



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Efecto de mutaciones en la intercara dímero-dímero de la enzima betaína
aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa* sobre su estructura,
estabilidad y función**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
Alicia Sánchez Izquierdo

DIRECTORA DE TESIS
Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares
Facultad de Química UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. Enrique García Hernández
Instituto de Química UNAM

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
Facultad de Medicina UNAM

MÉXICO, D. F. Abril de 2014



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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM y tuvo el apoyo financiero del CONACYT (proyecto 59654).

EL Jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente:	Dr. Ruy Pérez Monfort	Instituto de Fisiología celular UNAM
Vocal:	Dr. Enrique García Hernández	Instituto de Química (UNAM)
Vocal:	Dr. Ismael Bustos Jaimes	Facultad de Medicina (UNAM)
Vocal:	Dr. Enrique Rudiño Piñera	Instituto de Biotecnología (UNAM)
Secretario:	Dra. Gloria Saab Rincón	Instituto de Biotecnología (UNAM)

Se agradece al Biol. Carlos Mújica Jiménez su valioso apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Doctora Rosario Muñoz por su asesoría, sus comentarios y sus consejos que me permitieron desarrollar este trabajo. Gracias porque todas sus enseñanzas las tendré toda mi vida.

Agradezco al Dr. Alejandro Fernández y al Dr. Enrique García, quienes formaron parte de mi comité tutorial, por sus aportaciones para la conclusión de este trabajo.

A los miembros del jurado de examen por revisar mi tesis y por sus invaluable comentarios.

A la Dra. Adriana Julián Sánchez y al Dr. Héctor Riveros Rosas por facilitarme el alineamiento de las ALDHs.

A los amigos y compañeros del laboratorio 102 del conjunto E de la Facultad de Química: Lilian, Carlos, Mina, Victor, Rodrigo, Javier, Ángel, Fátima y a mi querido Goyo por todos los buenos momentos juntos.

A los compañeros del laboratorio de fisicoquímica e ingeniería de proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM por recibirme de forma tan amable y por brindarme su ayuda.

Al CONACYT por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de maestría.

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas.

A la Facultad de Química.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

"¿Qué vida merece ser vivida que no descanse en la mutua benevolencia de un amigo? ¿Qué es más dulce que tener a alguien con quien te atrevas a hablar de todo como contigo mismo? ¿Qué provecho tan grande habría en las ocasiones prósperas si no tuvieras a alguien que se alegrara por ellas tanto como tú mismo? Y sería difícil soportar las adversidades sin uno que las sintiera incluso más que tú. La amistad, a cualquier parte que nos volvamos, la encontramos dispuesta. Nunca está de sobra, nunca es inoportuna, jamás es molesta..."

Marco Tulio Cicerón

Gracias a mis mejores amigos: mis papás y mi querida hermana.

Gracias a mis amigos de siempre y para toda la vida: Maribel, Montserrat, Araceli, Juan y César.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
I. RESUMEN	2
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Aldehído deshidrogenasas	3
II.1.1. Reacción catalizada y mecanismo de reacción	3
II.1.2. Estructura tridimensional de las ALDHs	4
II.2. Betaína aldehído deshidrogenasas	5
II.2.1. Relaciones filogenéticas	6
II.2.2. Función biológica	7
II.2.3. Estructura tridimensional	8
II.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
II.3.1. Catabolismo de colina en <i>P. aeruginosa</i>	9
II.3.2. Respuesta al estrés osmótico en <i>P. aeruginosa</i>	10
II.3.3. Relevancia de la BADH en <i>P. aeruginosa</i>	11
II.4. Betaína aldehído deshidrogenasa de <i>P. aeruginosa</i>	11
II.4.1. Utilización de la coenzima	12
II.4.2. Estructura tridimensional	12
II.4.3. Estabilidad	13
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
IV. HIPÓTESIS	19
V. OBJETIVOS	19
V.1. Objetivo general	19
V.2. Objetivos particulares	19
VI. MÉTODOS	20
VI.1. Identificación de residuos de la intercara dímero-dímero potencialmente críticos para la tetramerización	20
VI.2. Obtención de las <i>Pa</i>BADHs mutantes	21
VI.2.1. Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la mutagénesis sitio dirigida	21
VI.2.2. Mutagénesis sitio dirigida y amplificación por PCR	21
VI.2.3. Transformación de células de <i>E. coli</i> y sobreexpresión de las	22

PaBADH mutantes	
VI.2.4. Purificación de las <i>PaBADHs</i> mutantes	22
VI.3. Caracterización funcional de las <i>PaBADHs</i> mutantes	23
VI.3.1. Estudios cinéticos: Medida de la actividad enzimática	23
VI.3.2. Estudios de unión al equilibrio: Determinación de la unión del NAD(P) ⁺	23
VI.4. Caracterización estructural de las <i>PaBADH</i> mutantes	24
VI.4.1. Cromatografía de exclusión molecular	24
VI.4.2. Fluorescencia intrínseca de los aminoácidos aromáticos	24
VI.4.3. Dicroísmo circular	25
VI.5. Análisis de la estabilidad de la <i>PaBADH</i> Glu114Ala y Gly118Asp frente a la desnaturalización térmica.....	25
VI.6. Modelaje de proteínas.....	26
VI.7. Figuras y comparaciones estructurales	26
VII. RESULTADOS	27
VII.1. Análisis de las intercaras de la <i>PaBADH</i>.....	27
VII.1.1. Intercara monómero-monómero (intercaras A-B y C-D)	27
VII.1.2. Intercaras dímero-dímero	28
VII.1.2.1. Intercaras A-C y B-D	28
VII.2.2.2. Intercaras A-D y B-C	32
VII.2. Mutantes <i>PaBADH</i> Gly125Pro	37
VII.1.1. Purificación de la <i>PaBADH</i> Gly125Pro	37
VII.1.2. Determinación del estado de oligomerización de la <i>PaBADH</i> Gly125Pro	37
VII.3. Mutantes en la posición Glu114.....	41
VII.3.1. Mutante Glu114Arg	41
VII.3.2. Mutante Glu114Ala	41
VII.3.2.1. Estado de agregación de la <i>PaBADH</i> Glu114Ala	41
VII.3.2.2. Recromatografía	45
VII.3.2.3. Efecto del glicerol sobre el estado de agregación de la <i>PaBADH</i> Glu114Ala	47
VII.3.2.4. Cromatografía de intercambio iónico	50
VII.3.2.5. Caracterización de la estructura secundaria y terciaria de la <i>PaBADH</i> Glu114Ala	53
VII.3.2.6. Modelo tridimensional de la <i>PaBADH</i> Glu114Ala	54

VII.3.2.7. Unión al equilibrio del NADP ⁺ a la <i>PaBADH</i> Glu114Ala .	55
VII.3.2.8. Análisis de la estabilidad de la <i>PaBADH</i> Glu114Ala frente a la desnaturalización térmica	56
VII.4. Mutante <i>PaBADH</i> Gly118Asp	57
VII.4.1. Estado de agregación de la <i>PaBADH</i> Gly118Asp	58
VII.4.2. Unión al equilibrio del NAD(P) ⁺ a la <i>PaBADH</i> Gly118Asp	59
VII.4.3. Estructura secundaria y terciaria de la <i>PaBADH</i> Gly118Asp	60
VII.4.4. Análisis de la estabilidad de la <i>PaBADH</i> Gly118Asp frente a la desnaturalización térmica	60
VII.4.5. Modelo tridimensional de la <i>PaBADH</i> Gly118Asp	61
VIII. DISCUSIÓN	63
VIII.1. Gly125	63
VIII.2. Glu114	66
VIII.3. Gly118	70
IX. CONCLUSIONES	73
X. PERSPECTIVAS	74
XI. BIBLIOGRAFÍA	75

ABREVIATURAS

ALDH	Aldehído deshidrogenasa
AMADHs	Aminoaldehído deshidrogenasas
ASA	Área accesible al solvente
BADH	Betaína aldehído deshidrogenasa
BAL	Betaína aldehído
CSS	Complexation Significance Score
DC	Dicroísmo circular
<i>DrP5CDH</i>	Δ -pirrolin-5-carboxilato deshidrogenasas de <i>Deinococcus radiodurans</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GB	Glicina betaína
GFP	Proteína verde fluorescente
LB	Luria-Bertani
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
NADP ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (forma oxidada)
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (forma reducida)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P5CDH	Δ -pirrolin-5-carboxilato deshidrogenasas
<i>PaBADH</i>	Betaína aldehído deshidrogenasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
PISA	Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>SoBADH</i> ,	Betaína aldehído deshidrogenasa de espinaca
<i>TtP5CDH</i>	Δ -pirrolin-5-carboxilato deshidrogenasas de <i>Thermus thermophilus</i>

I. RESUMEN

La betaína aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa* (*PaBADH*) forma parte de la superfamilia de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs). En esta superfamilia se han encontrado enzimas diméricas, tetraméricas (dímero de dímeros) y hexaméricas (trímero de dímeros). Hasta el momento, se han hecho muy pocos estudios para conocer cuáles son las razones de que existan estas diferencias en el estado de oligomerización de las ALDHs y cuáles son las consecuencias de perder el estado oligomérico nativo. Con el fin de contribuir a contestar estas preguntas, en este trabajo se analizaron las intercaras de una enzima tetramérica, la *PaBADH*, para identificar residuos que por su ubicación pudieran ser importantes para que la enzima forme el tetrámero nativo. Se seleccionaron los residuos Gly125, Glu114 y Gly118 y se generaron las mutantes Gly125Pro, Glu114Ala y Gly118Asp, que se expresaron en forma soluble y pudieron ser purificadas. Su estado de oligomerización se evaluó por medio de cromatografía de exclusión molecular en un intervalo de concentración de proteína de 2.5 a 0.025 mg/ml. Encontramos que la mutante Gly125Pro es un tetrámero no activo que se disocia al disminuir la concentración de proteína. La mutante Glu114Ala forma tetrámeros, dímeros y monómeros en el intervalo de concentración de proteína estudiado, y no fue posible aislar estas especies. Esta mutante si presenta actividad enzimática y parece que tanto el tetrámero como el dímero tienen actividad. La mutación de la Gly118 por un aspártico permitió obtener dímeros activos en solución, incluso a altas concentraciones de proteína. En conjunto, los resultados de este trabajo indican que las intercaras dímero-dímero juegan un importante papel no sólo en mantener el estado de oligomerización tetramérico, sino en la adquisición de la conformación nativa del sitio activo.

II. ANTECEDENTES

II.1. Aldehído deshidrogenasas

II.1.1. Reacción catalizada y mecanismo de reacción

Las enzimas aldehído deshidrogenasas (ALDHs, EC 1.2.1) participan en la oxidación de aldehídos a sus ácidos carboxílicos correspondientes utilizando el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+) o el dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (NADP^+) como coenzima (Jakoby, 1963), de acuerdo a la siguiente reacción (Fig. 1):

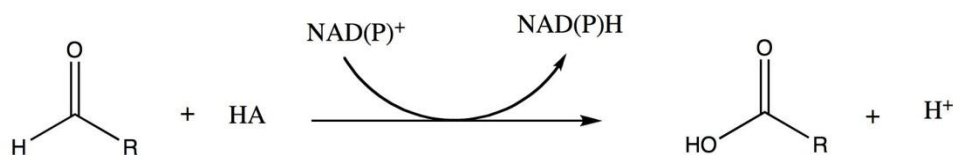


Figura 1. Reacción general catalizada por las aldehído deshidrogenasas.

A es la molécula que genera al nucleófilo, un ión hidroxilo o un tiolato, que ataca al intermediario tioéster de la reacción que catalizan (ver Fig. 2) y R es el sustituyente del aldehído. Las ALDHs pueden utilizar una gran variedad de sustratos, tales como aldehídos alifáticos (lineales o ramificados) o aromáticos, o bien aldehídos funcionarizados en la posición alfa al carbonilo como el malondialdehído. Pueden usar NAD^+ o NADP^+ como coenzimas, pero la mayor parte de las caracterizadas hasta el momento prefieren usar NAD^+ .

El mecanismo químico propuesto para la reacción catalizada por las ALDHs hidrolíticas (Feldman y Weiner, 1972) consiste en una catálisis covalente y ácido-básica que consta de los siguientes pasos:

1) *Acilación*: El tiolato de la cisteína catalítica realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono del carbonilo para formar un intermediario tiohemiacetal tetraédrico.

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

3) *Desacilación*: La hidrólisis del tioéster por un ión hidroxilo, proveniente de una molécula de agua catalítica, libera el grupo tiol y el producto ácido de la reacción.

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

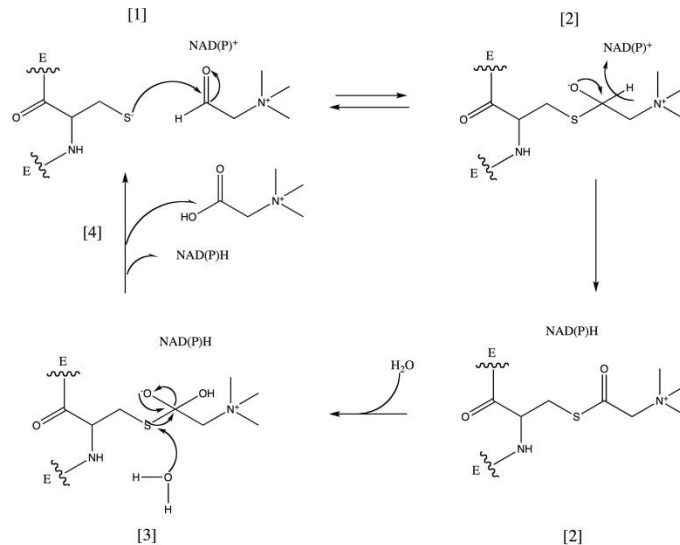


Figura 2. Esquema simplificado del mecanismo químico propuesto para la reacción catalizada por las ALDHs. Modificado de Muñoz-Clares *et al.* (2011).

II.1.2. Estructura tridimensional de las ALDHs

Hasta la fecha se han determinado 54 estructuras tridimensionales de diferentes ALDHs; casi todas ellas presentan un estado de oligomerización tetramérico o dimérico. Recientemente se caracterizó a las Δ -pirrolin-5-carboxilato deshidrogenasas (P5CDH) de *Thermus thermophilus* (TtP5CDH), de *Deinococcus radiodurans* (DrP5CDH) (Luo *et al.*, 2013), y de *Saccharomyces cerevisiae* (Pemberton *et al.*, 2014) y se encontró que estas enzimas son hexámeros (trímero de dímeros) en solución. Sin importar su estado de oligomerización, en todas se ha encontrado un plegamiento similar del monómero (Fig. 3). Poseen tres dominios en cada subunidad: un dominio de unión a la coenzima en la región amino terminal, un dominio catalítico y un dominio de oligomerización, mediante el cual se forma la unidad dimérica. Este último dominio es una extensión del dominio de unión a la coenzima y de ahí la importancia del NAD(P)⁺ en el mantenimiento de la estructura cuaternaria encontrada por Velasco-García *et al.* (1999). Los dos primeros dominios presentan un plegamiento tipo Rossmann (Rossmann *et al.*, 1974).

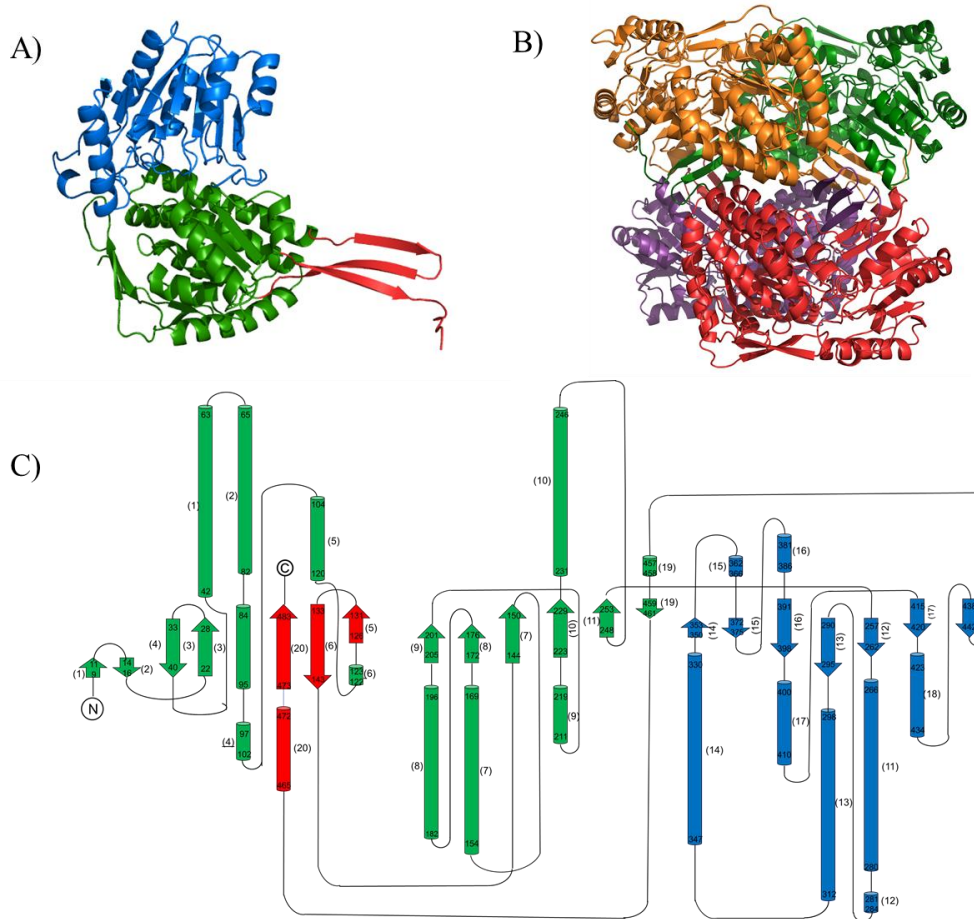


Figura 3. Estructura tridimensional de la betaína aldehído deshidrogenasa de *P. aeruginosa* como ejemplo de una ALDH tetramérica. A) Monómero coloreado según sus dominios: en verde, el dominio de unión a la coenzima; en azul, el dominio catalítico y en rojo, el dominio de oligomerización que forma la intercara monómero-monómero. B) Tetrámero de la *PaBADH*; en naranja se muestra la subunidad A, en verde la subunidad B, en morado la subunidad C y en rojo la subunidad D. C) Diagrama de la topología de la *PaBADH* usando el mismo código de colores que en (A) Modificado de González-Segura *et al.*, 2009.

II.2. Betaína aldehído deshidrogenasas

Las enzimas con actividad betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, betaína aldehído NAD(P)⁺ oxidoreductasa, E.C. 1.2.1.8) pertenecen a diferentes familias dentro de la superfamilia de las aldehído deshidrogenasas y catalizan la oxidación irreversible de la betaína aldehído (BAL) a glicina betaína (GB) con la reducción simultánea del NAD(P)⁺ (Rothschild y Guzmán-Barrón, 1954) de acuerdo a la siguiente reacción (Fig. 4):

algunas de hongos y bacterias, la familia ALDH25, que está formada por proteínas de firmicutes y actinobacterias, y otras dos familias de ALDHs bacterianas, la ALDH26 y ALDH27, que contienen miembros ortólogos de enzimas con actividad AMADH (Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., Martínez-Castilla, L. P. y Muñoz-Clares R. A., datos sin publicar). Los miembros caracterizados de las familias ALDH9 y ALDH26 son enzimas tetraméricas, mientras que las de las familias ALDH10 y ALDH25 son diméricas (Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., Martínez-Castilla, L.P. y Muñoz-Clares R.A., datos sin publicar). Aún no se ha caracterizado ningún miembro de la familia ALDH27.

II.2.2. Función biológica

El hecho de que las BADHs puedan usar una amplia variedad de sustratos sugiere que están involucradas en distintas funciones biológicas. En animales, la ALDH9 participa en la síntesis de GB, que sirve como osmoprotector de células de riñón (Grunewald y Eckstein, 1995) y como donador de metilos en la biosíntesis de metionina (Muntz, 1950). Además participa en el catabolismo de poliaminas (Ambroziak y Pietruszko, 1991), en la producción del ácido γ -aminobutírico en las glándulas suprarrenales (Chern y Pietruszko, 1995) y en la síntesis de carnitina (Vaz *et al.*, 2000). En plantas, las ALDH10 están involucradas en la respuesta al estrés osmótico, provocado por sequía, suelos hipersalinos o frío, al participar en la síntesis de osmoprotectores como GB (Hanson y Wyse, 1982; Weretilnyk *et al.*, 1989; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994), dimetilsulfonio-propionato (Vojtechová *et al.*, 1997; Trossat *et al.*, 1997), alanina betaína (Rathinasabapathi *et al.*, 2000), o 4-aminobutirato, que en plantas funciona como un osmoprotector (Bouché y Fromm, 2004). Las ALDH10 de plantas también participan en el catabolismo de poliaminas y/o en la síntesis de carnitina (Tylichová *et al.*, 2010). Aunque estas funciones aún no han sido probadas, son actividades esenciales para la planta. En bacterias, las ALDH9 y ALDH25 están implicadas en la síntesis de GB, como parte de la respuesta de estos organismos al estrés osmótico (Falkenberg y Strom, 1990; Boch *et al.*, 1997), o como parte del catabolismo de colina (Nagasawa *et al.*, 1976; Smith *et al.*, 1988; Meskys *et al.*, 2001; Velasco-García *et al.*, 2006a; Wargo *et al.*, 2008) en aquellas bacterias capaces de crecer en colina como su única fuente de carbono, nitrógeno y energía. Es interesante que estas bacterias poseen una BADH anfibólica, es decir, que usa indistintamente NAD^+ o NADP^+ y así provee de equivalentes de reducción tanto para obtención de energía (NADH) como para biosíntesis y defensa

(NADPH). Las ALDH26 y ALDH27 están involucradas en el metabolismo de aminoaldehídos (Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., Martínez-Castilla, L.P. y Muñoz-Clares R.A., datos sin publicar).

