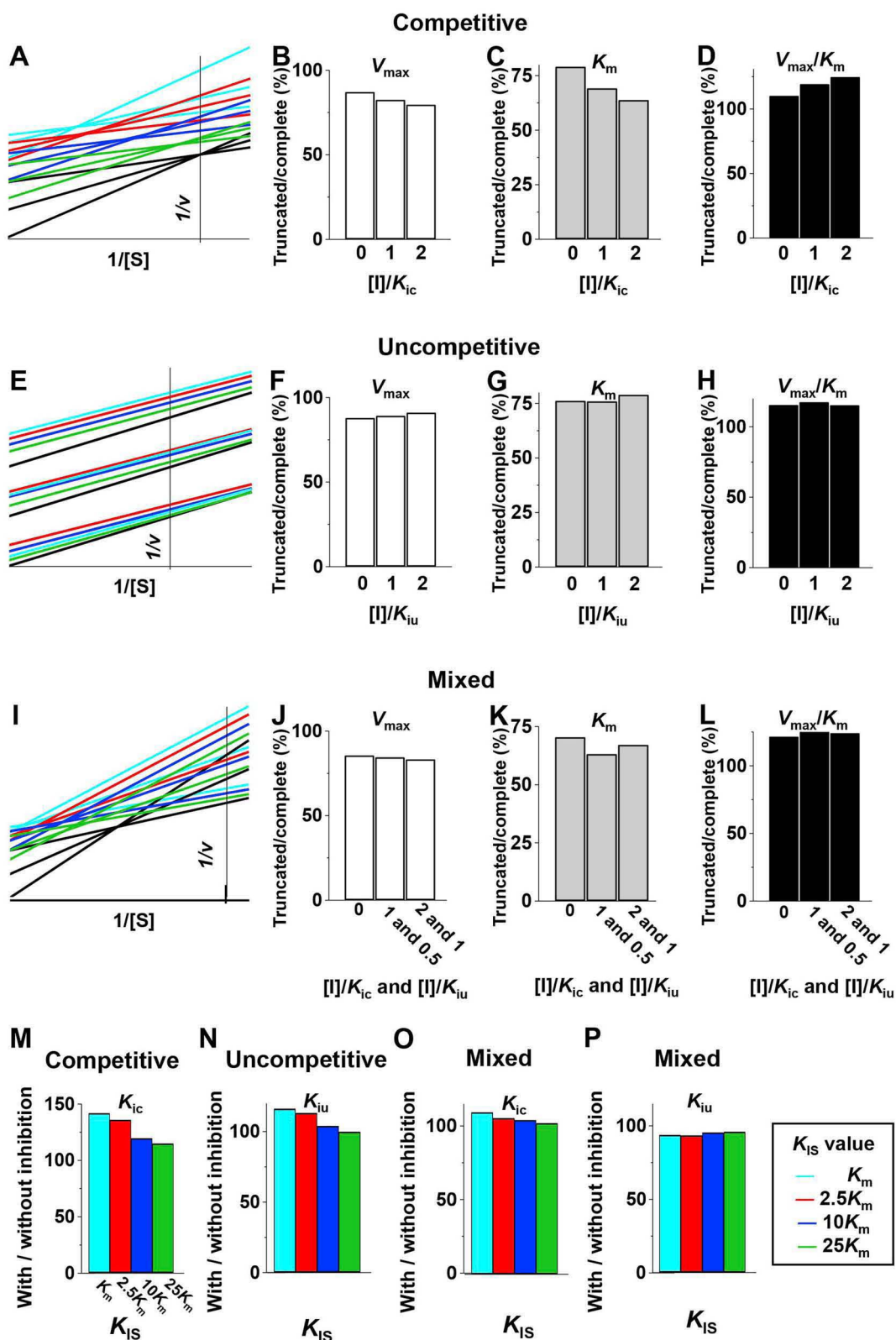
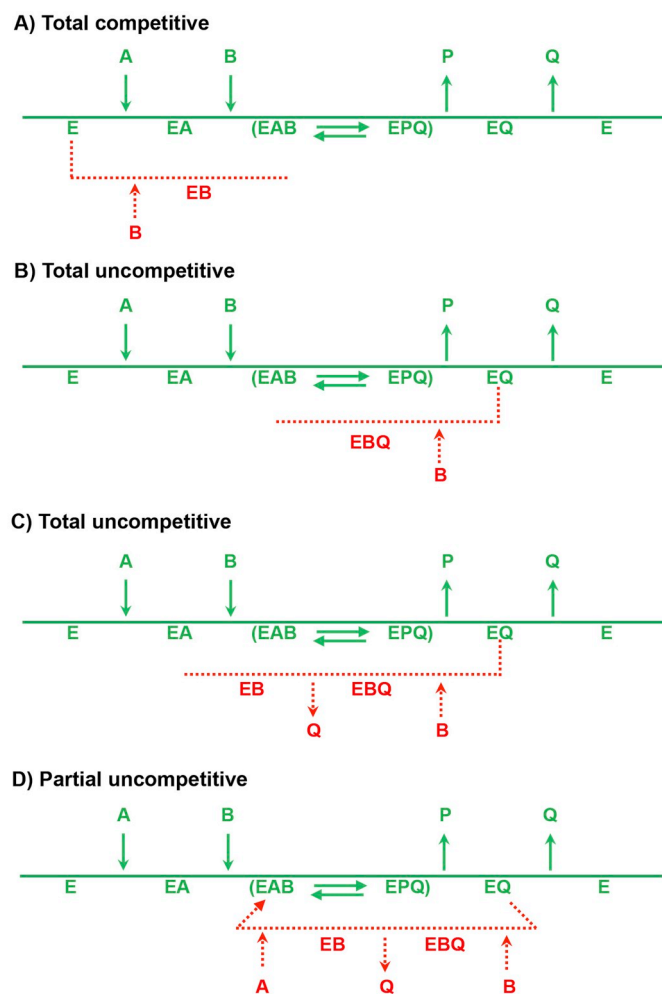