II.2.3. Estructura tridimensional

A la fecha se conoce la estructura tridimensional de varias enzimas pertenecientes a distintas familias de ALDHs que poseen miembros con actividad BADH (Tabla 1). En todas estas estructuras, el monómero posee el mismo plegamiento que el del resto de las ALDHs de estructura tridimensional conocida, y el arreglo de estructura cuaternaria es así mismo similar al conocido en otras ALDHs.

Tabla 1. Estructuras tridimensionales conocidas de ALDHs con actividad BADH.

Familia	Origen	Ligando	PDB	Referencia
<u>Enzimas tetraméricas</u>				
ALDH9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NADP ⁺	2wme	González-Segura <i>et al.</i> , 2009
		NADPH	2wox	Díaz-Sánchez <i>et al.</i> , 2011
ALDH9	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	Apo	3k2w	Sin publicar
ALDH9	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Apo	3r31	Sin publicar
ALDH26	<i>E. coli</i>	Apo	1wnd	Gruez <i>et al.</i> , 2004
		NADH y BA	1wnb	
ALDH25	<i>Staphylococcus aureus</i>	Apo	3ed6	Sin publicar
		NAD ⁺	3fg0	
ALDH9	Bacalao	Apo	1a4s	Johansson <i>et al.</i> , 1998
		NAD ⁺	1bpw	
<u>Enzimas diméricas</u>				
ALDH10	Espinaca	NAD ⁺	4a0m	Díaz-Sánchez <i>et al.</i> , 2012
ALDH10	Chicharo	NAD ⁺	3iwj	Tylichova <i>et al.</i> , 2010
		NAD ⁺	3iwk	
ALDH10	Maíz	NAD ⁺	4i8p	Kopecny <i>et al.</i> , 2013
ALDH10	Tomate	NAD ⁺	4i9b	Kopecny <i>et al.</i> , 2013

II.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, ubicua, aerobia constitutiva y anaerobia facultativa. Es un patógeno oportunista de humanos que ataca a sujetos inmunocomprometidos, como enfermos con SIDA o con cáncer que están siendo tratados por quimioterapia (Bergen y Shelhamer, 1996). Es la principal causa de muerte en enfermos con fibrosis quística (Pier, 1985; George, 1987; Govan y Deretic, 1996), causa neumonía en pacientes que reciben respiración artificial y puede causar bacteriemia en sujetos con quemaduras graves (Madigan *et al.*, 1997). Esta bacteria presenta resistencia a la acción de la mayoría de los antibióticos de uso común y a desinfectantes. *P. aeruginosa* es capaz de crecer en una gran variedad de ambientes y condiciones. Una de las razones que le permiten a la bacteria crecer en esta variedad de ambientes es que puede utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, lo que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrimentos (Hardalo y Edberg, 1997). Utiliza preferentemente algunos intermediarios del ciclo de Krebs (por ejemplo el succinato), pero también metaboliza glucosa, aunque, a diferencia de otros organismos como *E. coli*, no la descompone por la vía Embden-Meyerhof sino a través de la ruta de Entner-Doudoroff (Lessie y Phibbs, 1984).

En el año 2000 se completó la secuenciación del genoma de la cepa PAO1 (Stover *et al.*, 2000). Esta cepa fue aislada de la herida de un paciente (Holloway, 1955) y es la generalmente usada en investigación. El tamaño del genoma es de 6.3 millones de pares de bases, arreglados en un único cromosoma circular. El 32% de los genes de la secuencia genómica de *P. aeruginosa* no tienen homología con las secuencias depositadas en los bancos de datos, por lo que presumiblemente se trata de genes que codifican para proteínas de función novedosa. También es de destacar que muchos de los genes de *P. aeruginosa* codifican para transportadores, lo que puede estar relacionado con su alta resistencia a antibióticos (Stover *et al.*, 2000).

II.3.1. Catabolismo de colina en *P. aeruginosa*

En los sitios de infección de *P. aeruginosa* se encuentra abundantemente la colina y sus precursores (Pesin y Candia, 1982; Wright y Clements, 1987), sustancias que la bacteria es capaz de metabolizar como única fuente de carbono nitrógeno y energía oxidándolas hasta piruvato en

una ruta catabólica cuyo segundo paso está catalizado por la BADH y que, por tanto tiene a la GB como intermediario (Fig. 5).

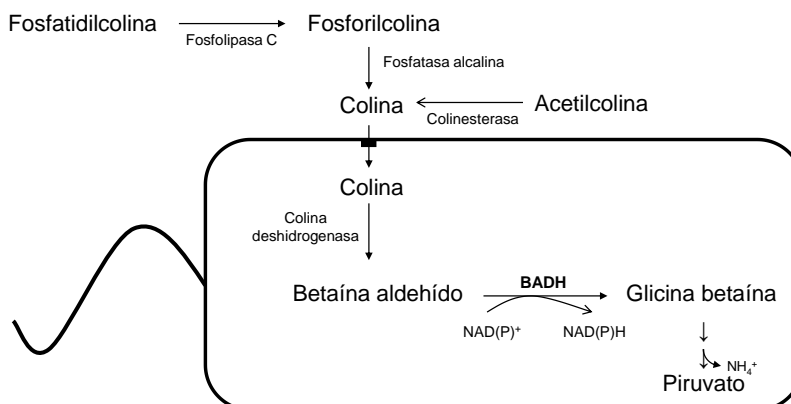


Figura 5. Catabolismo de colina y sus precursores en *P. aeruginosa*. Tomado de Muñoz-Clares y Velasco-García, 2004.

A diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, donde la expresión de la BADH se induce por colina y una alta concentración de sal y la GB sólo se usa como un osmoprotector, ya que no es metabolizada, en *P. aeruginosa* la expresión de esta enzima sólo se induce por colina y no cuando la bacteria crece en un medio con altas concentraciones de sal (Velasco-García *et al.*, 2006a).

II.3.2. Respuesta al estrés osmótico en *P. aeruginosa*

Una característica de *P. aeruginosa* que le permite colonizar nichos adversos tales como ambientes salinos es su capacidad de almacenar osmolitos producidos intracelularmente o captados del medio extracelular. Esta bacteria sintetiza y acumula N-acetilglutaminilglutamina amida, trehalosa y ácido glutámico en ausencia de fuentes exógenas de osmoprotectores. No obstante, si en el medio externo están presentes GB o colina o sus precursores, *P. aeruginosa* acopia preferentemente GB. Esta acumulación hace que disminuyan los niveles de los otros tres osmolitos endógenos (D'souza-Ault *et al.*, 1993). Se ha reportado que 1 mM de GB en el medio de cultivo es capaz de aumentar la tolerancia al estrés osmótico en *P. aeruginosa* hasta concentraciones de 0.7 M de NaCl (D'souza-Ault *et al.*, 1993). Como ya se ha mencionado, *P. aeruginosa* es también capaz de sintetizar GB a partir de colina, una habilidad que comparte con otros muchos organismos. Se sabe que si la bacteria crece en un medio hiperosmótico se reprime

la expresión de las enzimas implicadas en el catabolismo del osmoprotector GB (Lucchesi *et al.*, 1995), permitiendo así su acumulación (Diab *et al.*, 2006). La GB juega por tanto un doble papel en *P. aeruginosa*: como osmoprotector y como intermediario del catabolismo de colina.

II.3.3. Relevancia de la BADH en *P. aeruginosa*

Gracias a la actividad de la *PaBADH*, la bacteria no sólo puede obtener carbono, nitrógeno y energía a partir de compuestos muy abundantes en los sitios de infección, sino que además obtiene GB (un eficiente osmoprotector) y equivalentes de reducción tanto para el anabolismo y defensa frente al estrés oxidativo que le imponen las defensas del hospedero (NADPH) (Díaz-Sánchez *et al.*, 2011) como para la producción de energía (NADH) (Fig 4). Por esto se cree que la BADH es una enzima clave en la virulencia de la bacteria y un posible blanco de agentes antimicrobianos (Zaldívar-Machorro *et al.*, 2011). Inhibiendo a esta enzima no sólo se disminuye la producción de NAD(P)H y de GB, sino que el efecto quizás más importante es que se acumularía BAL, que es un compuesto muy tóxico (Rathinasabapathi *et al.*, 1994). De hecho, cepas de *P. aeruginosa* con algunas mutaciones en el gen que codifica para la BADH son incapaces de crecer en presencia de colina, aun cuando exista otra fuente de carbono en el medio de cultivo o se añada a éste GB. Ello debido al efecto tóxico de la BAL que se acumula en la mutante (Sage *et al.*, 1997). Consistente con esto, resultados del laboratorio mostraron una inhibición del crecimiento bacteriano cuando se inhibe a la *PaBADH* (Zaldívar-Machorro *et al.*, 2011). Por su potencial uso como blanco de fármacos antibacterianos, es de gran interés el conocer a fondo las características cinéticas y estructurales de esta enzima, para poder seleccionar o diseñar un inhibidor que pudiera llegar a usarse como fármaco en el combate de la infección.

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

La *PaBADH* fue aislada por primera vez al inducir su síntesis creciendo a la bacteria en colina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Nagasawa *et al.*, 1976). En 1999 se mejoró el protocolo de purificación, aumentando considerablemente el rendimiento de la enzima pura (Velasco-García *et al.*, 1999). Actualmente en nuestro laboratorio contamos con células

BL21(DE3)-pLysS (Stratagene) de *E. coli* transformadas con el vector de expresión pCAL-BetB, que contiene el gen que codifica para la *PaBADH* (Velasco-García *et al.*, 2006a).

Los estudios realizados en el laboratorio sobre esta enzima han permitido conocer muchos detalles sobre su funcionamiento y su estructura. A continuación se presentan algunos de los hallazgos importantes para esta tesis.

II.4.1. Utilización de la coenzima

La *PaBADH* es capaz de utilizar tanto el NAD^+ como el NADP^+ prácticamente con la misma eficiencia (Velasco-García *et al.*, 2000). Esta versatilidad en el uso de la coenzima refleja los diferentes roles metabólicos que puede jugar la enzima en la bacteria. El papel anabólico involucra la síntesis de GB y la formación de NADPH. Por otro lado, participa catabólicamente en la degradación de colina y en la formación de NADH. Así pues, la *PaBADH* juega un papel anfibólico en el metabolismo y un importante papel en la respuesta de la bacteria frente al estrés osmótico y oxidativo.

II.4.2. Estructura tridimensional

La *PaBADH* es un homotetrámero de 490 aminoácidos y tiene una masa molecular de 53.3 kDa por subunidad (213 kDa como tetrámero). Es en realidad un dímero de dímeros A-B + C-D. La cristalografía de rayos X (González-Segura *et al.*, 2009 y Díaz-Sánchez *et al.*, 2011) mostró que su estructura tridimensional es semejante a la de todas las ALDHs cristalizadas hasta la fecha (Fig. 3).

En el establecimiento de la estructura tetramérica de la *PaBADH* participan dos intercaras que se mantienen gracias a interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y en algunos casos por puentes salinos. La intercara *monómero-monómero* se forma por la interacción de la subunidad A con la B (Fig. 9) y dada la simetría de la proteína, es igual a la que se forma por la interacción de la subunidad C con la D. Se forma principalmente por la interacción del dominio de oligomerización de cada subunidad participante formado por las hebras β antiparalelas 5, 6 y 20 (Fig. 3). Las intercaras *dímero-dímero* son las que dan lugar a la formación del tetrámero. Se forman por la interacción de la subunidad A de un dímero con las subunidades C y D del dímero enfrenteado (Figs. 11 y 15), o por la interacción de la subunidad B con las subunidades D y C. En

adelante sólo se hará referencia a la intercara monómero-monómero como A-B y a las intercaras dímero-dímero como A-C y A-D.

II.4.3. Estabilidad

La modificación de la *PaBADH* con el reactivo de tioles disulfiram da lugar a la disociación en monómeros a temperatura ambiente y a la formación de agregados de alto peso molecular a 37 °C (Velasco-García *et al.*, 2006b). Además se sabe que la mutación del residuo no esencial Cys439, localizado en el dominio de oligomerización (para formar el dímero), se traduce en la desestabilización de la estructura nativa tetramérica, dando lugar a dímeros inactivos e inestables (González-Segura *et al.*, 2005). Por otra parte, la presencia de una fuerza iónica fisiológica y de iones K^+ estabiliza el estado tetramérico nativo (Velasco-García *et al.*, 1999; Valenzuela-Soto *et al.*, 2003; Garza-Ramos *et al.*, 2013). En ausencia de iones K^+ , baja fuerza iónica en el medio y baja concentración de proteína, la estructura terciaria y cuaternaria de la *PaBADH* cambia llevando a la inactivación (Valenzuela-Soto *et al.*, 2003; Garza-Ramos *et al.*, 2013).

Por medio de calorimetría diferencial de barrido, de dicroísmo circular (DC) y de fluorescencia intrínseca y extrínseca se ha estudiado la estabilidad térmica de la *PaBADH* y cómo se afecta ésta por la fuerza iónica y por la presencia de iones monovalentes, K^+ y Na^+ en el medio. Se encontró que la máxima estabilidad se da a fuerza iónica cercana a la fisiológica (≈ 150 mM) y en presencia de K^+ . La desnaturalización térmica a alta fuerza iónica es irreversible, formándose agregados visibles, mientras que a baja fuerza iónica la proteína forma agregados solubles que retienen el 80% de estructura secundaria y unen a tioflavina T (Garza-Ramos *et al.*, 2007 y 2013).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta la fecha no se conocen bien las razones estructurales o funcionales por las cuales unas ALDHs son diméricas, y otras tetraméricas o hexaméricas, ni cuáles son las consecuencias de perder el estado oligomérico nativo, ya que los estudios de este aspecto son escasos. En el 2002, Rodríguez-Zavala y Weiner analizaron las posibles causas del diferente estado de oligomerización de la ALDH1 de humano (tetramérica) y de la ALDH3 de humano (dimérica). La ALDH3 posee una extensión en la región carboxilo terminal de 17 residuos que se expone hacia el solvente y que no participa en la interacción con otro dímero por lo que se pensó que esta región (Fig. 6 en rojo) podría ser la responsable de impedir la tetramerización. Se generaron quimeras de la ALDH1 con esta región de la ALDH3 adicionada así como mutantes de la ALDH3 con la región eliminada y no se obtuvieron cambios en el estado de oligomerización de las enzimas. Este resultado es consistente con el hecho de que existen otras enzimas diméricas, como las ALDH10 de plantas, que no poseen esta extensión del carboxilo terminal. Por otra parte, mediante el alineamiento de unas pocas secuencias de ALDHs tetraméricas y diméricas, estos autores encontraron que considerando aquellos residuos que participan en la formación de la intercara dímero-dímero, las últimas tienen más residuos hidrofílicos en las regiones que corresponden a las intercara dímero-dímero, como es de esperarse ya que estas regiones están expuestas al solvente en las enzimas diméricas. Por esto, proponen que deben ser las interacciones hidrofóbicas que se establecen en la intercara dímero-dímero lo que estabiliza al tetrámero (Rodríguez-Zavala y Weiner, 2002). Además, mutaron dos residuos en la intercara dímero-dímero A-C generando a la doble mutante, ALDH1 Asp80Gly/Ser82Ala. Con estas mutaciones se impide la formación de un puente salino y de un puente de H entre las subunidades A y C, esta mutante se expresa como una mezcla entre dímeros inactivos y tetrámeros. Hay que hacer notar que ninguna de estas interacciones se da en la *PaBADH*.

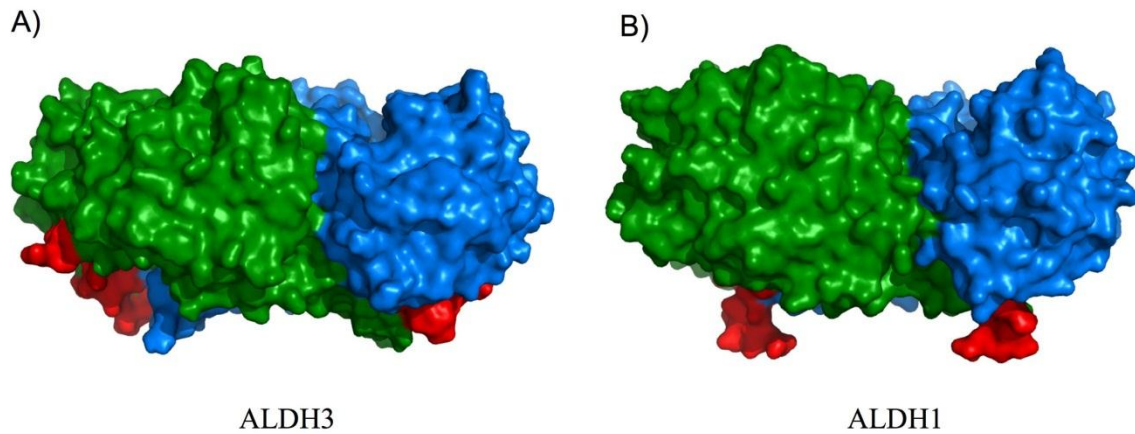


Figura 6. A) Dímero de la ALDH3 (dimérica, código PDB 1ag8). B) Dímero de la ALDH1 (tetramérica, código PDB 1ad3). Representación en superficie, mostrando en verde y en azul cada subunidad del dímero y en rojo la región carboxilo terminal. En el caso de la ALDH1 la región carboxilo terminal forma parte de la intercara dímero-dímero, mientras que en la ALDH3 esta región, que se extiende 17 residuos a partir del extremo carboxilo terminal de la ALDH1, está expuesta al solvente.

En un estudio posterior (Yoval-Sánchez *et al.*, 2013) se pudieron obtener dímeros estables y activos de la ALDH1 cuando a la mutante ALDH1 Asp80Gly/Ser82Ala se le fusionó la proteína verde fluorescente (GFP) al extremo carboxilo terminal. En la ALDH1, así como en la ALDH2, el carboxilo terminal está enterrado en la intercara A-C (Fig. 7A), por lo que la GFP constituye un importante impedimento estérico para la formación del tetrámero. En el caso de la *PaBADH*, la región del carboxilo terminal está expuesta al solvente (Fig. 7B), por lo que la GFP fusionada no constituiría un impedimento para la formación del tetrámero.

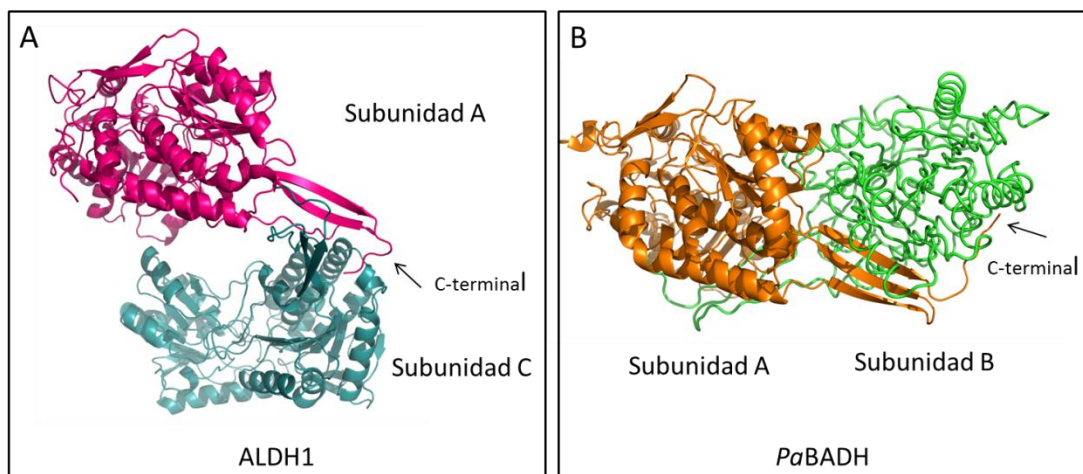


Figura 7. A) Estructura tridimensional de la ALDH1 donde se observa que el C-terminal interacciona con el dímero enfrente para formar el tetrámero y B) Estructura tridimensional de la *PaBADH*, se observa que el C-terminal interacciona con el monómero adyacente para formar el dímero.

Los dímeros de la ALDH1 mutante fusionada a la GFP presentaron sólo el 10% de la actividad de la enzima nativa tetramérica, y puesto que estos dímeros no tienen la reactividad de la mitad de los sitios que exhibe el tetrámero nativo tanto de la ALDH1 como de la ALDH2, se propuso que es necesaria la estructura tetramérica para que se dé este fenómeno. Sin embargo, otros factores deben determinar esta característica del mecanismo catalítico de algunas ALDHs, dado que existen enzimas diméricas, como la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de espinaca (*SoBADH*), que también la presentan (A. Zárate-Romero y R. A. Muñoz-Clares, resultados no publicados).

También se han obtenido dímeros estables y activos en solución de enzimas de la familia ALDH4 que son hexaméricas (trímero de dímeros) como la *TtP5CDH*, la *DrP5CDH* (Luo *et al.*, 2013) (Fig. 8A) y la *P5CDH* de *S. cerevisiae* (Pemberton *et al.*, 2014), es interesante que en esta familia existen enzimas naturalmente diméricas en solución como la *P5CDH* de humano (Pemberton *et al.*, 2014) o las enzimas de *Bacillus halodurans* y de *Bacillus licheniformis* (Luo *et al.*, 2013). Los dímeros de las *TtP5CDH* y *DrP5CDH* se obtuvieron mutando un residuo de arginina (Arg100 y Arg102 en *TtP5CDH* y *DrP5CDH*, respectivamente) por una alanina. Esta Arg está ubicada en la región de oligomerización dímero-dímero para formar el hexámero, estableciendo enlaces salinos con los otros dos dímeros que forman el hexámero (Fig. 8B), de manera que interacciona con otros cinco residuos. Si bien la mutante *TtP5CDH* Arg100Ala es un

dímero activo en solución, cristaliza como un hexámero (PDB 4k57), lo que sugiere que a altas concentraciones la enzima mutada sí es capaz de formar hexámeros y que por tanto hay otros factores involucrados en su asociación. En cuanto a la P5CDH de *S. cerevisiae* no tiene una Arg equivalente a la Arg100 de *TtP5CDH*, pero la cadena lateral del Trp193 que ocupa el lugar de la Arg100 forma varias interacciones hidrofóbicas (Figura 8C). Pemberton y colaboradores (2014) generaron la mutante Trp193Ala y obtuvieron dímeros en solución, aunque no mencionan si los dímeros tienen actividad. Estos investigadores sugieren que lo que determina las diferencias entre el estado de oligomerización de las enzimas de la familia ALDH4 no es un residuo específico o el tipo de interacciones que éste pueda formar, sino una región en la proteína que parece que sólo existe, o sólo se ha encontrado hasta ahora, en esta familia de ALDHs (las ALDH4). La caracterización bioquímica de algunos de los dímeros obtenidos a partir de enzimas hexaméricas indica que no existen diferencias importantes en su actividad (Luo *et al.*, 2013), esto podría deberse a que la formación de un hexámero a partir de dímeros involucra muchas menos interacciones dímero-dímero que las que se requieren para formar un tetrámero y se dan en una región diferente.

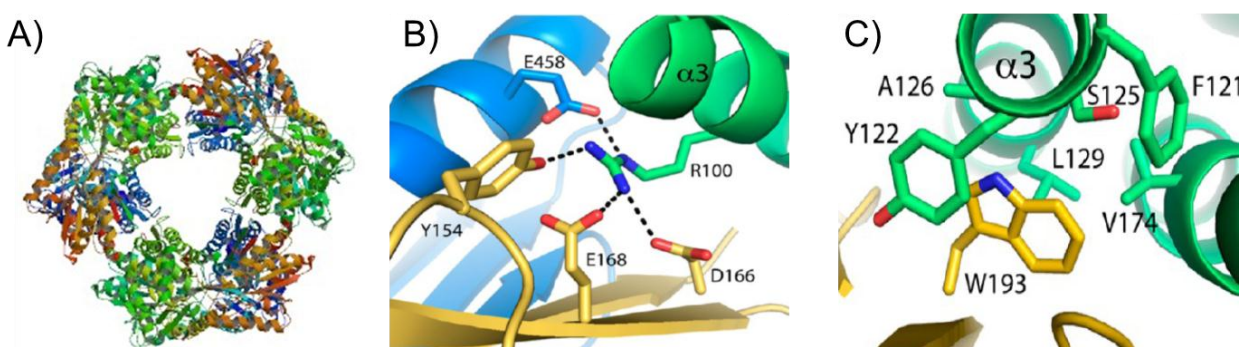


Figura 8. A) Hexámero de la *TtP5CDH*. B) Interacciones de la Arg100 de la *TtP5CDH*. C) Interacciones del Trp193 de la P5CDH de *S. cerevisiae*. Los Paneles B y C fueron tomados de Pemberton *et al.*, 2014

Por los resultados de los estudios mencionados, parece que el estado de oligomerización nativo de las ALDHs tetraméricas tiene una influencia importante sobre la actividad catalítica de estas enzimas, pero a la fecha se desconoce cuáles son las bases estructurales de esta influencia.

En otras palabras, aún no se han contestado a las siguientes preguntas: 1) ¿Cuáles son los cambios estructurales que sufre una ALDH tetramérica cuando se disocia en dos dímeros y expone las intercaras dímero-dímero al medio acuoso? 2) ¿Afectan estos cambios al sitio activo, y si sí en qué forma? 3) ¿Puede plantearse un mecanismo general que explique cuáles son los requisitos que debe poseer un tetrámero o un dímero de una ALDH para ser activos? O lo que es lo mismo, ¿qué residuos diferentes a los del sitio activo son críticos para la correcta conformación del sitio activo? Tomando a la *PaBADH* como ejemplo, en este trabajo de maestría iniciamos un estudio conducente a contestar estas preguntas, abordando la etapa inicial de encontrar las condiciones que nos permitan obtener dímeros a los que podamos medir su estabilidad y propiedades cinéticas en caso de que sean activos, para lo cual planteamos la hipótesis y los objetivos descritos a continuación.

IV. HIPÓTESIS

En la intercara dímero-dímero de la *PaBADH* existen ciertas interacciones críticas que mantienen el estado de oligomerización tetramérico de la enzima. Si se rompen estas interacciones será posible obtener dímeros de la enzima que nos darán información sobre el papel que juega la estructura tetramérica en la estabilidad y función.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Explorar el papel que juega la estructura tetramérica de la *PaBADH* en la función y estabilidad de la enzima mediante la obtención de dímeros.

V.2. Objetivos particulares

1. Identificar en la estructura tridimensional de la enzima algunos residuos de aminoácidos que posiblemente participen en la estabilización de la intercara dímero-dímero.
2. Mutar estos residuos para tratar de desestabilizar al tetrámero y obtener dímeros estables.
3. Sobreexpresar y purificar a homogeneidad a las mutantes obtenidas.
4. Caracterizar estructuralmente a las enzimas mutantes obtenidas, determinando los posibles cambios en su estructura cuaternaria, terciaria o secundaria con respecto a la enzima recombinante silvestre.
5. Caracterizar funcionalmente a las enzimas mutantes obtenidas determinando sus parámetros cinéticos (si la mutante presenta actividad) y la unión al equilibrio del NAD(P)^+ .
6. Determinar la estabilidad de las enzimas mutantes ante la desnaturalización térmica y comparar esta estabilidad con la enzima recombinante silvestre.

VI. MÉTODOS

VI.1. Identificación de residuos de la intercara dímero-dímero potencialmente críticos para la tetramerización

En este trabajo usamos a la *PaBADH*, una ALDH tetramérica, para conocer cuáles podrían ser los determinantes estructurales que participan en la formación del tetrámero en las ALDHs. Se analizaron exhaustivamente las intercaras de esta enzima utilizando PyMOL (DeLano, 2002 <http://www.pymol.org>), y se hicieron alineamientos de secuencias de las ALDHs conocidas para elegir cuáles residuos mutar con el fin de generar dímeros de la *PaBADH*. Se analizaron las interacciones y las distancias que existen entre los átomos de los residuos que forman la intercara dímero-dímero de la *PaBADH* y se determinó cuáles de ellos están presentes en las otras ALDHs tetraméricas de estructura tridimensional conocida. Con base en el número, la naturaleza, la distancia y la geometría de las interacciones se identificaron tres posiciones que podrían tener mayor relevancia para el mantenimiento de la estructura cuaternaria nativa. Así mismo se analizó cuáles eran los aminoácidos que ocupan estas posiciones en las ALDHs diméricas y cuáles eran las interacciones entre estos residuos.

El estudio de las intercaras también se realizó utilizando el servidor PISA (Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies; Krissinel y Henrick, 2007). Este servidor utiliza las coordenadas cristalográficas de un archivo PDB para encontrar los oligómeros estables que se pueden formar a partir de la cadena polipeptídica, calculando la energía de disociación de un oligómero. Para ello considera la energía asociada a la formación y rompimiento de puentes de hidrógeno y salinos así como la energía de solvatación de las subunidades disociadas.

También con el programa PISA se calculó el valor CSS (Complexation Significance Score, por sus siglas en inglés). Este valor indica que tan importante es cada intercara en la formación del ensamblado total de la molécula, en este caso un tetrámero. CSS puede tomar valores desde 0 hasta 1. Este valor se define como la fracción máxima de la energía libre total que se asocia a la intercara en complejos estables. Por ejemplo, si el único complejo estable encontrado es un tetrámero con 2 intercaras (No. 1) con un $\Delta G = -10$ kcal/M y 2 intercaras (No. 2) con un $\Delta G = -5$ kcal/M. Entonces, el valor CSS para la intercara No. 1 es igual a $2 \times 10 / (2 \times 10 + 2 \times 5) = 2/3$. Si existe un dímero con la intercara No. 1 y ésta fuera estable entonces se

alcanzaría el valor de 1. El valor de cero indica que la intercara no es significativa y que probablemente sólo se trate de contactos cristalográficos y no una intercara real.

VI.2. Obtención de las *PaBADHs* mutantes

VI.2.1. Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la mutagénesis sitio dirigida

Los oligonucleótidos para realizar las mutaciones se diseñaron con base en la secuencia del gen de la *PaBADH* y al manual del kit Quick Change XL-Site Directed Mutagenesis (Stratagene). Los oligonucleótidos usados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Pares de nucleótidos utilizados para producir cuatro mutantes en la intercara de la *PaBADH*. En negritas se indican las bases cambiadas.

Mutantes	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido
Gly125Pro	5'-gg t cccgccatcga acc gagcagattc-3'	5'-gaatctgctc ggg ttcga tg ggccgggacc-3'
Glu114Ala	5'-ccgacgtgct cg cg t actacgccgg-3'	5'-ggctgcacgag cg cgatgatcgcc-3'
Glu114Arg	5'-cgccgacgtgct ca g g tactacgccggc-3'	5'-g cg gctgcacgag tg ccatgatcgcc-3'
Gly118Asp	5'gagtactacgcc ga ctg g tcccgccatcgaa-3'	5'cttcgatggccgggaccag ct ggcgtagtactc-3'

VI.2.2. Mutagénesis sitio dirigida y amplificación por PCR

La mutagénesis se realizó utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el kit comercial *Quick Change XL-Site Directed Mutagenesis* (Stratagene) que usa a la DNA polimerasa *Pfu* Turbo. Como templado se empleó el plásmido pCAL-betB consistente en el gen de la *PaBADH* silvestre (*betB*) insertado en el plásmido pCALn (Velasco-García *et al.*, 2006a).

En la PCR se realizaron 18 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C por 50 s, alineamiento a 60 °C durante 50 s, extensión a 68 °C por 7 min. Finalmente el producto de la PCR fue tratado con la enzima *DpnI* durante 1 h a 37 °C para eliminar el DNA parental metilado. Los productos de PCR se secuenciaron para confirmar que se había mutado el residuo deseado y no se había introducido ninguna otra mutación.

VI.2.3. Transformación de células de *E. coli* y sobreexpresión de las *PaBADHs* mutantes

Con el producto de la PCR se transformaron mediante choque térmico células competentes de *E. coli* XL10 Gold (Stratagene) las cuales se dejaron crecer toda la noche a 37 °C en una placa con medio Luria-Bertani (LB) con agar y 50 µg/ml de ampicilina . De las colonias transformantes se tomó una al azar para extraer DNA y secuenciar el gen completo de la *PaBADH* y para transformar nuevamente por choque térmico células de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS (Stratagene).

Para la sobreexpresión de la proteína mutante, las células se crecieron en medio LB líquido con 50 µg/ml de ampicilina hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. Se agregó entonces IPTG a una concentración final de 0.1 mM y se mantuvo el cultivo en agitación a 250 rpm a 37 °C por 4 h.

VI.2.4. Purificación de las *PaBADHs* mutantes

Las *PaBADH* mutadas se purificaron de acuerdo a la metodología descrita por Velasco-García *et al.* (1999) y a la modificación descrita en González-Segura *et al.* (2005). Este protocolo consiste en el paso del extracto libre de células a través de una columna de intercambio iónico Q-Sepharose Fast Flow (General Electric) y la elución de la enzima con un gradiente creciente de KCl (50-350 mM). Las fracciones que contenían BADH se sometieron a cromatografía de afinidad 2',5'-ADP Sepharose (General Electric), que se eluyó con un gradiente de pH (6.5-8.5). Todos estos pasos fueron realizados a una temperatura de 4 °C.

Siguiendo este proceso de purificación no fue posible purificar a las mutantes Gly125Pro ni a la Gly118Asp, por lo que se empleó otro paso de cromatografía de intercambio iónico de mayor resolución usando la resina MonoQ (General Electric) acoplada a un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC Waters). La proteína se eluyó a temperatura ambiente con un gradiente de KCl de 50-350 mM. La enzima recuperada se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

VI.3. Caracterización funcional de las *Pa*BADHs mutantes

VI.3.1. Estudios cinéticos: Medida de la actividad enzimática

La actividad enzimática de la *Pa*BADH silvestre y de las mutantes se determinó espectrofotométricamente siguiendo el incremento en la absorbancia a 340 nm debido a la formación de NAD(P)H, cuyo coeficiente de absortividad molar (ϵ) a esta longitud de onda es $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Horecker y Kornberg, 1948). El medio de reacción consiste en BAL 1 mM y NAD(P)⁺ 1 mM en amortiguador de fosfatos (KH₂PO₄/K₂HPO₄) 100 mM, pH 8.0, en un volumen final de 500 μ l. La reacción se midió a 30 °C y se inició con la adición de la preparación de enzima.

Para el cálculo de la actividad específica (U/mg de proteína) se determinó la concentración de la *Pa*BADH espectrofotométricamente, usando un coeficiente de absortividad molar a 280 nm, $\epsilon_{280\text{nm}}$, de $52620 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ calculado a partir de la secuencia de aminoácidos de la *Pa*BADH según el método reportado por Gill y von Hippel (1989).

VI.3.2. Estudios de unión al equilibrio: Determinación de la constante de disociación del NAD(P)⁺

Las constantes de disociación de los complejos de los dinucleótidos con la enzima *Pa*BADH Glu114Ala y de la Gly118Asp se determinaron siguiendo el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la proteína producido por la unión del NAD(P)⁺. Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro RF-5000U (Shimadzu), la temperatura se mantuvo constante a 30 °C. Para la mutante Glu114Ala se utilizó el amortiguador B (ver abajo en el texto) y para la mutante Gly118Asp se empleó el amortiguador A. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 296 nm y se registró la emisión en el intervalo de 300 a 450 nm (con un ancho de banda de 5 nm). La concentración de enzima utilizada fue de 0.25 y de 0.025 mg/ml.

Las titulaciones con NAD(P)⁺ se llevaron a cabo adicionando alícuotas de disoluciones concentradas del dinucleótido a la celda de fluorescencia. Las disoluciones se equilibraron por 2 min después de cada adición antes de la lectura de fluorescencia. Los valores de fluorescencia fueron corregidos por el efecto de la dilución de la enzima. Los resultados se presentan como porcentaje de la fluorescencia inicial y se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$\Delta F = \Delta F_{\text{máx}}[\text{NAD(P)}^+]/(K_d + [\text{NAD(P)}^+])$$

Ecuación 1

Donde ΔF es la diferencia en la intensidad de fluorescencia de la proteína en ausencia y presencia de nucleótido; $\Delta F_{\text{máx}}$ es la diferencia cuando la enzima está completamente saturada con el NAD(P)^+ y K_d es la constante de disociación del NAD(P)^+ e indica la concentración de ligando con la que se tiene la mitad del cambio máximo de fluorescencia, es decir el 50% de saturación de la enzima con el nucleótido.

VI.4. Caracterización estructural de las *Pa*BADH mutantes

VI.4.1. Cromatografía de exclusión molecular

El estado de agregación de las enzimas se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular registrando los perfiles de elución midiendo la absorbancia a 280 nm. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando la columna Superdex 200 HR 10/30 (General Electric) conectada a un HPLC (Waters). Como control del estado tetramérico se usó la *Pa*BADH silvestre a 0.25 mg/ml y del dimérico a la *So*BADH silvestre también a 0.25 mg/ml. Cabe señalar que estas enzimas mantienen dicho estado de oligomerización al menos en el intervalo de concentración de 0.025 a 14 mg/ml en el caso de la *Pa*BADH y de 0.025 a 2 mg/ml en el caso de la *So*BADH. La columna fue equilibrada y eluida a temperatura ambiente, usando un flujo de 0.5 ml/min y alguno de los siguientes amortiguadores:

Amortiguador A: Fosfatos de potasio 10 mM, pH 6.9, complementado con EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, glicerol 10 % (v/v), y KCl 150 mM.

Amortiguador B: Fosfatos de potasio 10 mM, pH 6.9, complementado con EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, y KCl 150 mM.

Amortiguador C: Fosfatos 10 mM pH 6.9 complementado con EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, glicerol 10 % (v/v), y KCl 250 mM.

VI.4.2. Fluorescencia intrínseca de los aminoácidos aromáticos

La estructura terciaria de las mutantes Glu114Ala y Gly118Asp se estudió por medio de la fluorescencia intrínseca de los aminoácidos aromáticos. Los espectros de fluorescencia se

obtuvieron a 25 °C en un espectrofluorómetro ISS PC1 con un regulador de temperatura tipo Peltier, utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz y una concentración de enzima de 50 µg/ml. La fluorescencia de las tirosinas y los triptofanos se determinó excitando a 280 nm y midiendo la emisión entre 300 y 500 nm, con anchos de banda de excitación y de emisión de 1 y 2 nm respectivamente.

VI.4.3. Dicroísmo circular

Los posibles cambios en la estructura secundaria producidos por las mutaciones Glu114Ala y Gly118Asp se exploraron por DC en el UV lejano. En el intervalo de 205 a 250 nm en un espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Inc., Easton MD, USA) acoplado a un controlador de temperatura tipo Peltier Jasco 423S. Las muestras de proteína, a una concentración de 0.25 mg/ml en amortiguador D (Fosfatos de potasio 10 mM pH 6.9, complementado con EDTA 1 mM, DTT 0.5 mM, glicerol 10 % (v/v) y KCl 150 mM) se colocaron en una celda de cuarzo con un paso de luz de 0.1 cm. La temperatura a la que se tomaron los espectros fue de 20 °C. Los datos que se presentan son el promedio de dos mediciones.

VI.5. Análisis de la estabilidad de la *PaBADH* Glu114Ala y Gly118Asp frente a la desnaturalización térmica

La estabilidad térmica de las enzimas silvestre y de las mutantes Glu114Ala y Gly118Asp (0.25 mg/ml) se siguió por DC en el UV lejano utilizando el espectropolarímetro y las condiciones antes mencionadas (Método sección V.4.3.). Se siguió el cambio de elipticidad a 222 nm en un intervalo de temperatura de 20 a 80 °C, usando una velocidad de calentamiento de 1.5 °C/min. Los datos obtenidos se ajustaron a una ecuación de Boltzman (Ecuación 2).

$$\text{Fracción desnaturalizada (\%)} = [(A_1 - A_2) / (1 + \exp^{(T - T_{m1})/m1})] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde A_1 y A_2 representan el valor de la señal antes y después de la transición, T_{m1} es la temperatura a la que se tiene el 50 % de la proteína desnaturalizada y m es la pendiente de la curva en el punto de transición e indica el grado de cooperatividad del proceso.

VI.6. Modelaje de proteínas

La estructura tridimensional de las proteínas mutantes se modelaron mediante HMMs (Hidden Markovian Models) por el servidor SAM-T08 (Sequence Alignment and Modeling Software System), a partir de su secuencia. El archivo de salida generado por el servidor SAM-T08 (K. Karplus, *et al.*, 1998) contiene información sobre las coordenadas y los estados intermedios de modelado, además de las predicciones de contactos dentro de la estructura tridimensional. Para corregir las anomalías presentes en las distancias interatómicas y longitudes de enlace respetando la conectividad en la estructura tridimensional, pero restringiendo la movilidad para evitar cambios drásticos al patrón de plegamiento, los modelos obtenidos de SAM-T08 se sometieron a una minimización de la energía del sistema empleando el campo de fuerzas AMBER en Hyperchem Versión 7.5 Hypercube Inc, debido a que permite importar estructuras en las que la geometría de algunos enlaces esté severamente distorsionada sin introducir rupturas en la continuidad de la cadena polipeptídica.