Fig. 3. Effects of partial uncompetitive substrate inhibition on the kinetics in the presence of an inhibitor in monosubstrate reactions. A) Inhibition patterns of a total competitive inhibitor in the absence of substrate inhibition (black lines), or when partial uncompetitive substrate inhibition takes place (colored lines). β was fixed to 0.5, K_{is} varied from K_m to $25 K_m$ and $[I]$ was 0, $5K_i$ or $10K_i$. B, C and D) Effect of the inhibitor concentration on the error of the values of the apparent V_{max} , K_m or V_{max}/K_m estimated using truncated sets of data at the different inhibitor concentrations individually fitted to Eq. (1) and expressed as percentage of the values estimated using complete sets of data fitted to Eq. (4). E, F, G and H) Same as in A, B, C and D but for a total uncompetitive inhibitor and using Eq. (5). I, J, K and L) Same as in A, B, C and D but for a total mixed inhibitor and using Eq. (6). M, N, O and P) Effect of varying K_{is} on the app K_i values estimated using the truncated sets of data and Eq. (1) and expressed as percentage of the values estimated using the complete sets of data and Eqs. (4) and (5) or 6, as appropriate.



Scheme 2. Mechanisms of substrate inhibition by substrate B in Bi Bi ordered steady-state mechanisms. A) Total competitive against substrate A. Substrate A cannot bind to the EB complex. B and C) Total uncompetitive. Substrate B forms the abortive complex EBQ from which either the product Q cannot be released (panel B), or if released the resulting complex EB cannot bind substrate A (panel C). D) Partial uncompetitive substrate inhibitions. This mechanism is the postulated for some ALDH enzymes where at high aldehyde concentrations the binding of the aldehyde (B) to the enzyme-NAD(P)H (EQ) complex results in the formation of the non-productive ternary complex enzyme-NAD(P)H-aldehyde (EBQ) from which NAD(P)H (Q) can leave thus leading to the formation of an enzyme-aldehyde complex (EB) which binds NAD(P)⁺ to forms the productive enzyme-NAD(P)⁺-aldehyde (EAB) complex. Either the release of NAD(P)H or the addition of NAD(P)⁺ to the enzyme-aldehyde complex is slower than in the main reaction pathway. Substrate inhibition thus results from the establishment at high concentrations of aldehyde of an alternative slower route of reaction.

A and B, as these are the plausible mechanism of substrate inhibition by substrate B in a Bi Bi ordered steady-state reaction.

Total competitive inhibition of substrate B against substrate A can arise if B abolishes the binding of A to the free enzyme. It could be thought that partial competitive inhibition could originate if B binds first to the enzyme somehow decreasing the binding of A but A could still add to the EB complex to form the ternary productive EAB complex. However, this is in fact a random mechanism of substrate addition with a preferred route of addition of substrates, and it would not give rise to substrate inhibition. The same reasoning applies for total or partial mixed inhibition because both mechanisms imply random addition of substrates. Indeed, in Bi Bi ordered steady-state mechanisms the most common kind of substrate inhibition is uncompetitive, in which substrate B forms an abortive ternary complex EQB from which Q may or may not dissociate (partial or total uncompetitive inhibition,

respectively) as shown in Scheme 2. Based on these considerations, we simulated these three mechanisms, i.e. total competitive and total and partial uncompetitive, using Eqs. (8)–(10), the latter derived using the King-Altman method [35]. It has to be noticed that while in the case of total competitive inhibition the K_{IS} value is the dissociation constant of substrate B from the EB complex, in the case of total or partial uncompetitive inhibition K_{IS} is not the dissociation constant of B from the complex EBQ, so that its value may be different from this dissociation constant, depending on the steady-state levels of EQ and the ternary EAB-EPQ complexes [34].

For the simulations shown in Figs. 4 and 5 we consider $K_{IS} = 10K_B$ and $\beta = 0$ or 0.5, but qualitatively similar results were obtained with other K_{IS} and β values (not shown); logically, the effects on the kinetics would be greater at lower K_{IS} and β values. The solid lines in this figure are saturation curves generated using Eqs. (8), (9) or (10), as appropriate; while the dashed lines were constructed using the same kinetic parameters and Eq. (7), i.e., assuming that there is no substrate inhibition by B. The theoretical curves for total competitive inhibition constructed when the concentration of B is varied at several fixed concentrations of A (Fig. 4A, solid lines) show that these curves progressively approach the non-substrate inhibition curves (Fig. 4A, dashed lines) as [A] increases, an effect that may lead to not observing substrate inhibition at high [A]. Accordingly, the $appK_{IS}$ value greatly increases with [A] (Fig. 4B), which is consistent with the competitive nature of this inhibition since a high [A] will prevent the binding of the inhibitor B molecule. Regarding the effects that substrate inhibition by B has on the kinetics when A is the variable substrate, in the case of competitive inhibition our simulations show that the concentration of B has no effect on the $appV_{max}$ but does have significant effects on the $appK_A$ value at B concentrations higher than K_B , even if these concentrations are lower than its K_{IS} (Fig. 4C).

In total and partial uncompetitive substrate inhibition by B there are important decreases of the $appV_{max}$ values at [B] above K_B and the $appK_{IS}$ values decrease as [A] increases (Figs. 4D, E, G and H), so that substrate inhibition is increased at high [A], also as expected. In both mechanisms the K_{IS} decreases and reaches its real value at saturation of the enzyme by A. Indeed, in the total and partial uncompetitive mechanism, at the K_{IS} value used in these simulations, the effects of the substrate inhibition by B on the saturation kinetics of A would negligible at [B] below or equal to K_B , but would be very important as [B] approaches or exceeds the K_{IS} value (fixed at $10K_B$ in our simulations). Note that in panels F and I while at [B] = K_B the curves generated assuming substrate inhibition (solid lines) and those generated assuming no-substrate inhibition (dashed lines) superimpose, at higher [B] they greatly separate, so that the formers tend to approach, or even be below, those constructed at the lowest [B].