VI.7. Figuras y comparaciones estructurales

Para la comparación de estructuras y las figuras de las estructuras tridimensionales de proteínas se usó el programa PyMOL (DeLano, 2002 <http://www.pymol.org>). En todos los casos cuando se empleó la estructura de la *Pa*BADH silvestre se utilizaron las coordenadas cristalográficas de la estructura con el código PDB 2wme.

VII. RESULTADOS

VII.1. Análisis de las intercaras de la *Pa*BADH

VII.1.1. Intercara monómero-monómero (intercaras A-B y C-D)

Esta es la intercara más extensa y mediante la cual se forma al dímero; participan 89 de los 490 residuos del monómero, lo que corresponde al 18.2% del total de residuos que tiene cada subunidad (Fig. 9). El análisis de esta intercara mediante el programa PISA (Krissinel y Henrick, 2007) muestra que al formarse el dímero se esconde un área accesible al solvente (ASA) de 3,353 Å², lo que representa el 16% del ASA total de un monómero aislado (20,442 Å²). En esta intercara se forman 53 puentes de hidrógeno y 8 puentes salinos. El valor CSS calculado por el programa PISA para la intercara A-B de la *Pa*BADH es de 0.107.

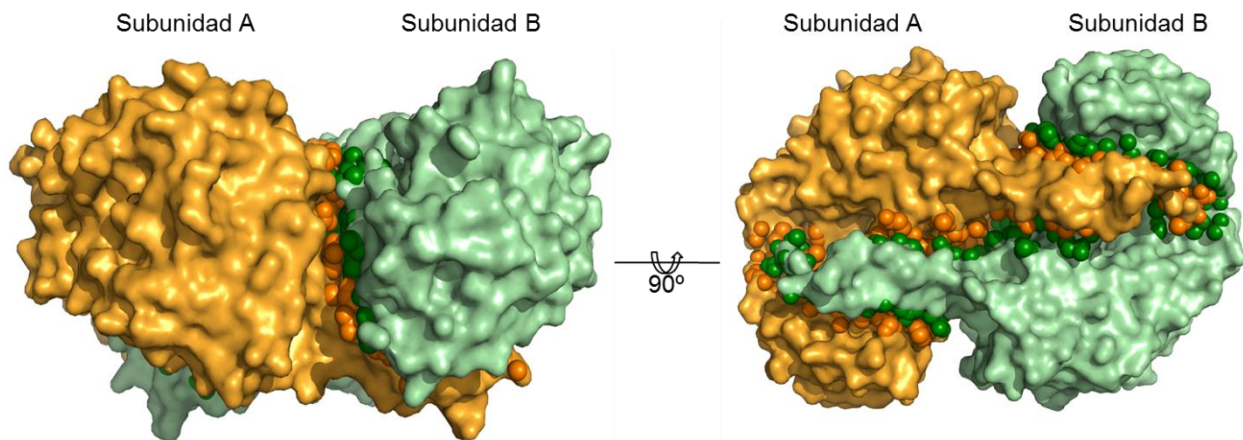


Figura 9. Intercara monómero-monómero de la *Pa*BADH tetramérica. En esferas y en un tono más intenso están representados los átomos de una subunidad que interactúan con los de la subunidad enfrentada.

No quisimos alterar esta intercara porque es de esperarse que el monómero sea inestable en disolución, dada su estructura no compacta (ver Fig. 3A). En un monómero aislado se expondrían muchos residuos hidrofóbicos y la región carboxilo terminal que constituye el dominio de oligomerización podría interactuar inespecíficamente, lo que muy probablemente llevaría a la formación agregados.

VII.1.2. Intercaras dímero-dímero

Nuestro objetivo era obtener dímeros, por lo que nos propusimos alterar alguna de las dos intercaras dímero-dímero por medio de las cuales interacciona un dímero con otro para formar el tetrámero. A continuación se describen estas intercaras y se explican las razones que llevaron a seleccionar los residuos que mutamos.

VII.1.2.1. Intercaras A-C y B-D

De las intercaras que forman las subunidades de la *PaBADH* ésta es la menos extensa. Por monómero participan 25 residuos (Tabla 3 y Fig. 10), lo que corresponde al 5% de los totales de la proteína; abarca un ASA de 725 \AA^2 lo que corresponde a un 3.7%, del total y se forman 8 puentes de hidrógeno (Tabla 4) y ningún puente salino. El valor CSS calculado para esta intercara es de 0.017, casi 10 veces menor que el valor calculado para la intercara monómero-monómero.

De los residuos que componen esta intercara, el 44% son no-polares, 28% son polares sin carga y 28% son cargados, pero las cadenas laterales de estos últimos no participan directamente en la formación de la intercara porque están dirigidas hacia el interior de la subunidad. En las Figuras 10 y 11 se muestra la ubicación de los residuos de la estructura de la *PaBADH*. Casi todos ellos se encuentran en el dominio de oligomerización, concretamente en las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$, y en una pequeña región de la hélice $\alpha 18$, que pertenece al dominio catalítico.

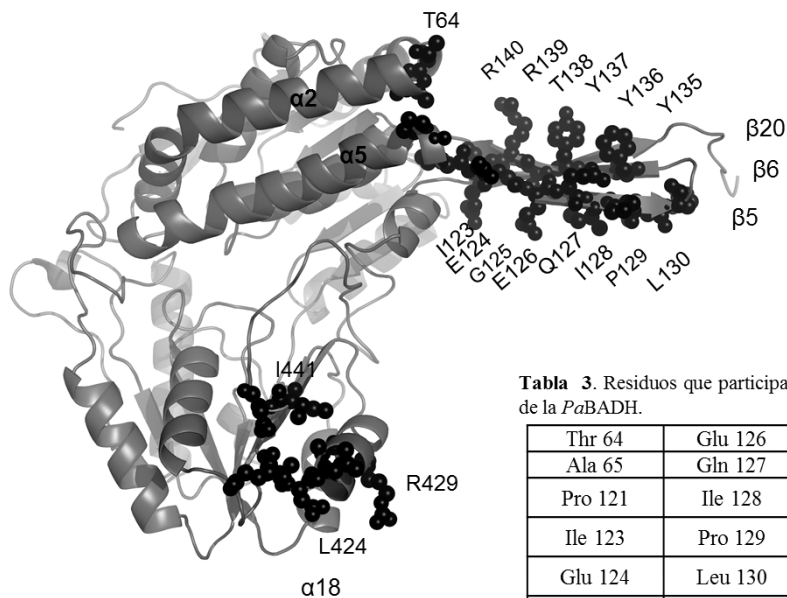


Tabla 3. Residuos que participan en el establecimiento de la intercara A-C y B-D de la *PaBADH*.

Thr 64	Glu 126	Phe 135	Gln 422	Ile 441
Ala 65	Gln 127	Tyr 137	Asp 423	Asp 442
Pro 121	Ile 128	Thr 138	Leu 424	
Ile 123	Pro 129	Arg 139	Ala 427	
Glu 124	Leu 130	Arg 140	His 428	
Gly 125	Arg 131	Thr 421	Arg 429	

Figura 10. Monómero de la *PaBADH* mostrando en esferas negras los residuos que participan en la formación de la intercara A-C y B-D.

Tabla 4. Puentes de hidrógeno que se establecen en la intercara A-C y B-D de la *PaBADH*

Subunidad A	Distancia (Å)	Subunidad C
[O] Gly 125	3.06	[N] Gln 127
[N] Gly 125	2.94	[O] Gln 127
[O] Gln 127	2.90	[N] Gly 125
[N] Gln 127	3.13	[O] Gly 125
[NE2] Gln 127	2.92	[O] Thr 138
[O] Thr 138	2.95	[NE2] Gln 127
[N] Leu 424	2.95	[O] Gln 422
[O] Gln 422	2.91	[N] Leu 424

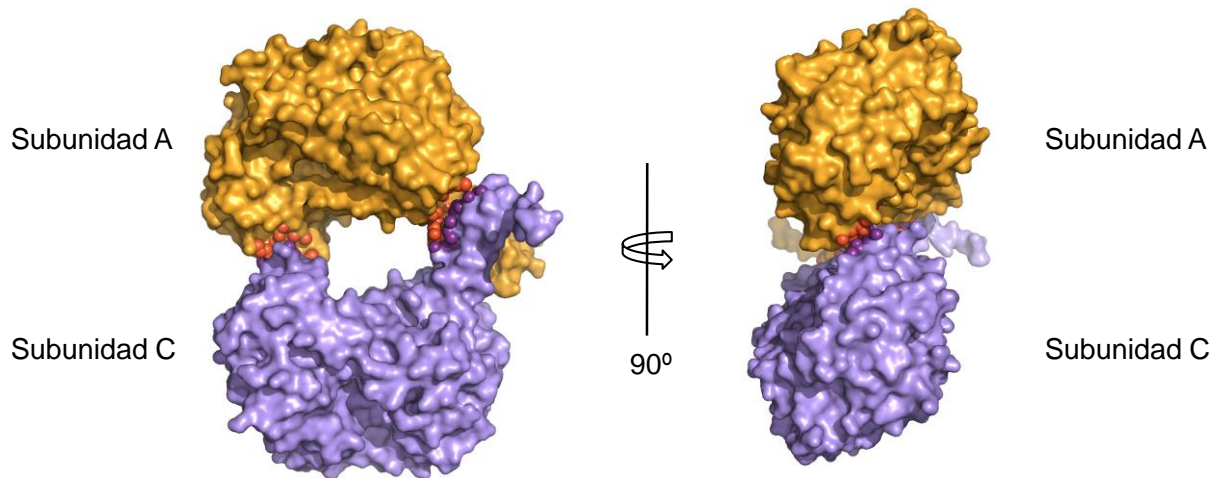


Figura 11. Representación en superficie de las subunidades A y C de la *PaBADH* mostrando dos vistas de la intercara A-C. En esferas y en un tono más intenso están representados los átomos de una subunidad que interactúan con los de la subunidad enfrentada.

De estos residuos la Gly125 merece especial atención porque en un estudio filogenético de enzimas ALDH con actividad BADH (Julián-Sánchez *et al.*, 2007) se había encontrado que las ALDH9 tetraméricas poseen esta Gly mientras que las ALDH10 y ALDH25 diméricas poseen otro residuo con una cadena lateral más voluminosa, frecuentemente una Lys (Fig. 12), de manera que parecía ser ésta una sinapomorfía de las enzimas tetraméricas.

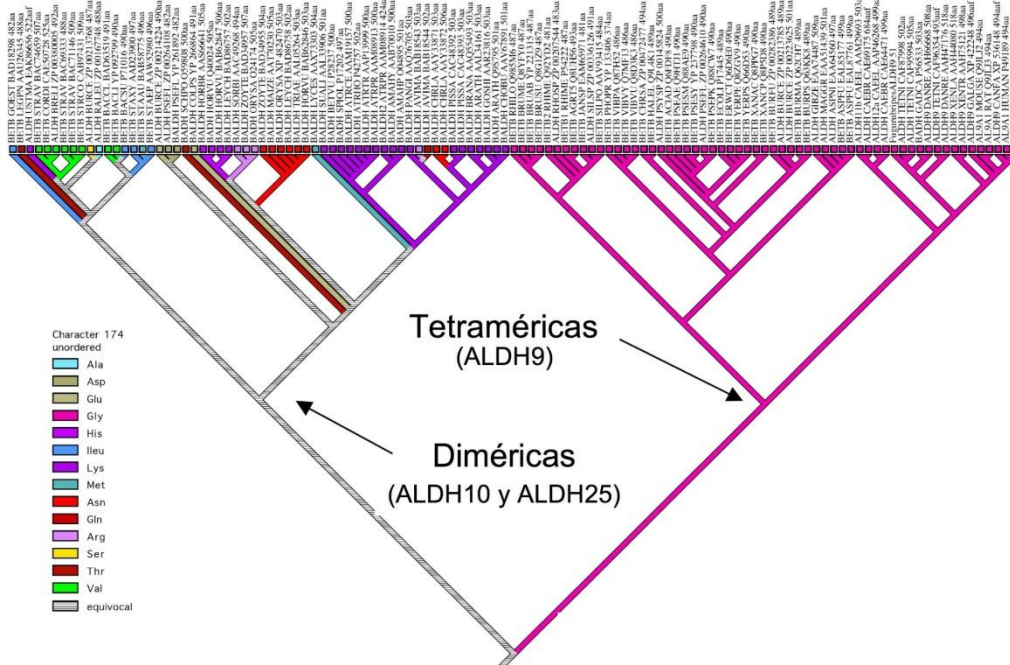


Figura 12. Sinapomorfía de las ALDH9. En la figura se muestra el sitio 174 del alineamiento de las secuencias de las tres familias de BADHs, correspondiente al residuo Gly125 de la *PaBADH*. La rama izquierda contiene las secuencias conocidas de las BADHs diméricas de plantas (ALDH10) y de firmicutes y actinobacterias (ALDH25). La rama derecha contiene a las secuencias de las BADHs tetraméricas de animales, proteobacterias y hongos (ALDH9). En la figura se muestra que el residuo de Gly está estrictamente conservado en estas últimas, por lo que se propuso como un residuo implicado en la diferencia de estado de oligomerización entre las familias de BADHs diméricas y tetraméricas. Tomado de Julián-Sánchez *et al.* (2007).

Por los resultados de este estudio filogenético y por la posición de la Gly125 en la intercara A-C de la *PaBADH* (Fig. 13), se pensó que la presencia de este residuo, cuya cadena lateral es la más pequeña de la de todos los aminoácidos, podría ser crítico para la formación del tetrámero ya que permitiría el acercamiento de los dímeros, y viceversa, cualquier otro residuo en esta posición impediría la formación del tetrámero. La Gly125 está al inicio de la hebra $\beta 5$ y los átomos de su cadena principal forman de dos puentes de hidrógeno con la cadena principal de la Gln127 que está en la hebra $\beta 5$ de la subunidad enfrentada (Fig. 13B).

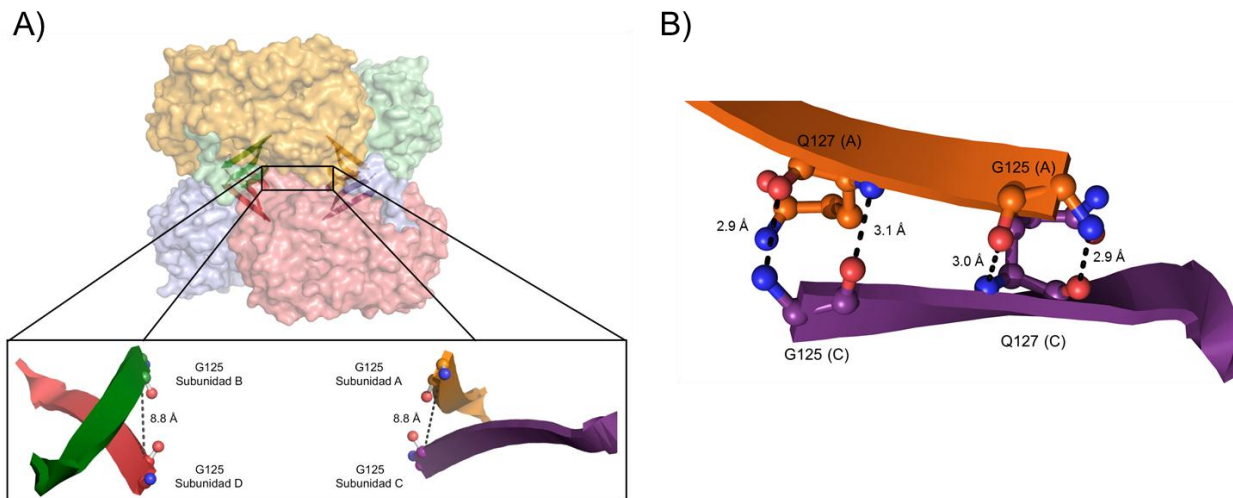


Figura 13. A) Representación en superficie del tetrámero de la *PaBADH*. Las hebras $\beta 5$ donde se ubican los residuos Gly125 se muestran amplificadas en el recuadro, y se indican las distancias entre los $C\alpha$ de estos residuos. B) Puentes de hidrógeno entre las Gly125 y las Gln127 de las subunidades A y C. La subunidad A está en color anaranjado, la subunidad B en verde, la subunidad C en morado y la subunidad D en rojo.

En mi tesis de licenciatura se mutó este residuo por una lisina y se obtuvo una enzima tetramérica sin actividad enzimática, que une muy pobremente al $NAD(P)^+$. El modelo por homología de la mutante Gly125Lys indicó que la cadena lateral de la Lys se orienta hacia el interior de su misma subunidad donde interacciona con las cadenas principales de la Arg139 o de la Tyr137 o con la cadena lateral de la Gln127, por lo que esta mutación alteraba severamente la estructura terciaria nativa de la enzima causando su inactivación. La estructura cuaternaria, sin embargo, seguía siendo tetramérica (Sánchez-Izquierdo, 2010).

VII.1.2.2. Intercaras A-D y B-C

En estas intercaras participan 31 residuos por monómero, lo que corresponde al 6.3% de los totales de la proteína y a un ASA de 1110 \AA^2 (5% del total). El valor CSS para esta intercara es de 0.025, lo que indica una ligera mayor participación de estas intercaras en el establecimiento del tetrámero que la que aporta la intercara A-C. De los residuos que la forman el 48.4% son no-polares, el 6.4% son polares sin carga y el 45.2% son residuos cargados. En la Tabla 5 se da una lista de todos estos residuos y en la Figuras 14 y 15 se muestra su ubicación en el monómero y en dímero de la *PaBADH*, respectivamente. La mayor parte de ellos se encuentran en las hélices $\alpha 2$

y $\alpha 5$ del dominio de unión a la coenzima y en la hélice $\alpha 18$ que pertenece al dominio catalítico. Sin embargo, ninguno de estos residuos participa directamente en la unión ni del NAD(P)⁺ ni de la BAL. En esta intercara se forman 9 puentes salinos (Tabla 6).

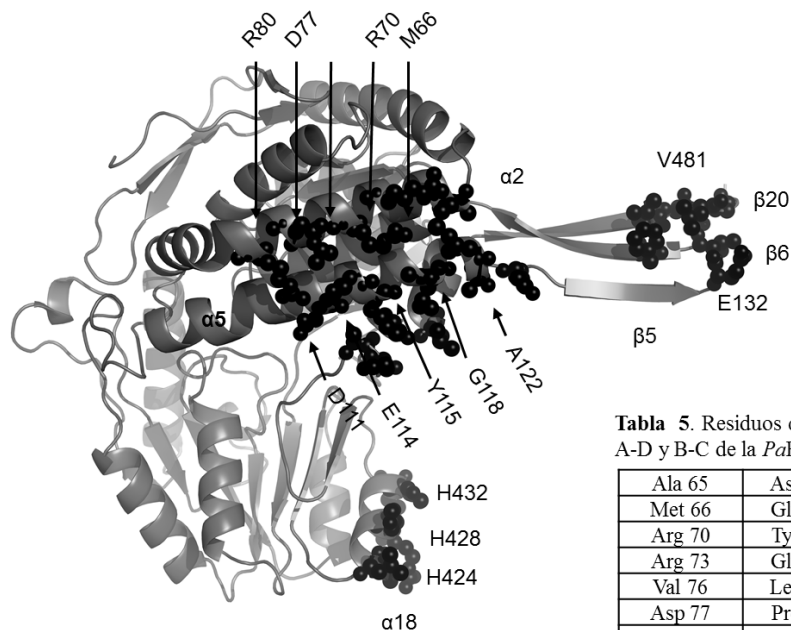


Tabla 5. Residuos que participan en el establecimiento de la intercara A-D y B-C de la PaBADH.

Ala 65	Asp 111	Glu 124	Arg 429	Glu 482
Met 66	Glu 114	Glu 132	His 432	Leu 483
Arg 70	Tyr 115	Thr 133	Arg 433	Gly 484
Arg 73	Gly 118	Phe 135	Ala 449	
Val 76	Leu 119	Leu 424	Glu 450	
Asp 77	Pro 121	Ala 425	Leu 467	
Arg 80	Ala 122	His 428	Val 481	

Figura 14. Monómero de la PaBADH mostrando como esferas negras los residuos que participan en la formación de la intercara A-D y B-C.

Tabla 6. Puentes salinos que se establecen en la intercara A-D de la PaBADH.

Subunidad A	Distancia (Å)	Subunidad D
[NH2] Arg 70	3.95	[OD1] Asp 111
[NH2] Arg 70	3.11	[OE1] Glu 114
[NE] Arg 70	2.98	[OE2] Glu 114
[NH1] Arg 73	3.63	[OE2] Glu 114
[NH2] Arg 73	2.84	[OE2] Glu 114
[OD1] Asp 111	3.71	[NH2] Arg70
[OE1] Glu 114	2.89	[NH2] Arg 70
[OE2] Glu 114	3.00	[NH2] Arg 70
[OE2] Glu 114	2.63	[NH2] Arg 73

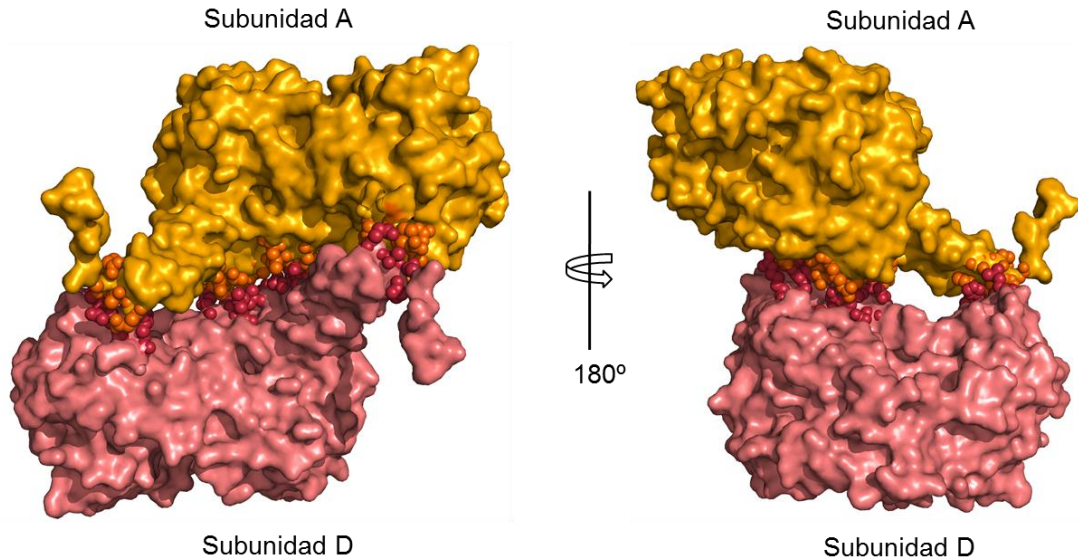


Figura 15. Representación en superficie de las subunidades A y D de la *PaBADH* mostrando dos vistas de la intercara A-D. En esferas y en un tono más intenso están representados los átomos de una subunidad que interaccionan con los de la subunidad enfrentada.

En el trabajo mencionado de Julián-Sánchez *et al.* (2007) también se propuso que la Gly131 de la BADH tetramérica de bacalao (Gly118 en la numeración de la *PaBADH*) era otra sinapomorfía de las ALDH9 tetraméricas. De nuevo, este resultado era consistente con el hallazgo de que en la *PaBADH* el carbono α de la Gly118 de la cadena A está enfrentado con el carbono α de la Gly118 de la cadena D, respectivamente, a una distancia de 3.7 Å (Fig. 16), lo que no permitiría que otros residuos con cadenas laterales más grandes ocupen esta posición. Por tanto, la Gly118 parecía ser un residuo importante para la tetramerización de estas enzimas.

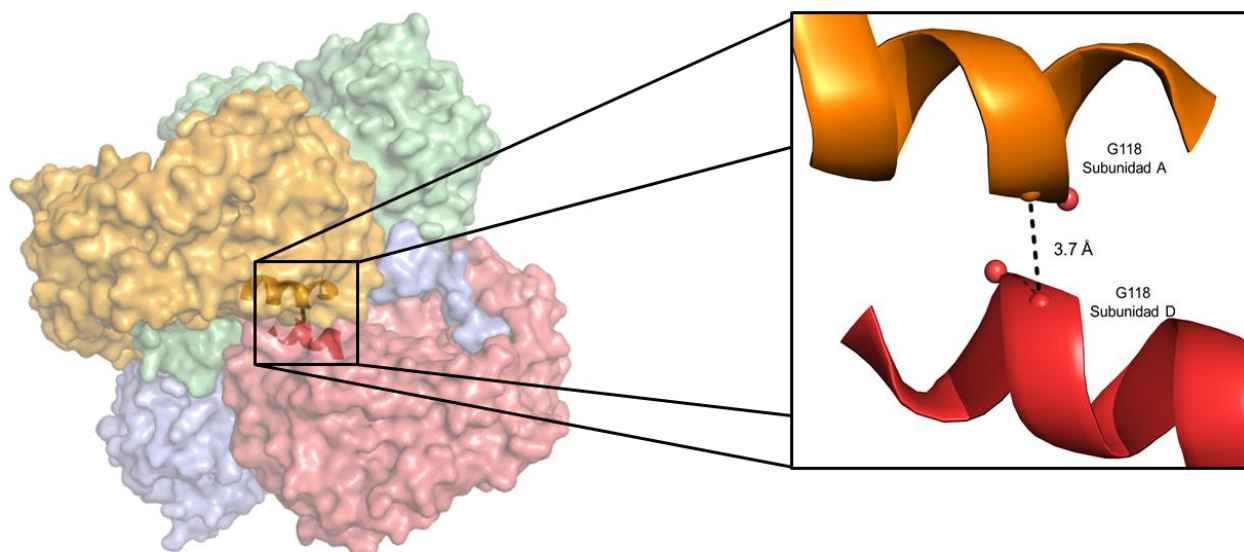


Figura 16. Representación en superficie del tetrámero de la *PaBADH*. La hélice $\alpha 5$ donde se ubica el residuo Gly118 se muestra como listón. En el recuadro se muestra un acercamiento de esta región, indicando la distancia entre los carbonos α de las glicinas de dos subunidades enfrentadas. La subunidad A está en color anaranjado, la subunidad B en verde, la subunidad C en morado y la subunidad D en rojo.

En el alineamiento previamente citado se observó que un residuo frecuente en esta posición en las ALDH10 de plantas que son dimericas era el Asp, por lo que se decidió hacer la mutante *PaBADH* Gly118Asp ya que además de introducir una cadena lateral más voluminosa, se introducirían dos cargas negativas enfrentadas que se esperaba ayudarían a impedir la formación del tetrámero.

Por otra parte, al analizar la intercara dímero-dímero de la *PaBADH* se encontró que en la intercara A-D existe una región donde se forma una red de 9 puentes salinos (Tabla 6), formados por la Arg70 y la Arg73, ubicadas en la hélice $\alpha 2$, y el Asp111 y el Glu114 ubicados en la hélice $\alpha 5$. La hélice $\alpha 2$ se enfrenta a la hélice $\alpha 5$ de la subunidad vecina, y viceversa. En la Figura 17 se observa la localización de estos residuos y las interacciones entre ellos. A esta extensa red se suman numerosos puentes de hidrógeno que se establecen entre estos residuos de las dos subunidades vecinas a través de moléculas de agua. Estas interacciones también están presentes en la intercara B-C. Por esta razón decidimos mutar el residuo Glu114.

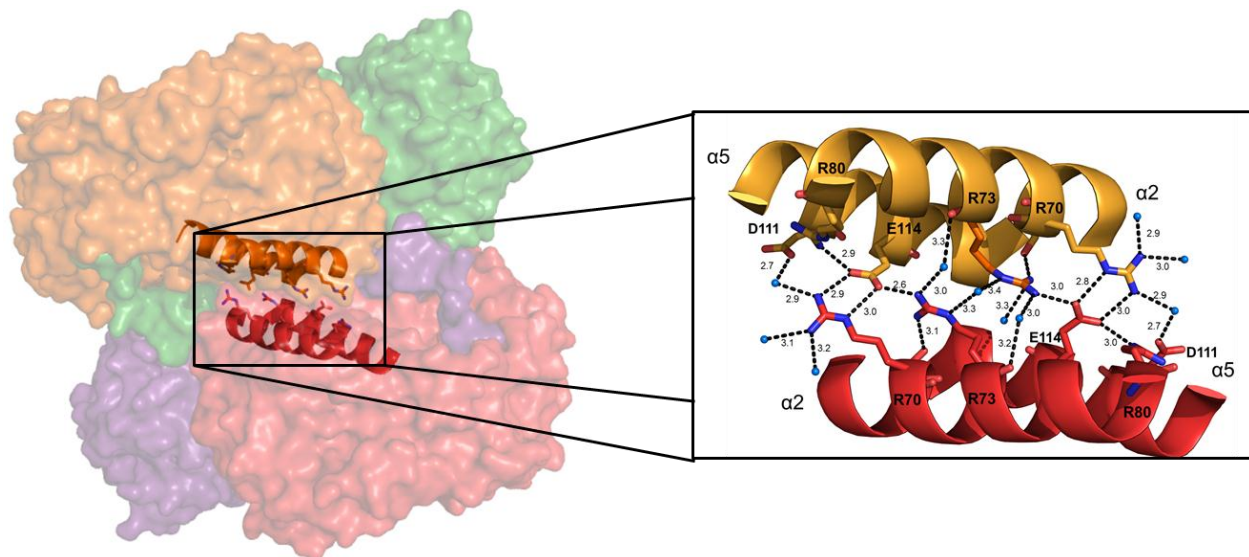


Figura 17. Representación en superficie del tetrámero de la *PaBADH*. Las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 5$ donde se ubican los residuos Arg70, Arg73, Asp111 y el Glu114 se muestran como listones. En el recuadro se muestra un acercamiento de esta región, indicando las interacciones que forman los residuos mencionados así como las distancias de enlace. La subunidad A está en color anaranjado, la subunidad B en verde, la subunidad C en morado y la subunidad D en rojo.

Dada la extensa red de puentes salinos que existen en esta intercara dímero-dímero, se decidió mutar el residuo Glu114, que está formando puentes salinos con tres argininas de la hélice $\alpha 2$: Arg80 de su propia subunidad y Arg70 y Arg73 de la misma hélice pero de la subunidad vecina. Se esperaba impedir que dichos puentes se formen y así probar la importancia de estas interacciones en la formación del tetrámero. Puesto que la cadena lateral del Glu114 se orienta hacia la otra subunidad, mutar este residuo no debería dañar la estructura monomérica de la enzima, como ocurrió con la mutación Gly125Lys mencionada anteriormente, aunque pudiera ser que para el correcto plegamiento de la enzima se requiera la adquisición de la estructura cuaternaria nativa. El residuo Glu114 se mutó por una alanina para impedir que la extensa red de interacciones en que este residuo participa se pudiera formar, y también por una arginina para introducir una carga positiva más en esta intercara, lo que se esperaba llevara a las argininas que el Glu114 está neutralizando a repelerse, impidiendo así la formación del tetrámero.

A continuación se presentan los resultados obtenidos al estudiar las mutantes generadas.

VII.2. Mutante *PaBADH* Gly125Pro

En esta tesis de maestría se decidió seguir estudiando la importancia del residuo Gly125 en la formación del tetrámero de la *PaBADH* y para ello se diseñó una nueva mutante en esta posición, introduciendo ahora una prolina. Como se mencionó, este residuo está al inicio de una hebra β , por lo que se pensó que si se cambiaba por una prolina el cambio que este residuo provoca en la cadena principal produciría una alteración estructural que impediría la formación de la hoja β que incluye hebras de las dos subunidades enfrentadas y por tanto la formación del tetrámero.

VII.2.1. Purificación de la *PaBADH* Gly125Pro

En un inicio se trató de purificar esta enzima siguiendo el mismo protocolo de purificación que para la enzima silvestre (González-Segura *et al.*, 2005), pero no se pudo purificar por medio de la cromatografía de afinidad, ya que no se unió a la resina 2',5'-ADP Sepharose (un análogo del NADP⁺). Esto indica que la mutación tiene un efecto negativo importante sobre el sitio de unión al nucleótido, lo que es consistente con el hallazgo de que no tiene actividad catalítica, aun cuando el ensayo se realice usando altas concentraciones de sustratos y/o de enzima. Sin embargo se logró una buena purificación con el paso de la cromatografía de intercambio iónico, lo que nos permitió estudiarla.

VII.2.2. Determinación del estado de oligomerización de la *PaBADH* Gly125Pro

El efecto de la mutación sobre el estado de oligomerización se investigó mediante cromatografía de exclusión molecular usando disoluciones de proteína a tres concentraciones distintas (2.5, 0.25 y 0.025 mg/ml). La columna se equilibró y eluyó con el amortiguador A. Como controles del estado tetramérico se usó a la *PaBADH* y del dimérico a la *SoBADH* que en este intervalo de concentración conservan su estado de oligomerización nativo. Los perfiles de elución obtenidos fueron comparados con los de los controles (Fig. 18).

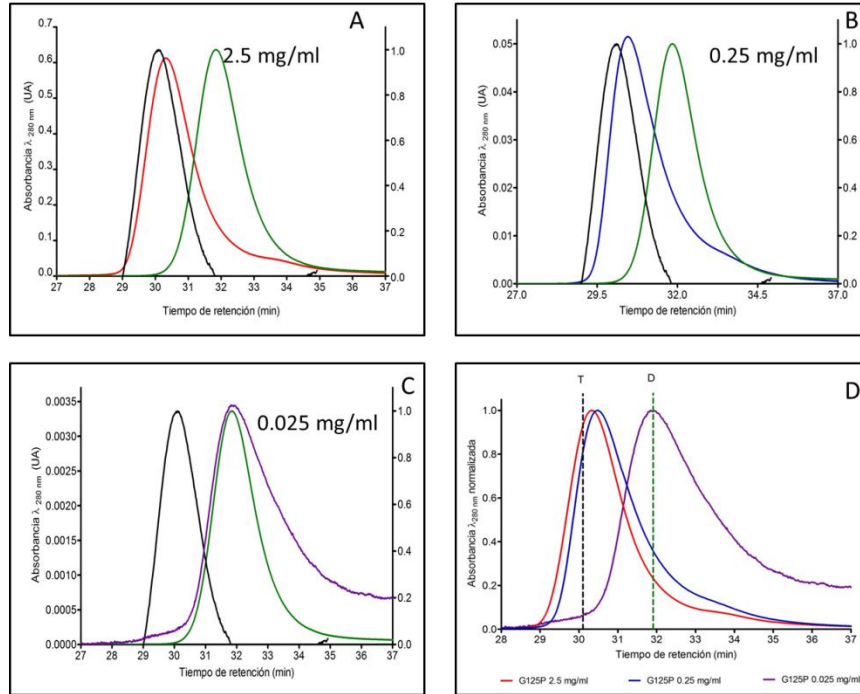


Figura 18. Perfiles de elución de la columna de exclusión molecular de la mutante Gly125Pro de la *PaBADH*. La columna se equilibró y eluyó con el amortiguador A y la concentración de proteína fue de 2.5 mg/ml (A; línea roja), 0.25 mg/ml (B; línea azul), o 0.025 mg/ml (C; línea morada). En negro y verde se muestran los perfiles de elución normalizados de la *PaBADH* y de la *SoBADH* silvestres respectivamente. D) Cromatogramas normalizados para facilitar la comparación entre las tres concentraciones utilizadas

En ninguna de las concentraciones de la Gly125Pro utilizadas para este experimento se observaron picos simétricos al eluir la proteína, lo que indica la presencia de más de una especie oligomérica. Dado que el proceso de cromatografía implica la dilución de la enzima es probable que la aparición de estas otras especies se dé durante el proceso de cromatografía. A 2.5 mg/ml la mayor parte de la enzima es tetramérica, aunque se observa que hay algo de dímero. La enzima inyectada a 0.25 mg/ml muestra un perfil muy parecido al que presenta la concentración anterior más alta, aunque es menos simétrico, indicando la presencia de una mayor proporción de enzima dimérica; además, el máximo se ha desplazado hacia especies de menor tamaño. En la disolución de proteína a 0.025 mg/ml la especie predominante es el dímero que exhibe un tiempo de retención igual que el que presenta el dímero silvestre; sin embargo, el pico no es simétrico lo que sugiere la presencia de monómeros.

Tampoco se observó actividad en ninguna concentración estudiada ni antes de inyectarla a la columna ni en ninguna de las fracciones obtenidas al eluirlo. Esta mutación tuvo como consecuencia la pérdida total de actividad, probablemente debido a que la enzima no une o no une de manera correcta a los nucleótidos. Esto lo suponemos porque la enzima mutante no se une a la columna de afinidad. Aunque la mutación permite que a concentraciones relativamente altas de proteína (2.5 mg/ml) se formen tetrámeros, éstos no tienen actividad, lo que indica que tienen una conformación no-nativa. Además esta mutante es susceptible a la disociación al disminuir la concentración de proteína en el intervalo estudiado (2.5-0.025 mg/ml). Hay que recordar que la enzima silvestre permanece tetramérica en este intervalo. Al mismo tiempo posee una alta tendencia a la agregación: a una concentración de 3 mg/ml comienzan a aparecer agregados visibles de proteína que una vez formados ya no se pueden disgregar, mientras que la enzima silvestre permanece soluble hasta 20 mg/ml. Creemos que estos agregados pueden formarse debido a los cambios en estructura que conlleva esta mutación, que resultan probablemente en la exposición al medio acuoso de regiones hidrofóbicas.

Para entender mejor cuál podría ser el efecto de la introducción de una prolina en esta posición sobre la estructura tridimensional de la enzima se realizó la mutación *in silico* Gly125Pro (ver Métodos). Tras la minimización de energía sólo se encontró un cambio no muy importante en la estructura secundaria de la proteína: mientras que en la enzima silvestre la Gly125 es el residuo inicial de la hebra $\beta 5$ de una gran hoja formada por las cuatro subunidades de la enzima (Figs. 19A y 19C), en la mutante se pierde la hebra en este residuo y se forma un asa (Fig. 19B). Sin embargo, este cambio no parece interferir con la formación de esta gran hoja β que resulta al asociarse las cuatro subunidades de la *PaBADH*. Los puentes de hidrógeno que la cadena principal de la Gly125 hacía con la subunidad vecina siguen haciéndose en el modelo de la mutante *in silico*, y la cadena lateral de la Pro no choca con la de la Gln127, que sigue haciendo en el modelo las mismas interacciones que hacía en el cristal de la enzima silvestre. Este cambio de estructura secundaria no parece, por tanto, ser suficiente para que se obtengan exclusivamente dímeros a concentraciones medias o altas de proteína. Además en el resto de la estructura modelada de la mutante no se observa algún otro cambio con respecto a la estructura de la enzima silvestre, lo que no es consistente con la pérdida de actividad de la mutante, que claramente está indicando cambios importantes en la región del sitio activo, aun a concentraciones en que la enzima es tetramérica. Por ello, no creemos que el modelo de la

mutante *in silico* esté dando información confiable sobre los cambios que se producen en la proteína mutada.

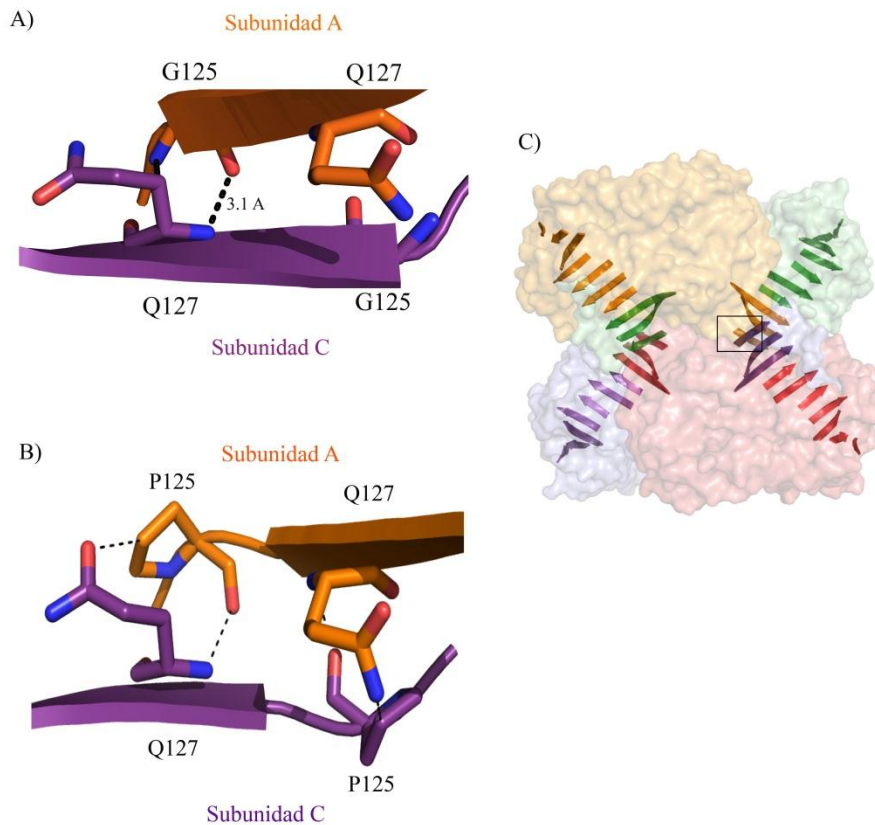


Figura 19. A) Interacciones de la Gly125 (enzima silvestre) y B) de la Gly125Pro (mutante) entre las subunidades A y C con la Gln127 de la subunidad enfrentada. C) Estructura tridimensional de la *PaBADH* mostrando las 20 hebras que forman una gran hoja β entre las cuatro subunidades del tetrámero. Con un círculo se marca la posición 125.