In Fig. 5 we summarize these results by comparing the simulated saturation curves for the three mechanisms of inhibition, as well as the errors in the estimation of the apparent kinetic parameters derived from not considering substrate inhibition in both the saturation kinetics by B and by A. If substrate inhibition by substrate B is ignored in the saturation by B, the estimated apparent values for both V_{max} and K_B values will be lower than those estimated considering substrate inhibition, but K_B will be underestimated in a greater extent than V_{max} resulting in increased V_{max}/K_B values, regardless of the mechanism of substrate inhibition—i.e. competitive total and uncompetitive total or partial. If substrate inhibition by substrate B is ignored in the saturation by A in a total competitive substrate inhibition the $appV_{max}$ is not affected but $appK_A$ values will be greatly higher than those estimated if substrate inhibition is considered, leading to a important errors in V_{max}/K_A values. In the case of total uncompetitive inhibition, both V_{max} and K_A will be underestimated by the same factor so that V_{max}/K_A values will be unchanged. But in the case of partial uncompetitive inhibition, the three estimated parameters will be erroneous since K_A decreases in a greater extent than V_{max} resulting in increased V_{max}/K_A values, as it happens in the saturation by B at fixed A.

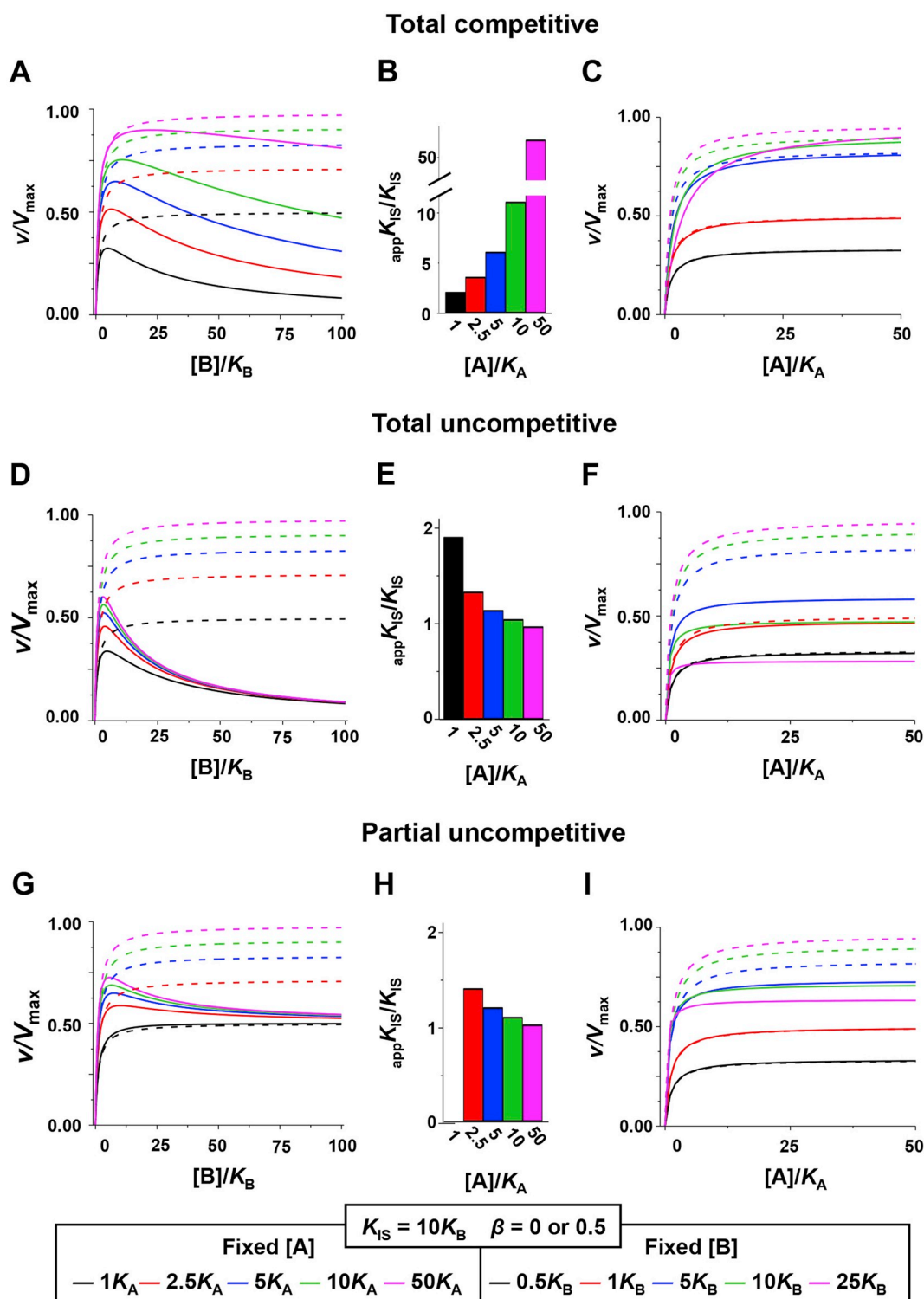


Fig. 4. Simulations of inhibition by substrate B in a Bi Bi ordered steady-state reaction. A) Saturation curves varying B at $[A]/K_A$ 1, 2.5, 5, 10 or 50 when total competitive substrate inhibition of B against A takes place. Solid lines were generated using $K_{IS} = 10K_B$ and Eq. (8). Dashed lines were generated assuming that there is no substrate inhibition and using Eq. (7). B) Effect of $[A]$ on the estimated $app K_{IS}$, expressed as times the fixed K_{IS} value used in the simulations. C) Effect of $[B]$ on the saturation by A. Solid lines are saturation curves varying A at $[B]/K_B$ 0.5, 1, 5, 10 or 25; Eq. (8) and $K_{IS} = 10K_B$ were used in these simulations. Dashed lines correspond to saturation curves simulated with the same kinetic parameters and $[B]$ values but assuming that there is no substrate inhibition by B and using Eq. (7). D, E and F) Same as A, B and C, respectively, but for total uncompetitive substrate inhibition by B. Eq. (9) was used in these simulations. G, H and I) Same as A, B and C, respectively, but for partial uncompetitive substrate inhibition by B. Eq. (10) was used in these simulations.