Dado que el objetivo de esta tesis es obtener dímeros de la *PaBADH* con una mínima alteración de su estructura monomérica, se decidió no seguir trabajando con esta mutante que produce sólo dímeros a concentraciones de proteína muy bajas y con una proporción de monómeros, y que además parece tener alteraciones importantes en la estructura terciaria a juzgar por su alta propensión a formar agregados insolubles.

VII.3. Mutantes en la posición Glu114

VII.3.1. Mutante Glu114Arg

Esta mutante no se expresó de forma soluble en *E. coli* bajo las condiciones de inducción que se manejan en el laboratorio para expresar a la *PaBADH* silvestre y a todas las mutantes que hasta ahora se han generado. Se decidió por tanto no seguir trabajando con esta mutante, ya que el hecho de que la enzima no se exprese de forma soluble indica que esta mutación seguramente afecta severamente o el plegamiento del monómero o la formación del tetrámero.

VII.3.2. Mutante Glu114Ala

Esta mutante sí se expresó de forma soluble; se obtuvo un rendimiento de 15.5 mg de proteína por litro de cultivo y fue posible purificarla utilizando el protocolo que se sigue para la enzima silvestre (ver Métodos). El gen fue secuenciado totalmente y se encontró que sólo está presente la mutación deseada.

La mutante Glu114Ala tiene actividad pero ésta es dependiente de la concentración de proteína y de la presencia o ausencia de glicerol en el amortiguador en el que se almacena la enzima. La enzima sin glicerol y a una concentración de 0.01 mg/ml prácticamente no tiene actividad, mientras que con glicerol al 10% (v/v) y a una concentración de 5 mg/ml su actividad específica es de 51 U/mg. Este valor es más bajo que el que se obtiene con la enzima silvestre con glicerol 10 % (v/v), 140 U/mg, y además en el caso de la enzima silvestre no se pierde la actividad aunque se diluya o se concentre. La actividad en todos los casos se midió con NAD^+ 1 mM y BAL 1 mM.

VII.3.2.1 Estado de agregación de la *PaBADH* Glu114Ala

Para conocer el efecto de la mutación sobre el estado de agregación de la enzima se realizaron cromatografías de exclusión molecular a tres concentraciones de enzima; 0.025, 0.25 y 2.5 mg/ml. La columna se equilibró y se eluyó a temperatura ambiente con el amortiguador A (ver Métodos). Se nombró como “inicial” a la enzima que a partir de una disolución concentrada en el

amortiguador de almacenamiento (5 mg/ml aproximadamente) se diluyó hasta la concentración deseada minutos antes de ser inyectada al cromatógrafo. Otra alícuota de la disolución de enzima se guardó por 24 h a 4 °C a las concentraciones de estudio (0.025, 0.25 y 2.5 mg/ml) hasta que fueron inyectadas; estas muestras se nombraron como “+24 h” (Fig. 20).

A diferencia de lo que ocurre con los controles utilizados tanto de la *PaBADH* como de la *SoBADH* silvestre, cuyos cromatogramas son simétricos, los obtenidos para la Glu114Ala a las tres concentraciones de proteína utilizadas tienen dos picos. Uno de ellos tiene el mismo tiempo de retención que el que presenta el tetrámero de la *PaBADH* silvestre mientras que el otro, al menos a 0.25 mg/ml, corresponde con el pico de la *SoBADH*. También se observa que los cromatogramas obtenidos con muestras recién preparadas no son iguales a los que se obtuvieron 24 horas después, lo que indica que las especies originalmente presentes se pueden convertir en otras.

En la condición “inicial” a 2.5 y a 0.25 mg/ml de proteína, los dos picos que se observan coinciden perfectamente con los del tetrámero y del dímero silvestres (Fig. 20A y B), sin embargo, cuando la concentración es 0.025 mg/ml se observa que el pico del dímero se desplaza hacia la derecha indicando que las especies diméricas dan lugar a la formación de monómeros (Fig. 20C). Resulta muy interesante observar que a medida que se disminuye la concentración de proteína el pico que corresponde al tetrámero no cambia en su proporción de la proteína total ni se desplaza hacia la derecha, incluso a 0.025 mg/ml, indicando que este tetrámero es bastante estable y no forma dímeros y/o monómeros cuando se diluye en el intervalo de concentración estudiado (lo que representa una dilución de 100 veces).

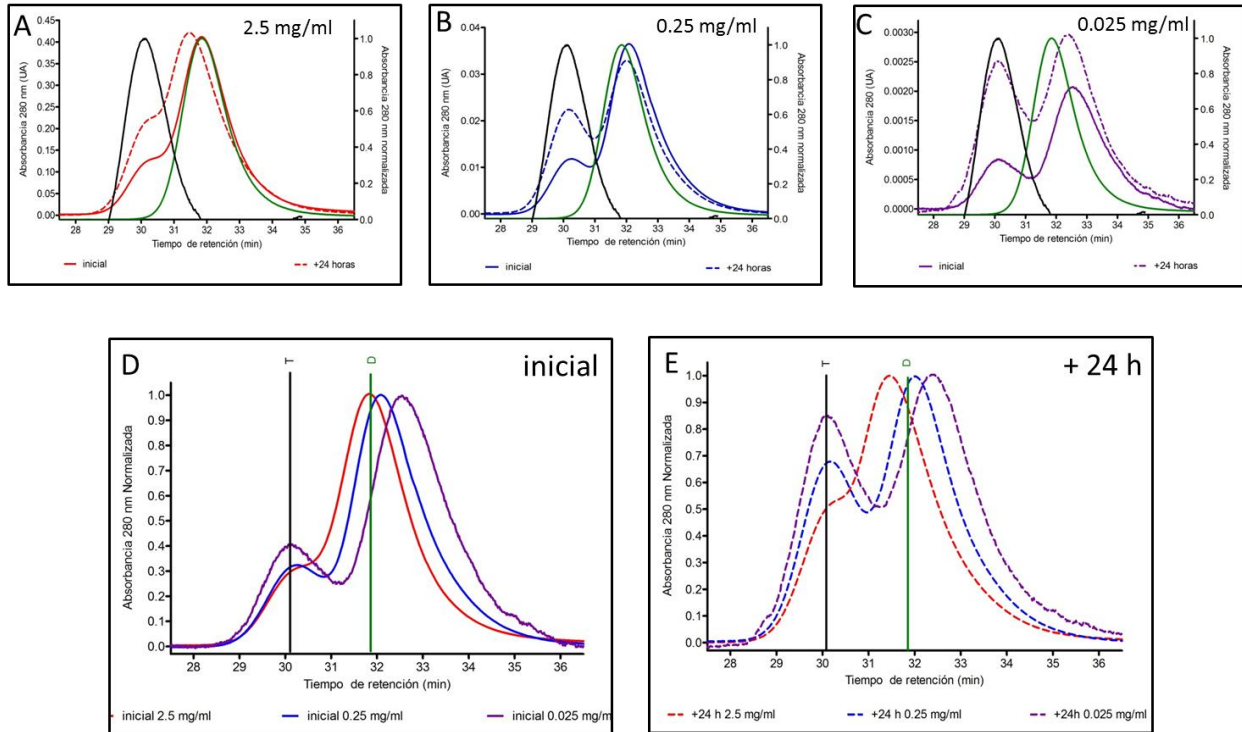


Figura 20. Perfiles de elución de la columna de exclusión molecular de la mutante Glu114Ala de la *PaBADH*. La columna se equilibró con el amortiguador A y la concentración de proteína fue de 2.5 mg/ml (A; líneas rojas), 0.25 mg/ml (B; líneas azules) o 0.025 mg/ml (C; líneas moradas). En los paneles D y E se muestran todos los cromatogramas normalizados, dándole el valor de 1 a la máxima absorbancia observada. Las líneas continuas representan el cromatograma obtenido de una disolución de proteína recién preparada y las líneas discontinuas representan estas disoluciones de proteína incubadas por 24 h tras su preparación a la concentración indicada. En (D) y (E) las líneas verticales negra y verde indican el pico del perfil de elución de la *PaBADH* y de la *SoBADH* silvestres.

En la condición “+24 h” los cromatogramas obtenidos muestran que la proporción de la proteína total que representa el pico que corresponde al tetrámero aumenta en todas las concentraciones, lo que sugiere que los dímeros y/o monómeros sí se pueden reasociar para formar tetrámeros, a no ser que existiera proteína agregada que no entrara a la columna en la primera cromatografía, pero que durante esta incubación de 24 h se disocie y pueda pasar a la columna.

La cromatografía de exclusión conlleva la dilución de la proteína, por lo que no es posible conocer con exactitud si las especies observadas existían antes de ser inyectadas o se formaron durante la cromatografía debido a la dilución de la enzima. Para poder aclarar este punto, y asumiendo que las tres posibles especies tienen diferencias en su actividad enzimática, medimos

esta actividad antes de la cromatografía y en las fracciones con proteína, para saber si la cantidad de unidades inyectadas correspondía con las unidades recuperadas. A las tres concentraciones de proteína utilizadas se pudo medir actividad enzimática bajo las mismas condiciones, aunque no se obtuvo la misma actividad específica (Tabla 7). La actividad específica a 0.25 mg/ml es aproximadamente la mitad de la encontrada a 2.5 mg/ml, y a 0.025 la mitad de la que se encontró a 0.25 mg/ml. Este hallazgo es difícil de explicar, dado que los perfiles cromatográficos sugieren que existe una igual proporción de tetrámeros con respecto a la proteína total en las tres concentraciones de proteína antes de someterlos a la cromatografía, y por tanto si el tetrámero es la única especie activa deberíamos haber obtenido igual actividad específica en las tres muestras. Aún más, tanto a 2.5 mg/ml como a 0.25 mg/ml se recuperaron prácticamente todas las unidades inyectadas, lo que sugiere que durante la cromatografía no hubo disociación de las especies tetraméricas o diméricas presentes al inicio. Sin embargo, el dímero se disocia parcialmente a monómero cuando la concentración de proteína disminuye a 0.25 y aún más a 0.025 mg/ml, como lo muestra el corrimiento del pico del dímero hacia tiempos mayores de retención (Fig. 20D). Por tanto, las menores actividades observadas a 0.25 y 0.025 mg/ml pueden deberse a una disminución del porcentaje de dímero, y si esto es así indicaría que el dímero de esta mutante es activo, e incluso más que el tetrámero, ya que de otro modo no se podría justificar la reducción de la actividad a la mitad. Por otra parte, no se observó reactivación de la enzima durante el tiempo en que se midió la reacción en ninguna de las fracciones con actividad, lo que sugiere que la proteína si está disociada en una especie no activa, ésta no se reasocia en el medio de reacción, o lo hace muy rápidamente.

Tabla 7. Actividad de la *PaBADH* Glu114Ala a distintas concentraciones de proteína y en las fracciones eluidas de la cromatografía de exclusión molecular.

Concentración de proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Fracciones con actividad	% de U recuperadas
2.5	50.8	30-36	84
0.25	26.4	30-34	100
0.025	12.5	30-33	15

Hay que tener en cuenta que el cromatograma es una medida de la absorbancia a 280 nm en función del tiempo de elución, pero que no se puede conocer con exactitud la correspondencia entre el tiempo de elución registrado por el detector UV y el número de fracción. Las fracciones

fueron de 500 μ l y se colectaron cada minuto. Pensamos que es probable que la fracción 30 corresponda al minuto 29 o 29.5 del tiempo de elución, es decir que las fracciones estén retrasadas 30 segundos o un minuto con respecto al tiempo del perfil de elución. Pero aún en este caso, la actividad observada en las fracciones 32 en adelante deben corresponder a la especie dimérica lo que de nuevo apoya que el dímero de esta mutante sí tiene actividad enzimática. No encontramos actividad en las fracciones donde se presume la presencia de monómeros, lo que era de esperarse ya que aunque el monómero tiene un sitio activo independiente, la conformación tridimensional del monómero nos hace pensar que de forma aislada éste no se pliega correctamente.

VII.3.2.2. Recromatografía

Para poder asignar de forma inequívoca y cuantitativa la actividad enzimática observada en las fracciones de las cromatografías anteriores a las especies tetraméricas y diméricas, era necesario separar de forma eficiente los picos de estas especies. Esto además nos permitiría la posterior caracterización estructural y funcional tanto de la especie dimérica como de la tetramérica. Pensamos que se podría aislar a las especies separadas recromatografiando las fracciones enriquecidas en alguna forma oligomérica. Por ello, a partir de una disolución de proteína a 2.5 mg/ml o a 0.25 mg/ml (Fig. 21 A y D), se tomó una fracción de los extremos donde se pensó debía haber sólo tetrámeros o dímeros prácticamente sin contaminación de la(s) otra(s) especie(s). Concretamente se tomaron las fracciones 30 y 33 sombreadas en la Figura 21 de naranja y de azul respectivamente. Se recromatografiaron 200 μ l de estas fracciones (cromatogramas nombrados “inicial”) y otros 200 μ l se mantuvieron a 4 °C durante 24 h (cromatogramas nombrados “+24 h”) antes de la segunda cromatografía. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 21. No se recromatografió la muestra de proteína a 0.025 mg/ml porque las fracciones con actividad que se obtuvieron en la primera cromatografía ya estaban muy diluidas.

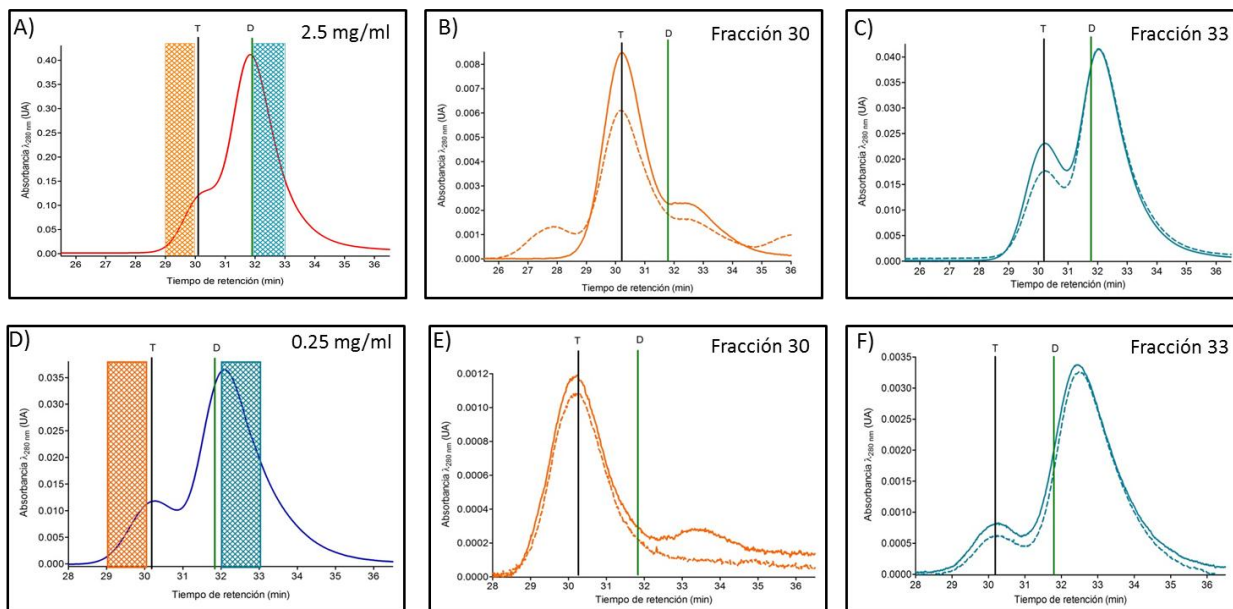


Figura 21. Recromatografías de la *PaBADH* Glu114Ala. Perfil de elución de la columna de exclusión molecular de la proteína inyectada a 2.5 mg/ml (A) y 0.25 mg/ml (D). Las fracciones que se tomaron para someter a otro paso de cromatografía aparecen sombreadas, en naranja la fracción 30 y en azul la fracción 33. B y C) Cromatogramas de la fracciones 30 y 33, respectivamente, de la muestra inicialmente a 2.5 mg/ml. E) y F) Cromatogramas de la fracciones 30 y 33, respectivamente, de la muestra inicialmente a 0.25 mg/ml. En líneas continuas se presenta el cromatograma obtenido luego de la separación de los picos (condición “inicial”) y en líneas punteadas, el cromatograma obtenido con la misma preparación de proteína pero inyectado 24 h después de la separación (“+24 h”). La columna fue equilibrada y eluida a temperatura ambiente usando el amortiguador A. Las líneas verticales negras y verdes indican el pico del perfil de elución de la *PaBADH* y de la *SoBADH* silvestres, respectivamente.

En los paneles A y D se observa que aparentemente la proporción de proteína total presente como tetrámero a 0.25 es muy parecida a la proporción que existe a 2.5 mg/ml. La fracción 30 debería corresponder al tetrámero mientras que la fracción 33 debería ser sólo el dímero, pero al hacer la recromatografía se observó que aunque sí se enriqueció la proporción tanto de tetrámeros como de dímeros en las fracciones 30 y 33, respectivamente, no se obtuvo una sola especie en ninguna de ellas. En la Figura 21 panel B se observa que la fracción 30 contiene mayoritariamente al tetrámero, aunque también se observó una mezcla de dímeros y monómeros, que probablemente ya estaban presentes en la muestra antes de recromatografiarse, al menos el dímero (nótese en el panel A que el pico del dímero en parte se superpone con el del tetrámero). Se recuperaron el 100% de las unidades de actividad enzimática inyectadas, lo que indica que durante esta segunda cromatografía la proteína tetramérica no cambia su estado de

agregación, a pesar de que la proteína se diluye unas siete veces durante el proceso. Este resultado concuerda con la observación previa de que el tetrámero es bastante estable frente a la dilución. En la recromatografía realizada al día siguiente se observó un pico de menor tiempo de retención (27.5 min) y una disminución de los picos que corresponden a dímero y tetrámero, lo que sugiere que ambas o alguna de las especies están formando agregados solubles sin actividad.

En la recromatografía de la fracción 33 (Fig. 21C) sólo se recuperó el 70% de las unidades aplicadas a la columna y aunque la especie mayoritaria es el dímero, existe también tetrámero en una proporción casi igual a la observada en la primera cromatografía. El pico del dímero se ha corrido a la derecha indicando que se han formado monómeros. En conjunto, estos resultados sugieren que la fracción 33 contiene tetrámeros, que son estables a la dilución que sufren en la segunda cromatografía, y dímeros que sí se disocian en este proceso. Por tanto, la actividad encontrada en esta fracción podría deberse a los tetrámeros y dímeros que contiene.

Partiendo de la disolución de proteína que inicialmente se aplicó a 0.25 mg/ml (Fig. 21D) se encontró que al recromatografiar la fracción 30 (Fig. 21E) se pudo aislar al tetrámero, lo que de nuevo indica la estabilidad de esta especie frente a la dilución, y algo de monómero, producido muy probablemente a partir de la contaminación de dímero que llevaba la muestra recromatografiada y que debió disociarse a monómeros al diluirse durante la cromatografía. Por otra parte, en la recromatografía de la fracción 33 se siguen observando tetrámeros aunque a baja concentración y la especie predominante es el monómero; no se observó algún cambio en la proporción de especies durante 24 h, una vez más indicando la estabilidad del tetrámero.

En resumen, los resultados de exclusión molecular junto con los de la determinación de la actividad enzimática de la mutante Glu114Ala apoyan la conclusión de que esta mutante puede formar tetrámeros activos, aun cuando una parte importante de la proteína no los forma y da lugar a dímeros que también parecen poseer actividad.

VII.3.2.3 Efecto del glicerol sobre el estado de agregación de la *PaBADH* Glu114Ala

Cuando se purificó por primera vez esta enzima se observó que si se eliminaba el glicerol del medio de almacenamiento la proteína perdía actividad y que al adicionar glicerol se recuperaba la actividad, aunque no el 100%, por lo que se pensó que el glicerol estabiliza una conformación activa de la enzima. Para probar esta hipótesis se purificó enzima a la que no se le agregó glicerol

después de la elución de la columna de afinidad, que es el último paso de purificación y el único que se hace en ausencia de glicerol en el protocolo de purificación establecido para la enzima silvestre. Con esta preparación de proteína se repitió el experimento descrito anteriormente, es decir se cromatografiaron muestras a 2.5, 0.25 y 0.025 mg/ml usando una columna de exclusión molecular equilibrada con un amortiguador sin glicerol (amortiguador B, ver Métodos). En esta misma condición también se cromatografiaron las enzimas *PaBADH* y *SoBADH* silvestres a 0.25 mg/ml, para usarlos como controles, ya que los tiempos de retención de las proteínas en esta cromatografía no son iguales en presencia y ausencia de glicerol. En las tres concentraciones de proteína cromatografiadas en esta condición se observó un solo pico bastante simétrico, que mayoritariamente corresponde a tetrámero a 2.5 mg/ml, una mezcla de casi igual proporción de tetrámeros y dímeros a 0.25 y exclusivamente dímero a 0.025 mg/ml (Fig. 22).