In conclusion, overlooking substrate inhibition by B in a Bi Bi ordered steady-state mechanism would not only lead to serious errors in the estimation of the kinetic parameters when B is the variable substrate—similar to those observed in the monosubstrate reaction—, but

also in the estimation of these parameters when A is the variable substrate. Unfortunately, it is a common practice to perform the saturation by A at a fixed high concentration of B—trying in this way to obtain saturation by B and therefore estimate the V_{max} of the reaction and the

true K_A —and vice versa, performing the saturation by B at a fixed high concentration of A with the same aims. A high concentration of B may be inhibitory and a high concentration of A will increase the degree of inhibition by B. Therefore, both practices could lead to serious errors in the estimation of the values of the kinetic parameters.

3.4. The kinetics of SoBADH confirm that incorrect kinetic parameters are estimated if substrate inhibition is not taken into account

In order to exemplify with experimental data the errors in the

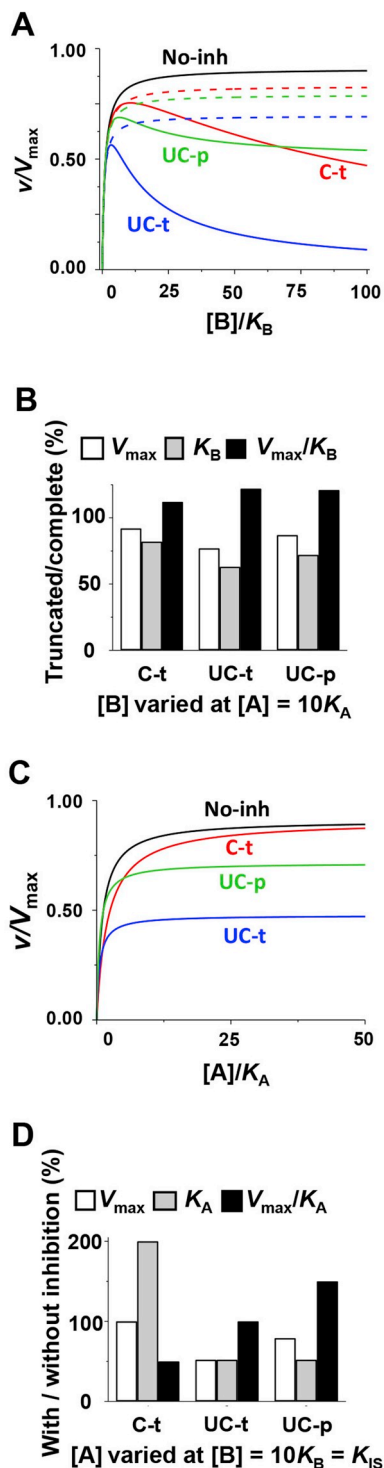


Fig. 5. Effects of inhibition by substrate B on the apparent kinetic parameters of both substrates in ordered Bi Bi steady-state bisubstrate reactions. A) Theoretical saturation curves varying B at $[A] = 10K_A$ simulated at $K_{IS} = 10K_B$ and $\beta = 0$ or 0.5, as appropriate. Solid color lines were generated using Eq. (8) for total competitive substrate inhibition (C-t), Eq. (9) for total uncompetitive substrate inhibition (UC-t) or Eq. (10) for partial uncompetitive substrate inhibition (UC-p). The solid black line is the theoretical saturation curve simulated with the same kinetic parameters and fixed $[B]$, but assuming that there is no substrate inhibition and using Eq. (7). Dashed color lines were simulated using a truncated set of the data comprising only those $[B]$ that apparently do not show inhibition and fitting these data to Eq. (7). B) Errors of the values of the apparent kinetic parameters obtained varying substrate B at fixed $[A] = 10K_A$ and estimated using the truncated set of data and Eq. (7). Errors are expressed as percentage of the values estimated using the complete set of data and Eq. (8), which corresponds to uncompetitive partial substrate inhibition. C and D) Same as A and B, respectively, but varying $[A]$ at fixed $[B] = 10K_B$.

estimation of kinetic parameters that arise if the initial velocity data are obtained in a concentration range that apparently does not produce substrate inhibition, we analyzed the results of SoBADH saturation experiments with two alternate substrates differing in their affinity for the enzyme, and also in the absence and presence of the product NADH. SoBADH is a NAD^+ -dependent ALDH10 enzyme that oxidizes betaine aldehyde (BAL), which is its physiological substrate, and other different ω -aminoaldehydes such as 3-aminopropionaldehyde (APAL). This enzyme even exhibits a higher affinity for APAL and other ω -aminoaldehydes than for BAL, as assessed by their respective K_m values [21].

As it was said in the Introduction section, several mechanisms have been proposed to explain substrate inhibition by the aldehyde in ALDH enzymes. Of these, the non-productive binding of the aldehyde substrate inhibitor in competition with the productive aldehyde substrate has to be discarded because substrate inhibition will not be observed [34], as discussed above. In the SoBADH enzyme, we also ruled out total competitive substrate inhibition against NAD^+ arising from the binding of the aldehyde to the coenzyme-binding site because of the finding that substrate inhibition by the aldehyde is not only not abolished but enhanced when NADH is added to the assay medium in another plant BADH also of the ALDH10 family [14]. Indeed, this finding supports the partial mechanism of substrate inhibition involving the formation of the E-NAD(P)H-aldehyde. Therefore, for the following analysis of the experimental data of aldehyde substrate inhibition of the SoBADH enzyme at a fixed 0.2 mM NAD^+ (approximately equal to $10K_m^{NAD^+}$) we consider the simple equation for partial uncompetitive substrate inhibition of a monosubstrate reaction, given that the simulations shown in Section 3.3 show that in a Bi Bi ordered steady-state kinetic mechanism at this high concentration of the first substrate the K_{IS} of the second substrate is close to its real value.