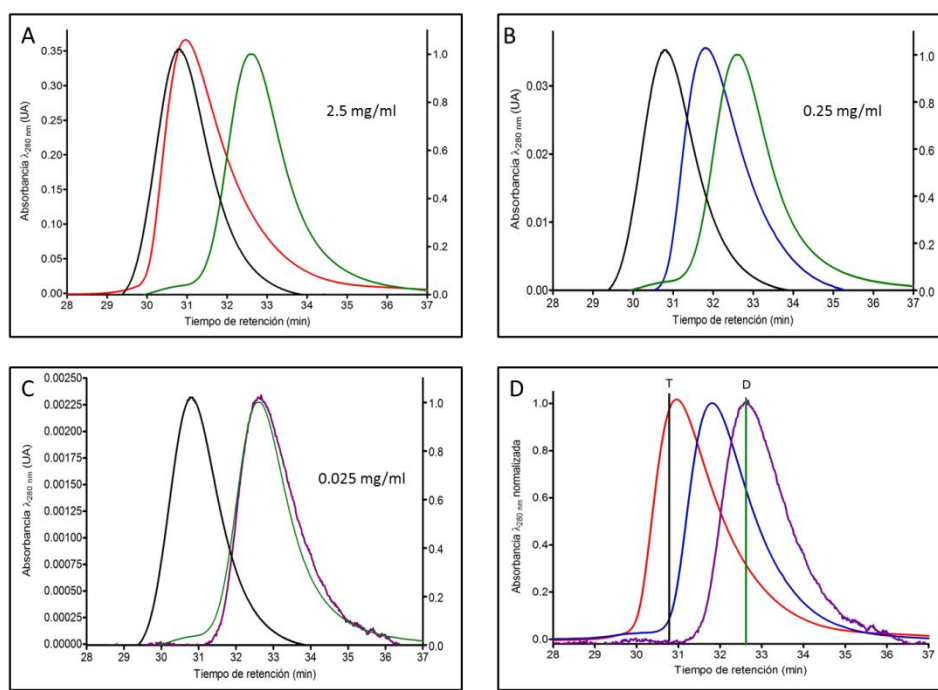


Figura 22. Perfiles de elución de la columna de exclusión molecular equilibrada con el amortiguador B (sin glicerol) de la *PaBADH* Glu114Ala. A) 2.5 mg/ml, (línea roja). B) 0.25 mg/ml, (línea azul) C) 0.025 mg/ml, (línea morada). En negro y en verde se muestran los perfiles de elución de la *PaBADH* y la *SoBADH* silvestres respectivamente, inyectados a 0.25 mg/ml. D) Perfiles de elución normalizados a las tres concentraciones de la Glu114Ala las líneas verticales negra y verde indican el pico del perfil de elución de la *PaBADH* y de la *SoBADH* silvestres.

Se pensaba que el glicerol estabilizaba a la estructura tetramérica y que la enzima se disociaría en ausencia del cosoluto llevando a su inactivación. Los resultados mostrados en la Figura 22 indican que a la concentración más alta de 2.5 mg/ml la enzima es mayoritariamente tetramérica en ausencia de glicerol, lo que sugiere que en estas condiciones se estabiliza una especie tetramérica que difiere de la que existe en presencia de glicerol en que es menos activa y en que es sensible a la dilución. En ausencia de glicerol (Amortiguador B), la proporción de tetrámero disminuye bastante a 0.25 mg/ml y desaparece a 0.025 mg/ml, y la proteína a 2.5 mg/ml tiene una actividad de sólo 1.2 U/mg que es un 2.3% de la actividad que tenía en presencia de glicerol. La especie dimérica que existe en ausencia de glicerol es por el contrario bastante estable, de forma que es la forma única presente a la más baja concentración de proteína estudiada, 0.025 mg/ml, mientras que en presencia de glicerol a esa concentración de proteína ya existen monómeros (comparar Fig. 20 con Fig. 22). En el Amortiguador B, y después de la cromatografía se recuperan el 90% de las unidades inyectadas a la columna, lo que es consistente con que esta actividad corresponde al tetrámero, que es el pico mayoritario bajo esta condición. A 0.25 mg/ml la actividad específica es de 0.18 U/mg y se recuperaron todas las unidades que se inyectaron. Dado que a esta concentración de proteína hay una mezcla de dímeros y tetrámeros, pudiera ser que la actividad medida se debe a la fracción de tetrámero presente. A la concentración de enzima más baja utilizada en este experimento 0.025 U/mg no se encontró actividad y tampoco la hubo en ninguna de las fracciones de la cromatografía, consistente con la idea expuesta de que el dímero, que es la única especie encontrada a esta concentración de proteína, carece de actividad en ausencia de glicerol.

En conjunto, estos resultados sugieren que el glicerol ayuda a que tanto el tetrámero como el dímero de la mutante Glu114Ala adquieran una conformación activa. Además, el glicerol promueve una especie tetramérica estable frente a la dilución, mientras que una especie dimérica inactiva se estabiliza en ausencia de glicerol.

VII.3.2.4. Cromatografía de intercambio iónico

Con el hallazgo de que el cambio del Glu114 por una Ala promueve la disociación del tetrámero de la *PaBADH* en dímeros y monómeros, se utilizó la cromatografía de intercambio iónico para intentar separar las tres especies, basándonos en que cada una de ellas debería tener carga superficial distinta.

Para esta cromatografía se utilizó una disolución concentrada de proteína (12 mg/ml). La columna de intercambio iónico se eluyó con un gradiente de KCl de 50 a 350 mM y se separaron tres picos de proteína (Fig. 23A y B). Una electroforesis SDS-PAGE (Fig. 23C) confirmó que todos los picos eran *PaBADH*, lo que es consistente con que se encontró actividad BADH desde la fracción 65 a la fracción 78 (Tabla 8). Para conocer el estado de agregación de cada uno de los picos se sometieron a una cromatografía de exclusión molecular. En las fracciones 65-66 (0.36 mg/ml) (Fig. 23D) se obtuvo una mezcla de tetrámero, dímero y monómero, siendo mayoritarios en proporciones casi iguales el tetrámero y el dímero, recuperándose el 90% de las unidades que se inyectaron a la columna. En las fracciones 71-72 (1.76 mg/ml) la especie predominante fue un tetrámero, recuperándose el 65% de las unidades que se inyectaron, y en las fracciones 74-76 (0.3 mg/ml) prácticamente todo es tetrámero y se recuperó el 87% de las unidades inyectadas (Figs. 23E y F).

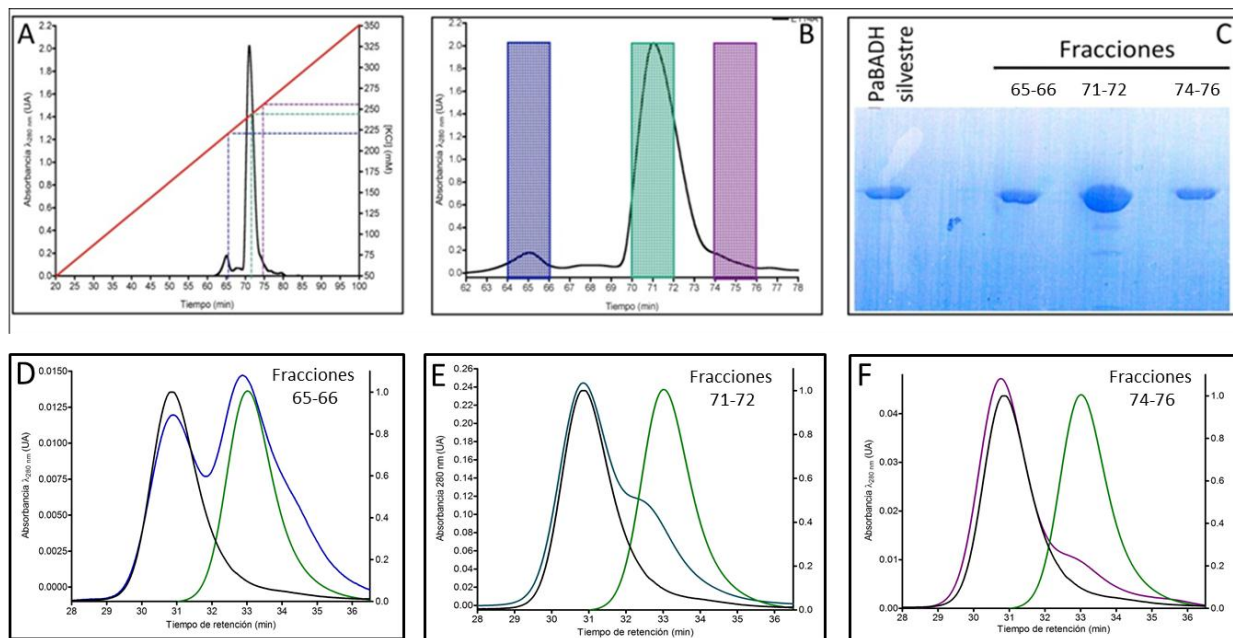


Figura 23. Separación de las especies de la mutante Glu114Ala de la *PaBADH*. A) Perfil de elución de la columna de intercambio iónico MonoQ. B) Ampliación de la región del perfil donde aparecen las fracciones de proteína. C) Gel de SDS-PAGE de las fracciones eluidas de la columna MonoQ que contienen proteína. D) Perfil de elución de la columna de exclusión molecular de las fracciones 65-66 (línea azul) obtenidas de MonoQ. E) de las fracciones 71-72 (línea cyan). F) de las fracciones 74-76 (línea morada). En negro y en verde se muestran los perfiles de elución de la *PaBADH* y la *SoBADH* silvestres respectivamente inyectados a 0.25 mg/ml. La columna de exclusión molecular fue equilibrada y eluida con Amortiguador A.

Los resultados indican que la mutante Glu114Ala es tetramérica a la alta concentración usada para la cromatografía de intercambio iónico, pero que existen tres especies tetraméricas con propiedades electrostáticas superficiales diferentes. Es decir, pudimos aislar tres diferentes estados conformacionales del tetrámero de esta mutante (aunque dos de ellos en una proporción del total de proteína muy baja) que poseen diferente sensibilidad a la dilución y probablemente diferente actividad específica (Tabla 8). La actividad específica de la especie resistente a la disociación es la más alta de todas, seguida de la de las dos especies con estabilidad intermedia. Hay que notar que la concentración de proteína aplicada a la columna fue mucho mayor en el caso de la muestra que consiste de las fracciones 71-72 que en el de las otras dos muestras, por lo que no podemos comparar el efecto de la dilución que ocurre durante la cromatografía en esta muestra con las otras dos.

Tabla 8. Actividad de las fracciones eluidas de la columna MonoQ y concentración de KCl a la que eluyen.

Fracciones	Actividad específica (U/mg)	KCl (mM)
65-66	13.05	220
71-72	31.25	245
74-76	60.30	255

Se decidió trabajar sólo con el pico mayoritario que comprende las fracciones 71-72. Con estas fracciones se volvió a hacer la cromatografía de exclusión molecular ampliando nuestro intervalo de concentración a 12.5, 2.5, 0.25 y 0.025 mg/ml. En estos experimentos la columna se equilibró y eluyó con el amortiguador C que contenía 250 mM de KCl (ver Métodos); se utilizó esta concentración de KCl porque es la concentración a la que eluyó la proteína.

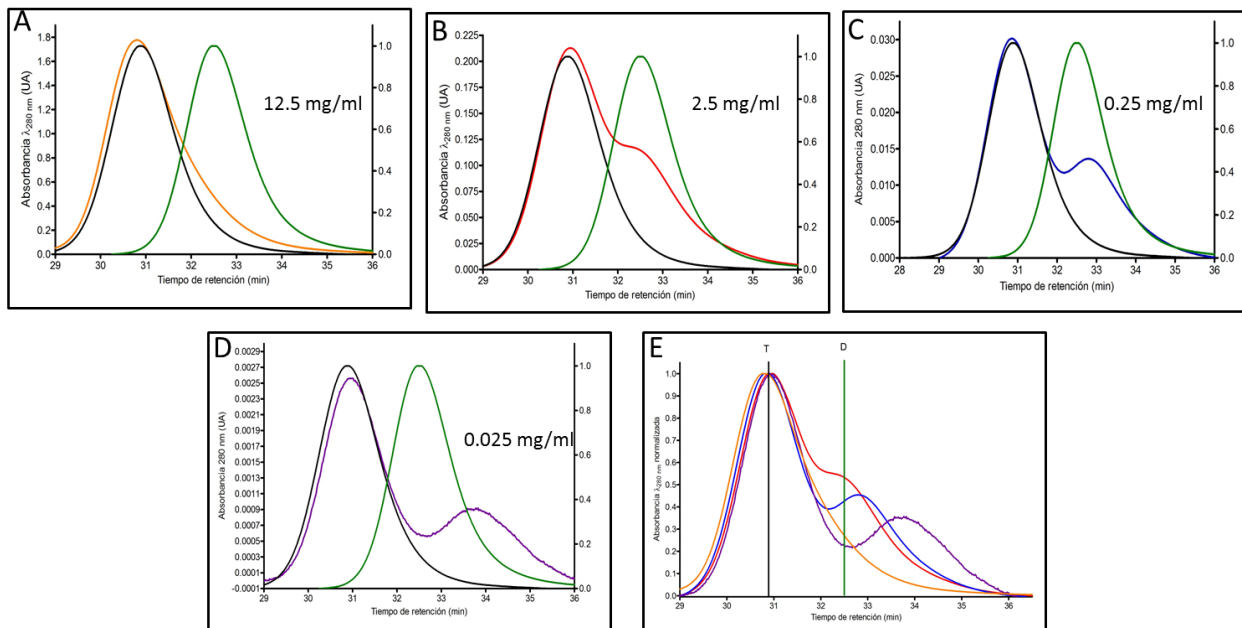


Figura 24. Cromatografía de exclusión molecular de la *PaBADH* Glu114Ala tetramérica eluida de la columna de MonoQ. Las fracciones 71 y 72 se concentraron o diluyeron hasta las concentraciones de proteína indicadas. Perfiles de elución de la columna de exclusión molecular a 12.5 (A; línea naranja), 2.5 (B, línea roja), 0.25 (C; línea azul) y 0.025 (D; línea morada) mg/ml. E) Comparación de todos los perfiles de elución obtenidos; los valores de absorbancia a 280 nm se normalizaron para facilitar la comparación. En negro y en verde se muestra el cromatograma de los controles *PaBADH* y *SoBADH* silvestres, respectivamente, a 0.25 mg/ml. La columna de exclusión molecular fue equilibrada y eluida con el amortiguador C.

Inicialmente la proteína reunida de las fracciones 71-72 era prácticamente tetramérica aunque tenía cierta proporción de dímeros (Ver Fig. 23E). Al concentrarla hasta 12.5 mg/ml y cromatografiarla se observó que la proteína es prácticamente tetramérica pero al no ser totalmente simétrico el pico podemos asumir que aún a esta alta concentración de enzima una pequeña parte de la población se encuentra como dímeros en solución. A 2.5 mg/ml una parte de los tetrámeros se han disociado en dímeros, y éstos al bajar la concentración de enzima hasta 0.025 mg/ml se disocian en monómeros de forma que a esta concentración de proteína tenemos una mezcla de dímeros y monómeros. Los resultados de estas cromatografías sugieren que en la fracciones 71-72 de la cromatografía de intercambio iónico existen, o se forman tras concentrar a 12.5 mg/ml, dos tipos de tetrámeros, unos estables frente a la dilución y otros que se disocian en dímeros al bajar la concentración a 2.5 mg/ml. De nuevo, observamos que los tetrámeros de la Glu114Ala estables se mantienen en dicho estado oligomérico al menos hasta una concentración de proteína de 0.025 mg/ml.

VII.3.2.5. Caracterización de la estructura secundaria y terciaria de la *PaBADH* Glu114Ala

Los resultados previos mostraron que la mutante Glu114Ala de la *PaBADH* existe en disolución como tetrámeros, dímeros, monómeros y/o agregados de mayor tamaño, en una proporción que depende de la concentración de proteína y de la presencia o ausencia de glicerol. Dependiendo de las condiciones experimentales se puede favorecer la presencia de cierta especie, pero no fue posible aislar alguna. Sin embargo, nuestros estudios también muestran que utilizando el amortiguador A y proteína a 0.25 mg/ml la mayor parte de ella parece ser un dímero (Fig. 20B). Con esta información se procedió a hacer la caracterización de estructura terciaria y secundaria de esta mutante esperando que los datos obtenidos correspondan al dímero, aunque no podemos afirmar que sólo se tenga un dímero en solución.

Para conocer el efecto del cambio del Glu114 por Ala sobre la estructura terciaria se obtuvo el espectro de fluorescencia intrínseca de esta mutante excitando a 280 nm y se comparó con el espectro de la *PaBADH* silvestre. En la Fig. 25A se observa que no existen diferencias significativas entre la intensidad de emisión de fluorescencia de la silvestre y de la mutante. Se observó un ligero corrimiento de la longitud de onda máxima de emisión, que para la silvestre es de 327 nm, mientras que para la mutante es de 330 nm. Este pequeño cambio sugiere que la

mutación, o la disociación parcial de la mutante a esta concentración de proteína, expone hacia el solvente a algún(os) residuo(s) aromático(s).

Con el fin de investigar si la mutación había producido un cambio en la estructura secundaria en esta mutante se obtuvo su espectro de DC en el UV lejano (Fig. 25B). Los resultados muestran que a este nivel de estructura la mutación tampoco causa cambios mayores. Los cambios que deben existir y que provocan los cambios de actividad observados deben ser tan sutiles que no se pueden apreciar por DC o por fluorescencia.

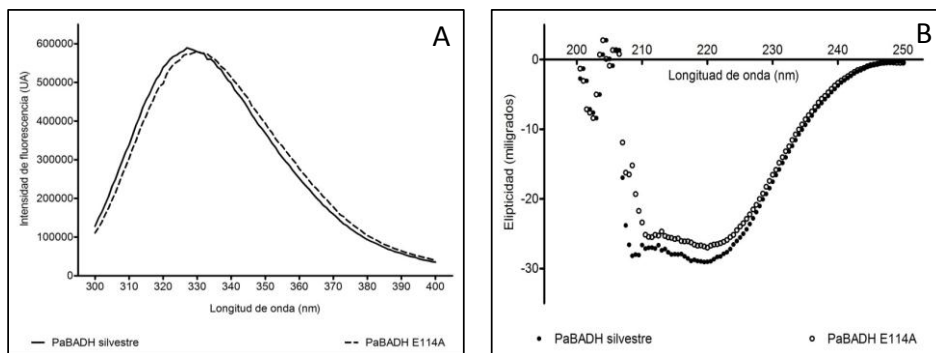


Figura 25. Caracterización conformacional del dímero de la mutante Glu114Ala de la *PaBADH*. A) Espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de la *PaBADH* silvestre (línea continua) y de la mutante (línea discontinua) excitando con una λ de 280 nm. B) Espectro de DC en el UV lejano de la *PaBADH* silvestre (símbolos cerrados) y de la mutante (símbolos abiertos). Los espectros se obtuvieron a 20 °C en amortiguador D y a 0.25 mg/ml.

VII.3.2.6. Modelo tridimensional de la *PaBADH* Glu114Ala

El modelo resultante de hacer la mutación *in silico* Glu114Ala seguido de minimización de energía no mostró ningún cambio importante en la estructura de la enzima, ni en el sitio de unión al nucleótido ni el sitio de unión al aldehído como tampoco en la región de la mutación. Esto podría deberse a que el modelo se hace considerando sólo una subunidad. Pero cuando a partir de esta subunidad modelada se construyó el tetrámero, se observó que aunque lógicamente se pierden las interacciones con las cadenas laterales de la Arg70 y de la Arg73, estas cadenas laterales quedaron prácticamente en la misma conformación que en la enzima silvestre (Fig. 26). Sin embargo, dado que en el modelo se observa que estas cadenas laterales no establecen interacciones con otros residuos y quedan expuestas al solvente, deben ser muy móviles y alejarse una de la otra por repulsión electrostática. Este modelo, apoya la idea, aunque de ninguna manera

la prueba, de que al hacer la mutación no surge ningún impedimento para que se formen tetrameros “casi nativos”, aunque serían menos estables por la pérdida de las interacciones del Glu114.