Partial substrate inhibition was observed with BAL and APAL when the complete two sets of experimental initial velocity data were fitted to Eq. (3) (solid lines in Fig. 6). The dotted lines in this figure are hypothetical saturation curves simulated using the Michaelis-Menten equation (Eq. (1)), as if substrate inhibition does not take place, and the apparent V_{max} and K_m values estimated from the fit of experimental data of each enzyme to the partial substrate inhibition equation (Eq. (3)). The dashed lines result from the fit of only the data obtained at substrate concentrations apparently non-inhibitory, enclosed in a dotted box in the figure. As can be visually assessed, and shown in Table 1, if we had only considered in our study this shorter range of substrate concentration, in which apparently there is no substrate inhibition, we would have underestimated the apparent V_{max} and K_m values (Figs. 6C and G). The K_m values have greater errors than the V_{max} values, in agreement with the results of the theoretical simulations described in section 3.3. Also in agreement with the theoretical simulations, when we used the truncated set of data for the fitting procedure the velocity data for both substrates estimated at concentrations below

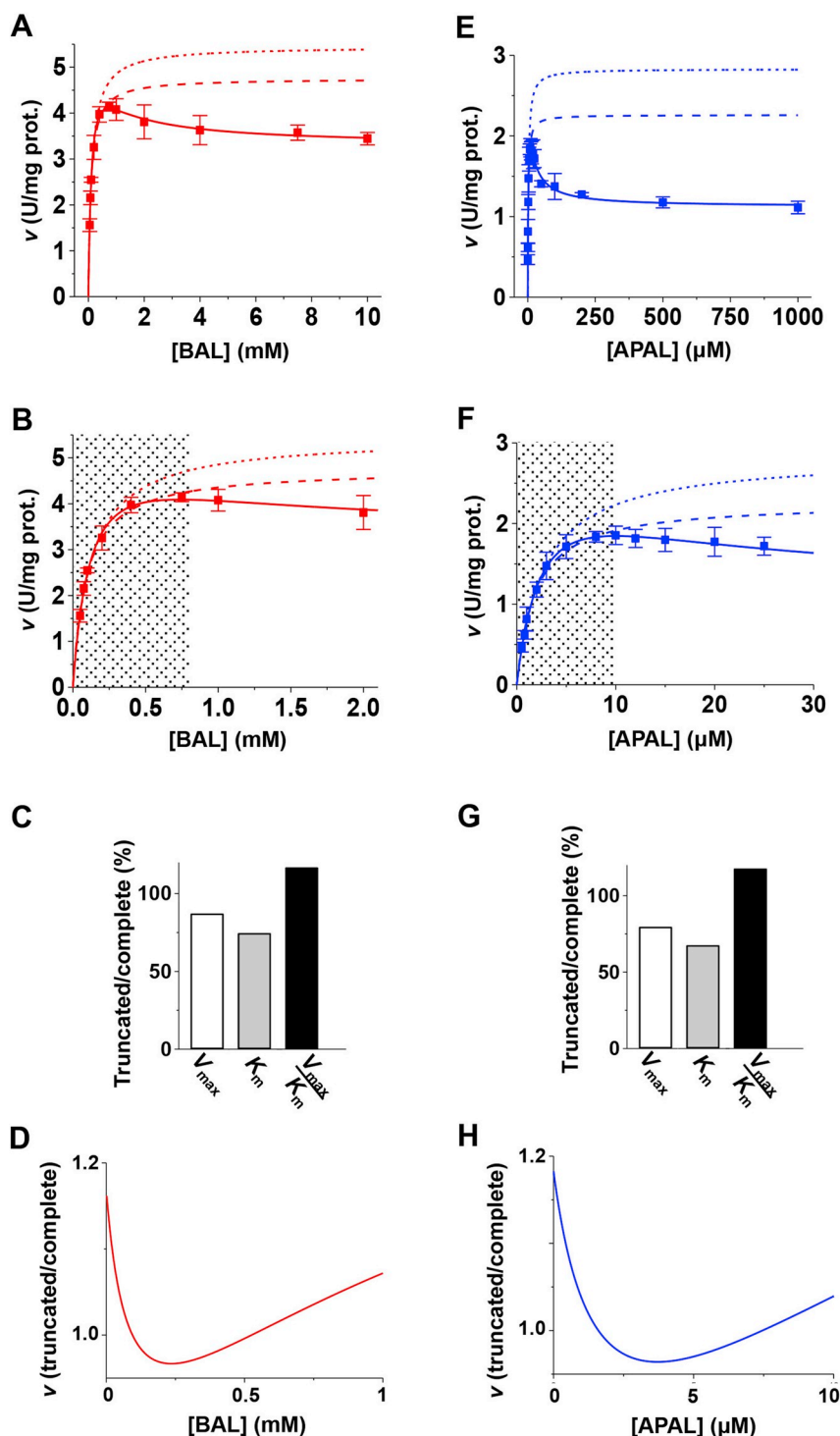


Fig. 6. Aldehyde substrate inhibition of SoBADH. A and B) Saturation curves by BAL. In panel B is shown the saturation curve in the lower substrate concentration range. Solid lines are calculated from the best fit of the complete sets of experimental data to the equation that accounts for partial uncompetitive substrate inhibition (Eq. (3)). Dashed lines were generated by fitting the truncated sets of data, i. e., considering only those data that apparently do not show substrate inhibition (enclosed in a dotted box) to the Michaelis–Menten equation (Eq. (1)), thus ignoring substrate inhibition. The dotted lines are hypothetical saturation curves simulated using the Michaelis–Menten equation (Eq. (1)), as if substrate inhibition had not taken place, and the V_{max} and K_m values estimated using the complete sets of data and Eq. (3). C) Values of the apparent kinetic parameters estimated using the truncated sets of data and Eq. (1), expressed as percentage of the values estimated using the complete sets of data and Eq. (3). D) Quotients resulting from dividing the velocity values at low substrate concentrations estimated using the truncated sets of data and Eq. (1) by the velocity values estimated using the complete sets of data and Eq. (3). E, F, G and H) Same as in A, B, C and D, respectively, but using APAL as the variable substrate. Assays were carried out at pH 8.0 and fixed 0.2 mM NAD^+ . Other experimental details are described in the Experimental section. The points are the mean \pm S.D of experimental initial velocity values from two independent experiments.

their respective K_m values were higher than those estimated when the complete data sets were used in the fitting (Figs. 6D and H), thus accounting for the greater errors in K_m . The estimated K_{IS} value was about 60-fold lower for APAL than for BAL, which when compared with the differences in K_m between the two substrates, about 46-fold lower for APAL than for BAL (Table 1), suggests that the steady-state levels of the E-NADH complex to which the substrate binds to produce substrate inhibition are higher in the reaction with APAL than with ABAL. This is also suggested by the differences in the estimated β values of the two substrates, which for APAL is 33% lower than that for BAL (Table 1). Also as expected, when the degree of substrate inhibition increases, the percentage error of the estimated parameter increases.

In Fig. 7A and B is shown the saturation curve by BAL at 25 μM NAD^+ (approximately $2.5K_m^{NAD^+}$) in the presence of 150 μM $NADH$. It is clear that $NADH$ increases the degree of substrate inhibition by BAL, as indicated by the lower $appK_{IS}$ value and, particularly, the much lower β values estimated in the presence of the inhibitor (Table 1). In this case the difference in the $appK_{IS}$ (about 60% of the value in the absence of $NADH$) appears to be smaller than the difference in β , which is about 30% of the value in the absence of $NADH$, but it has to be noticed that the $[NAD]^+$ was 200 μM in the absence of $NADH$ and only 25 μM in its presence, and that in the uncompetitive mechanism of substrate inhibition by B the $appK_{IS}$ value is highly dependent on the concentration of substrate A, decreasing when [A] increases, as shown

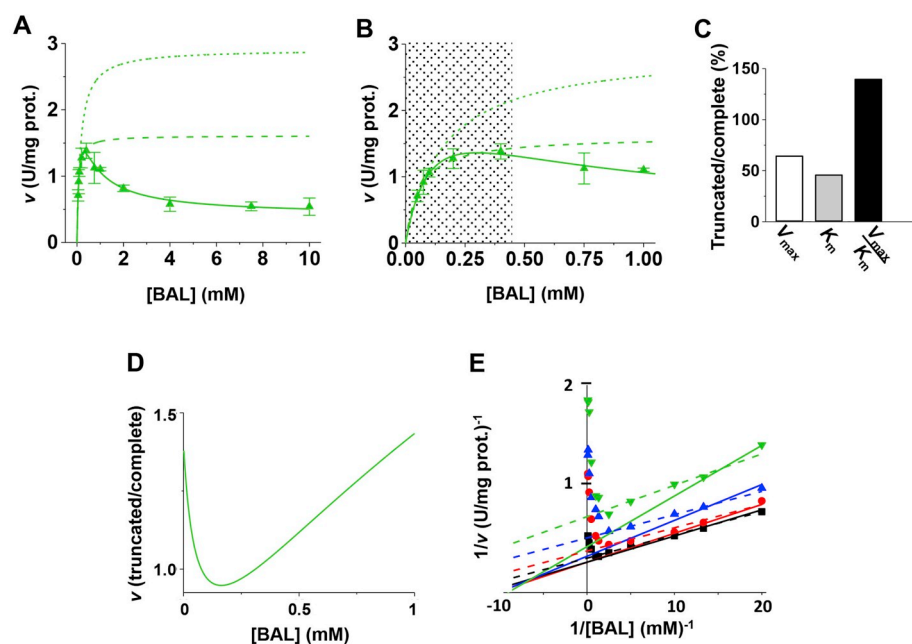


Fig. 7. Effect of NADH on the degree of BAL inhibition of SoBADH. A and B) Saturation by BAL at fixed 25 μM NAD^+ in the presence of 150 μM NADH. Other experimental details are as in the legend of Fig. 6. In panel B is shown the saturation curve in the lower substrate concentration range. The solid, dashed and dotted lines were calculated as in Fig. 6. The points are the mean \pm S.D. of experimental initial velocity data from two independent experiments. C) Values of the apparent kinetic parameters estimated using the truncated set of data and Eq. (1), expressed as percentage of the values estimated using the complete set of data and Eq. (3). D) Quotients resulting from dividing the velocity values at low substrate concentrations estimated using the truncated set of data and Eq. (1) by the velocity values estimated using the complete set of data and Eq. (3). E) Effect of substrate inhibition by BAL on the inhibition pattern of NADH against BAL. NADH concentrations were 0 (black squares and black lines), 25 (red circles and red lines), 50 (blue up-triangles and blue lines) or 100 (green down-triangles and green lines) μM . BAL concentrations were varied from 50 μM to 10 mM. In the double reciprocal plots, the solid lines were drawn using the kinetic parameters estimated at each [NADH] with the corresponding complete set of data individually fitted to Eq. (3); the dashed lines were drawn using the kinetic parameters estimated with the truncated sets of data fitted to Eq. (1).

Table 1

Effect of ignoring substrate inhibition on the apparent kinetic parameters of SoBADH with the alternate substrates BAL and APAL and in the presence of NADH.

Parameter ^a	Complete data set ^b	Truncated data set ^c	Error (%)
BAL			
V_{max}	5.4 ± 0.3	4.8 ± 0.1	-11
K_m	123 ± 13	92 ± 7	-25
V_{max}/K_m	4.4×10^{-2}	5.2×10^{-2}	+18
K_{IS}	862 ± 302	—	—
β	0.60 ± 0.03	—	—
APAL			
V_{max}	2.8 ± 0.1	2.3 ± 0.1	-18
K_m	2.7 ± 0.3	1.8 ± 0.2	-33
V_{max}/K_m	1.0	1.3	+30
K_{IS}	14.6 ± 2.7	—	—
β	0.40 ± 0.02	—	—
BAL + NADH			
V_{max}	2.5 ± 0.3	1.6 ± 0.0	-36
K_m	124 ± 27	57 ± 6	-54
V_{max}/K_m	2.0×10^{-2}	2.8×10^{-2}	+40
K_{IS}	510 ± 151	—	—
β	0.16 ± 0.02	—	—

^a Values \pm S.D. were estimated by the best fit of the initial velocity data given in Fig. 6 to Eq. (3) (complete data set) or to Eq. (1) (truncated data set).

^b The concentration range of BAL or APAL used allowed the observation of partial substrate inhibition.

^c Only the data that apparently did not show substrate inhibition were considered in the fitting process. V_{max} is given as units/mg protein (specific activity); K_m and K_{IS} as μM . Assays were carried out at 30 $^\circ\text{C}$ in 100 mM HEPES-KOH, pH 8.0, containing 1 mM EDTA and 200 μM NAD^+ or 25 μM NAD^+ plus 150 μM NADH.

in Fig. 4H. Thus, these effects are the consequence of the increased steady-state levels of the complex E-NADH to which the inhibitory BAL molecule binds, so that a greater proportion of the reaction is diverted to the alternative, slower route of product release, resulting in a greater decrease in the app V_{max} value. Regarding the errors in the estimation of the kinetic parameters (Fig. 7C and D), they were of the same kind as

those in the absence of NADH but more important, due to the increased degree of substrate inhibition induced by this inhibitor.

In the ordered steady-state mechanism followed by ALDH enzymes, the last product to leave the enzyme, NADH, is a mixed inhibitor against the second substrate to add to the enzyme, BAL, and therefore an intersecting inhibition pattern should be expected when the initial velocity data in the absence and presence of different fixed concentrations of NADH are depicted as double reciprocal plots. In Fig. 7E we show the results obtained in the saturation by BAL in the absence and presence of three different concentrations of NADH. We would have observed apparent parallel lines (dashed lines) if we had considered only the data that apparently did not show substrate inhibition (truncated set of data). Therefore, we would have concluded that NADH is an uncompetitive inhibitor against BAL and, consequently, that the aldehyde binds to the enzyme before NAD^+ . However, the lines generated using the apparent kinetic parameters V_{max} and K_m obtained from the fit of the whole set of experimental initial velocity data to the equation of partial substrate inhibition (solid lines) do intersect at the left of the $1/v$ axis, indicating mixed inhibition, as it is expected if the aldehyde binds after NAD^+ , thus confirming the order of substrate addition to the enzyme.

4. Concluding remarks

Together, the results of the theoretical kinetic simulations and of the analysis of the experimentally determined kinetic data of SoBADH performed in this work show that ignoring substrate inhibition causes potentially important errors in the determination of the kinetic parameters not only of the substrate that produce inhibition but also of the other substrate in bisubstrate reactions, as well as of inhibitors, which most likely could also be true for activators. And as a consequence, kinetic mechanisms may be grossly mistaken. Since ALDH enzymes are so prone to experience substrate inhibition by the aldehyde, we strongly recommend that, in order to properly determine their kinetic parameters and their kinetic mechanisms, the initial velocity experiments should be performed using a range of aldehyde concentrations as wide as practically possible. In other words, the possibility that a particular

ALDH enzyme experiences substrate inhibition by the aldehyde should be fully explored before performing a thorough kinetic characterization, including the evaluation of inhibitors or activators, in order to observe if substrate inhibition occurs in this particular enzyme and then correctly design the experiments and fit the experimental initial velocity data to the appropriate equations. The common practice of using a concentration range of the substrate where apparently there is no inhibition by this substrate should be abandoned because, as we show in this work, the fitting process of these data not only produce errors in the estimation of the true V_{\max} values but also because it produces even greater errors in the estimation of K_m values, and therefore errors in V_{\max}/K_m . Likewise incorrect is the also common practice of purposely using a high concentration of the aldehyde when studying the saturation of the ALDH enzyme by NAD(P)^+ , or a high concentration of NAD(P)^+ when studying the saturation by the aldehyde with the intention of ensuring saturation by the fixed substrate so that true kinetic parameters for either the coenzyme or the aldehyde could be determined from single saturation curves. But if the high aldehyde concentration is inhibitory, as it could easily be even if has not been previously detected in a saturation experiment using a limited range of aldehyde concentrations, the estimated kinetic parameters for the coenzyme will be wrong and misleading. In addition, a high concentration of the coenzyme increases the degree of substrate inhibition by the aldehyde and consequently could increase the errors in the determination of the kinetic parameters for the aldehyde. The extent of the errors depends on the degree of inhibition of a particular enzyme by a particular substrate, and although important they may not be quantitatively of much relevance in certain experiments—for instance when comparing the effects that a change in a critical residues has on the kinetic of the enzyme because of the usually great differences between the wild-type and the mutant enzymes. Even though, if ignored, these errors could lead to qualitatively wrong conclusions, particularly if the wild-type and mutant enzymes differ in their susceptibility to substrate inhibition.

Finally, our findings have important implications not only for the kinetic studies of ALDH enzymes, but also for the study of enzyme kinetics in general, including the evaluation of enzyme inhibitors or activators as potential drugs.

Conflicts of interest

None.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of DGAPA, UNAM (PAPIIT grant IN220317), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT grants 252123 and 283524), and Faculty of Chemistry, UNAM (PAIP grant 5000-9119) to RAMC.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.03.024>.

References

- R.J.S. Duncan, K.F. Tipton, The kinetics of pig brain aldehyde dehydrogenase, *Eur. J. Biochem.* 22 (1971) 538–543.
- R.S. Sidhu, A.H. Blair, Human liver aldehyde dehydrogenase. Kinetics of aldehyde oxidation, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 7899–7904.
- A.J. Rivett, K.F. Tipton, Kinetic Studies with rat-brain succinic-semialdehyde dehydrogenase, *Eur. J. Biochem.* 117 (1981) 187–193.
- G.J. Hart, F.M. Dickinson, Kinetic properties of highly purified preparations of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase, *Biochem. J.* 203 (1982) 617–627.
- L.F. Blackwell, A.F. Bennett, P.D. Buckley, Relationship between the mechanisms of the esterase and dehydrogenase activities of the cytoplasmic aldehyde dehydrogenase from sheep liver. An alternative view, *Biochemistry* 22 (1983) 3784–3791.
- C.M. Forte-McRobbie, R. Pietruszko, Purification and characterization of human liver “high K_m ” aldehyde dehydrogenase and its identification as glutamic gamma-semialdehyde dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 2154–2163.
- F.M. Dickinson, Studies on the mechanism of sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase. The effect of pH on the aldehyde binding reactions and a re-examination of the problem of the site of proton release in the mechanism, *Biochem. J.* 238 (1986) 75–82.
- C. Gillyon, G.W. Haywood, P.J. Large, B. Nellen, A. Robertson, Putrescine breakdown in the yeast *Candida boidinii*: subcellular location of some of the enzymes involved and properties of two acetamidoaldehyde dehydrogenases, *J. Gen. Microbiol.* 133 (1987) 2477–2485.
- P. Falkenberg, A.R. Strøm, Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta* 1034 (1990) 253–259.
- G.T.M. Henehan, K.F. Tipton, Steady-state kinetic analysis of aldehyde dehydrogenase from human erythrocytes, *Biochem. J.* 287 (1992) 145–150.
- M. Vojtěchová, A.D. Hanson, R.A. Muñoz-Clares, Betaine-aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD-dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde to dimethylsulfoniopropionate, *Arch. Biochem. Biophys.* 337 (1997) 81–88.
- M. Vojtěchová, R. Rodríguez-Sotres, E.M. Valenzuela-Soto, R.A. Muñoz-Clares, Substrate inhibition by betaine aldehyde of betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L., *Biochim. Biophys. Acta* 1341 (1997) 49–57.
- J. Boch, G. Nau-Wagner, S. Kneip, E. Bremer, Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine, *Arch. Microbiol.* 168 (1997) 282–289.
- S. Marchal, S. Rahuel-Clermont, G. Branlant, Role of glutamate-268 in the catalytic mechanism of nonphosphorylating glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *Biochemistry* 39 (2000) 3327–3335.
- J.R. Livingstone, T. Maruo, I. Yoshida, Y. Tarui, K. Hirooka, Y. Yamamoto, N. Tsutui, E. Hirasawa, Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*, *J. Plant Res.* 116 (2003) 133–140.
- N.N. Samsonova, S.V. Smirnov, A.E. Novikova, L.R. Pitsyn, Identification of *Escherichia coli* K12 YdcW protein as a γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase, *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 579 (2005) 4107–4112.
- M.F. Wang, C.L. Han, S.J. Yin, Substrate specificity of human and yeast aldehyde dehydrogenases, *Chem. Biol. Interact.* 178 (2009) 36–39.
- M.C. Long, D.A. Nagegowda, Y. Kaminaga, K.K. Ho, C.M. Kish, J. Schnepp, D. Sherman, H. Weiner, D. Rhodes, N. Dudareva, Involvement of snapdragon benzaldehyde dehydrogenase in benzoic acid biosynthesis, *Plant J.* 59 (2009) 256–265.
- D. Kopečný, M. Tylichová, J. Snegaroff, H. Popelková, M. Šebela, Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of ω -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases, *FEBS J.* 278 (2011) 3130–3139.
- L.P.S. de Carvalho, Y. Linga, C. Shen, J.D. Warren, K.Y. Rhee, On the chemical mechanism of succinic semialdehyde dehydrogenase (GabD1) from *Mycobacterium tuberculosis*, *Arch. Biochem. Biophys.* 509 (2011) 90–99.
- Á.G. Díaz-Sánchez, L. González-Segura, C. Mújica-Jiménez, E. Rudiño-Piñera, C. Montiel, L.P. Martínez-Castilla, R.A. Muñoz-Clares, 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 (2012) 1570–1582.
- D. Srivastava, R.K. Singh, M.A. Moxley, M.T. Henzl, D.F. Becker, J.J. Tanner, The three-dimensional structural basis of type II hyperprolinemia, *J. Mol. Biol.* 420 (2012) 176–189.
- D. Kopečný, R. Končítiková, M. Tylichová, A. Vigouroux, H. Moskalčková, M. Soral, M. Šebela, S. Moréra, Plant ALDH10 family: identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 9491–9507.
- C. Chen, J.C. Joo, G. Brown, E. Stolnikova, A.S. Halavaty, A. Savchenko, W.F. Anderson, A.F. Yakunin, Structure-based mutational studies of substrate inhibition of betaine aldehyde dehydrogenase *BetB* from *Staphylococcus aureus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (2014) 3992–4002.
- S.A. Park, Y.S. Park, K.S. Lee, Kinetic characterization and molecular modeling of NAD(P)^+ -dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from *Bacillus thuringiensis* as an ortholog *Yne1*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 24 (2014) 954–958.
- E.H. Jang, S.A. Park, Y.M. Chi, K.S. Lee, Structural insight into the substrate inhibition mechanism of NADP^+ -dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from *Streptococcus pyogenes*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46 (2015) 487–493.
- L.R. Tuck, K. Altenbach, T.F. Ang, A.D. Crawshaw, D.J. Campopiano, D.J. Clarke, J. Marles-Wright, Insight into coenzyme A cofactor binding and the mechanism of acyl-transfer in an acylating aldehyde dehydrogenase from *Clostridium phytofermentans*, *Sci. Rep.* 6 (2016) 22108.
- L.K. Liu, J.J. Tanner, Crystal structure of aldehyde dehydrogenase 16 reveals trans-hierarchical structural similarity and a new dimer, *J. Mol. Biol.* 431 (2019) 524–541.
- D.A. Korasick, R. Končítiková, M. Kopečná, E. Hájková, A. Vigouroux, S. Moréra, D.F. Becker, M. Šebela, J.J. Tanner, D. Kopečný, Structural and biochemical characterization of aldehyde dehydrogenase 12, the last enzyme of proline catabolism in plants, *J. Mol. Biol.* 431 (2019) 576–592.
- H.E. Flores, P. Filner, Polyamine catabolism in higher plants: characterization of pyrroline dehydrogenase, *Plant Growth Regul.* 3 (1985) 277–291.
- E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, A. Bairoch, ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3784–3788.
- D.W. Marquardt, An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters, *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11 (1963) 431–441.
- I.H. Segel, *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, Wiley, New York, 1975.
- A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, third ed., Portland Press, London, 2004.
- E.L. King, C. Altman, A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reactions, *J. Phys. Chem.* 60 (1956) 1375–1378.