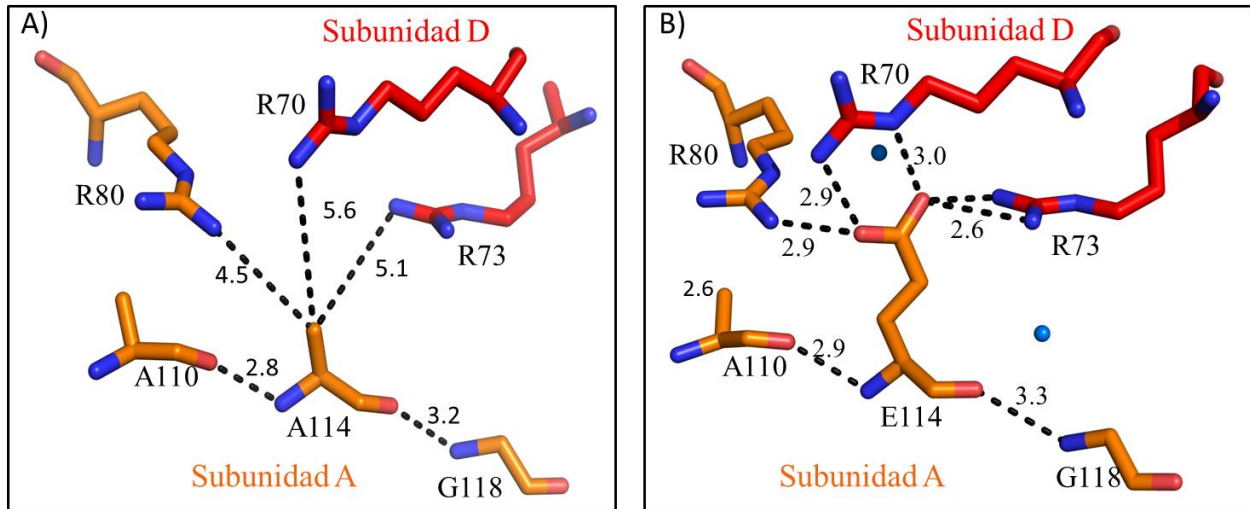


Figura 26. A) Interacciones y distancias con los residuos cercanos de la Ala114 del modelo *in silico* de la estructura de la mutante Glu114Ala. En este modelo, las cadenas laterales de la Arg70 y la Arg73 no establecen interacciones con otros residuos y quedan expuestas al solvente. B) Interacciones del Glu114 de la PaBADH silvestre.

VII.3.2.7. Unión al equilibrio del NADP⁺ a la PaBADH Glu114Ala

En ausencia de glicerol la mutante Glu114Ala se disocia en dímeros bastante estables. Para explorar si los dímeros son capaces de unir al nucleótido, se determinó la constante de disociación de la unión del NADP⁺ a la mutante, usando para ello los cambios en la fluorescencia intrínseca de la proteína que producen los nucleótidos al unirse a la enzima (Velasco-García *et al.*, 2000). Los estudios de unión se llevaron a cabo a 0.25 y 0.025 mg/ml amortiguador B, es decir, el amortiguador de fosfatos que no contiene glicerol, para aumentar la probabilidad de que se tengan sólo dímeros en solución (Fig. 27).

Encontramos que a ambas concentraciones la enzima si une al NADP⁺. Las curvas de unión obtenidas fueron hiperbólicas y los datos se ajustaron a la ecuación 1 (ver Métodos). En la Tabla 9 se muestran los resultados de estos ajustes. A 0.25 mg/ml la $K_d(\text{NADP}^+)$ de la mutante es casi 1.5 veces mayor que la de la enzima silvestre, mientras que a 0.025 mg/ml es más del doble. Dado que a esta última concentración sólo tenemos dímeros, este resultado indica que el dímero

de la mutante sí une al NADP^+ , aunque con mucha menos afinidad que el tetrámero silvestre. Concluimos que muy probablemente la formación del tetrámero ayuda a que se forme correctamente el sitio de unión al nucleótido, y que aún para la enzima silvestre la ausencia de glicerol provoca una disminución muy importante en su afinidad por el nucleótido, si se tiene en cuenta que en presencia del glicerol la K_d es de $80 \mu\text{M}$.

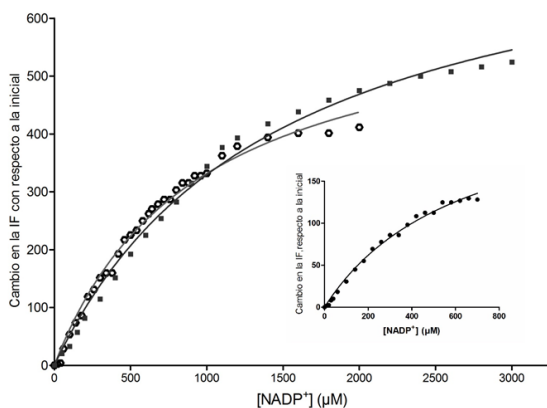


Tabla 9. Parámetros de unión al equilibrio del NADP^+ a la *PaBADH* silvestre y a la mutante E114A a 0.25 y 0.025 mg/ml en el amortiguador B.

	<i>PaBADH</i> silvestre (0.25 mg/ml)	<i>PaBADH</i> E114A (0.25 mg/ml)	<i>PaBADH</i> E114A (0.025 mg/ml)
K_d (μM)	638 ± 69	938 ± 60	1457 ± 113

Figura 27. Unión al equilibrio del NADP^+ a la *PaBADH* silvestre a 0.25 mg/ml (inserto) y a la Glu114Ala a 0.25 y 0.025 mg/ml en el amortiguador B. Los puntos son los valores experimentales y las líneas son el resultado del mejor ajuste de estos datos a la Ecuación 1 por regresión no lineal.

VII.3.2.8. Análisis de la estabilidad de la *PaBADH* Glu114Ala frente a la desnaturalización térmica

La estabilidad térmica de las enzimas silvestre y mutante Glu114Ala se siguió por medio de CD en el UV lejano midiendo el cambio de elipticidad a 222 nm al incrementar la temperatura, lo que nos muestra los cambios que las proteínas sufren en su estructura secundaria (Fig. 28). Las proteínas se pusieron a una concentración de 0.25 mg/ml utilizando el amortiguador D. El proceso de desnaturalización térmica de ambas proteínas presentó una sola transición que se pudo ajustar a una ecuación de Boltzman (Ecuación 2 en Métodos); la Tabla 10 muestra los resultados de este ajuste. Como puede apreciarse, la enzima mutante es menos estable a la desnaturalización térmica, siendo su T_m $4 \text{ }^\circ\text{C}$ menor que la silvestre; sin embargo, la cooperatividad del proceso es prácticamente la misma en ambas proteínas. Este resultado podría deberse a que a la concentración de proteína usada y en el Amortiguador D, se tiene una mezcla de dímeros y tetrámeros de la Glu114Ala. Si la desnaturalización ocurre después de la disociación a

monómeros, como es probable, sería lógico que ocurriera a temperaturas más bajas en el caso de la mutante, pero que no se alterara el proceso una vez que se obtienen los monómeros. Esta explicación es consistente con lo observado.

Después del calentamiento, ambas proteínas forman agregados visibles e insolubles que precipitan, por lo que no es posible saber si la aparente desnaturalización total se debe a que se perdió totalmente la estructura secundaria, o es resultado de la precipitación de la proteína. Debido a esta agregación, la desnaturalización térmica es irreversible y por tanto los parámetros obtenidos en el ajuste son aparentes.

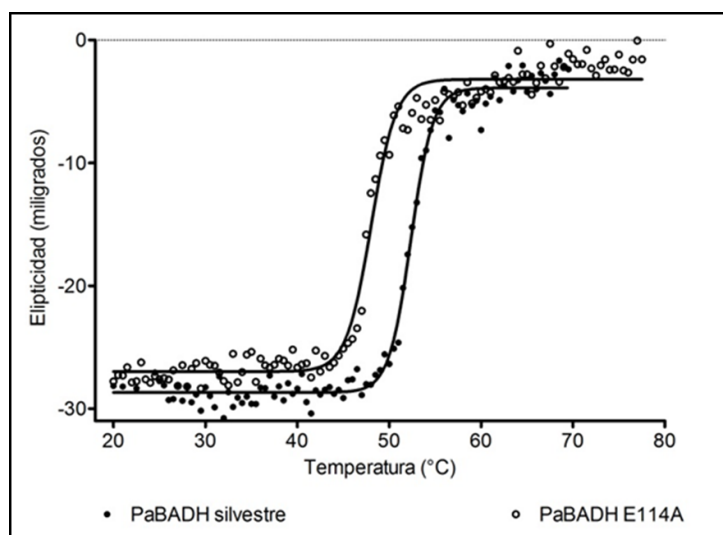


Tabla 10. Parámetros de la desnaturalización térmica de *PaBADH* Glu114Ala

	T_m ap (°C)	m ap
<i>PaBADH</i> silvestre	52.3 ± 0.1	1.2 ± 0.08
<i>PaBADH</i> Glu114Ala	48.0 ± 0.1	1.3 ± 0.11

Figura 28. Desnaturalización térmica de la *PaBADH* silvestre y de la Glu114Ala en el amortiguador D siguiendo el cambio en elipticidad a 222 nm. La concentración de proteína fue 0.25 mg/ml. Los datos se ajustaron a la ecuación de Boltzman (Ecuación 2 en Métodos).

VII.4. Mutante *PaBADH* Gly118Asp

Esta mutante se expresó de forma soluble y activa con un rendimiento de 17 mg de proteína por litro de cultivo. Una observación importante fue que la enzima perdía actividad a medida que se iba purificando y durante el almacenamiento, por lo que la actividad específica de la preparación pura fue variable (la máxima observada en una purificación fue de 50 U/mg proteína) y después de un tiempo era prácticamente cero. Esta proteína tampoco se pudo purificar usando la columna de afinidad, por lo que se usó una columna de intercambio iónico MonoQ (ver Métodos). El gen fue secuenciado totalmente y se encontró que sólo contenía la mutación deseada.

VII.4.1. Estado de agregación de la *PaBADH Gly118Asp*

Del mismo modo que en el caso de las otras mutantes, se evaluó el estado de agregación de la Gly118Asp por medio de cromatografía de exclusión molecular, usando el amortiguador A y las mismas concentraciones de enzima (2.5, 0.25 y 0.025 mg/ml) que se usaron con las otras mutantes (Fig. 29). En este experimento la actividad específica de la proteína usada era de 19 U/mg proteína. Los cromatogramas muestran un solo pico simétrico, cuyo perfil de elución se sobrepone con el del control de la enzima dimérica. No es hasta una concentración de 0.025 mg/ml que se observó una mezcla de dímeros y monómeros; el pico de proteína se desplazó a mayores tiempo de retención y su forma ya no es simétrica. Se decidió incrementar la concentración de proteína hasta 11.5 mg/ml y aún a esta alta concentración se observó un solo pico que corresponde a dímeros. Esta mutante parece por tanto ser un dímero en un amplio intervalo de concentración, al menos de 11.5 a 0.25 mg/ml.

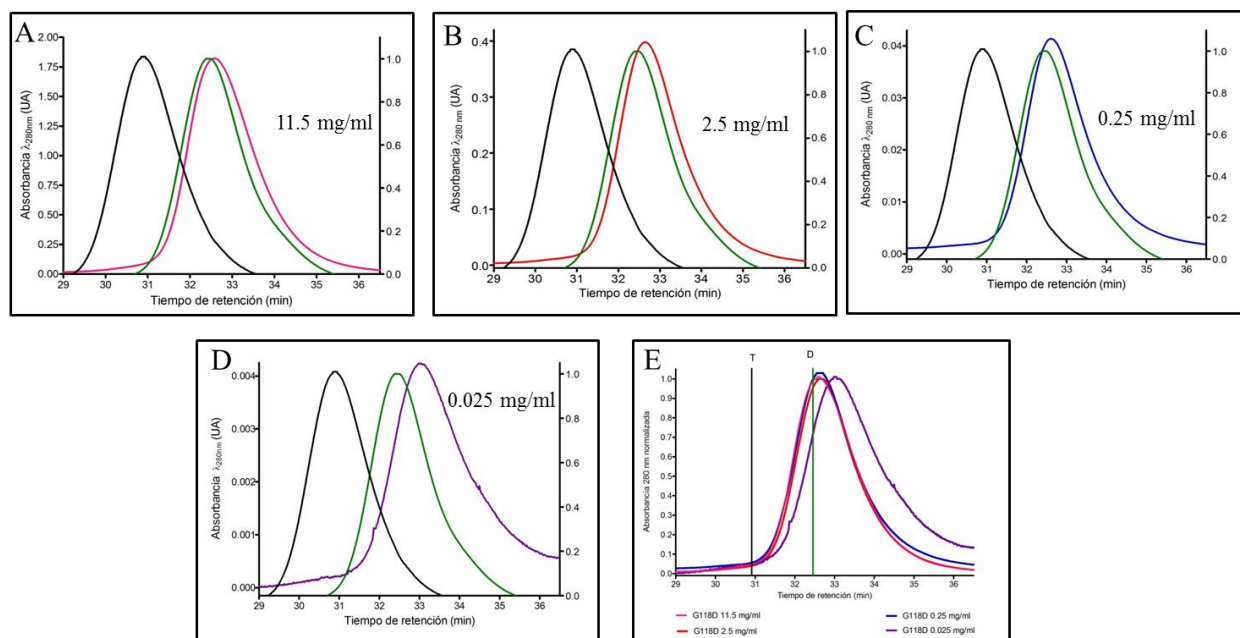


Figura 29. Perfiles de elución de la columna de exclusión molecular equilibrada con el amortiguador A de la *PaBADH Gly118Asp*. A) 11.5 mg/ml (línea rosa), B) 2.5 mg/ml (línea roja), C) 0.25 mg/ml (línea azul), D) 0.025 mg/ml (línea morada). La *PaBADH* (negro) y la *SoBADH* (verde) silvestres se inyectaron a 0.25 mg/ml. y E) Todos los cromatogramas normalizados. Las líneas verticales negras y verdes indican el pico del perfil de elución de la *PaBADH* y de la *SoBADH* silvestres, respectivamente.

VII.4.2. Unión al equilibrio del NAD(P)⁺ a la PaBADH Gly118Asp

La unión al equilibrio de los nucleótidos NAD(P)⁺ a la Gly118Asp se midió por medio del apagamiento de la fluorescencia debida a la adición de nucleótido a la solución enzimática. El experimento se hizo a 0.25 mg/ml de enzima. Para este experimento se utilizó el amortiguador A y la temperatura que se usó fue de 30 °C. Cada curva de titulación se hizo por duplicado. Los valores de K_d obtenidos se muestran en la Tabla 11. La enzima mutante al igual que la silvestre, tiene menor afinidad, es decir mayor K_d , por el NAD⁺ que por el NADP⁺. Sin embargo, el valor de K_d para ambos nucleótidos es casi 10 veces mayor que el de la enzima silvestre. Esto indica que la mutación afecta el sitio de unión del nucleótido, pero que éste aún está formado, y que el dímero resultante de esta mutación es capaz de unir al nucleótido (Fig. 30).

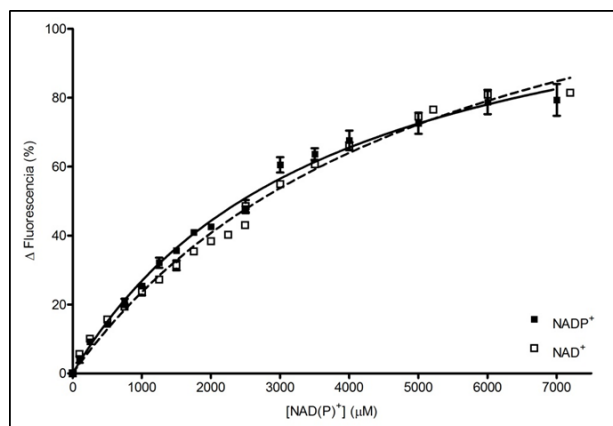


Tabla 11. Parámetros de unión al equilibrio del NAD(P)⁺ a la PaBADH silvestre y a la mutante G118D a 0.25 mg/ml en el amortiguador A.

	NADP ⁺ K_d (μM)	NAD ⁺ K_d (μM)
PaBADH silvestre	185 ± 18	220 ± 12
G118D 0.025 mg/ml	2198 ± 229	3055 ± 215

Figura 30. Unión del NAD(P)⁺ a la Gly118Asp seguida por el apagamiento de la fluorescencia intrínseca como función de la concentración del NADP⁺ (■) o del NAD⁺ (□). La concentración de enzima fue de 0.25 mg/ml. Se usó el Amortiguador A y una temperatura de 30 °C. Los puntos son la media de los datos obtenidos en dos experimentos y las líneas son el resultado del mejor ajuste de estos datos a la Ecuación 1 por regresión no lineal. Las barras indican el error estándar.

Al término del experimento se midió la actividad de la enzima y se observó que ésta no se incrementó. También se inyectó proteína a la columna de filtración en gel y no se observó ningún cambio en el estado de oligomerización por haber estado en presencia del nucleótido, es decir la enzima seguía siendo dimérica (resultados no mostrados).

VII.4.3. Estructura secundaria y terciaria de la *PaBADH* Gly118Asp

Investigamos la estructura secundaria y terciaria de esta mutante por medio de DC y de fluorescencia intrínseca respectivamente para saber si la mutación y la consecuente dimerización las había afectado. Los resultados obtenidos (Fig. 31) muestran que aunque la mutación Gly118Asp es capaz de disociar a la enzima en dímeros, no afecta de manera gruesa la estructura del monómero, aunque si lo hace de manera fina de tal forma que la enzima pierde la actividad y la afinidad por el nucleótido. El máximo del espectro de fluorescencia tiene casi la misma intensidad y longitud de onda que el de la enzima silvestre, y el espectro de DC en el UV lejano es también prácticamente igual.

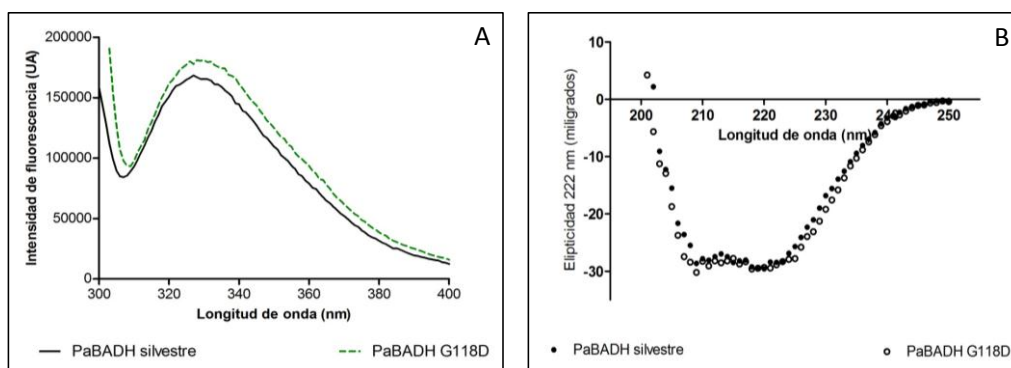


Figura 31. Espectros de A) emisión de fluorescencia intrínseca y B) de DC en el UV lejano de la *PaBADH* silvestre y de la Gly118Asp. Para ambos experimentos se utilizó la proteína a 0.25 mg/ml en el amortiguador D y la medición se hizo a 20 °C.

VII.4.4. Análisis de la estabilidad de la *PaBADH* Gly118Asp frente a la desnaturalización térmica

El proceso de desnaturalización térmica tanto de la enzima silvestre como de la mutante presenta una sola transición (Fig. 32); los resultados se ajustaron a una ecuación de Boltzman (ecuación 2 en Métodos) por regresión no lineal y en la Tabla 12 se incluyen los resultados de este ajuste. Ambas proteínas tienen la misma T_m aparente, sólo la cooperatividad del proceso es ligeramente menor en la mutante. Al igual que la proteína silvestre, esta mutante forma agregados insolubles que precipitan durante el proceso de desnaturalización.

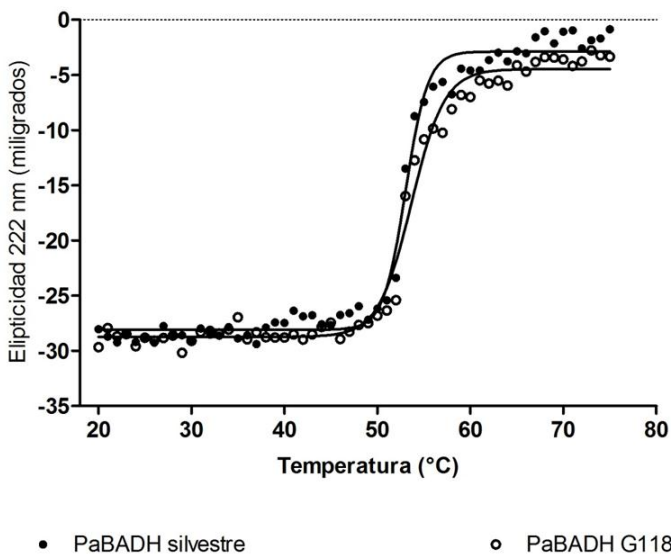


Tabla 12. Parámetros obtenidos del ajuste de los datos de desnaturalización térmica de la *PaBADH* silvestre y G118D a la ecuación 2 (en Métodos).

	$T_m \text{ app } (^{\circ}\text{C})$	$m \text{ app}$
<i>PaBADH</i> silvestre	53.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1
<i>PaBADH</i> Gly118Asp	53.7 ± 0.2	1.7 ± 0.2

Figura 32. Desnaturalización térmica de la *PaBADH* silvestre y de la mutante Gly118Asp en el amortiguador D y a una concentración de proteína de 0.25 mg/ml. La transición se siguió por el cambio en elipticidad a 222 nm. La línea es el resultado del ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales a la Ecuación 2.

VII.4.5. Modelo tridimensional de la *PaBADH* Gly118Asp

En el modelo se observaron algunas rotaciones en las cadenas laterales de algunos residuos, distribuidas a lo largo de toda la estructura, pero pensamos que el modelo que obtuvimos no es confiable porque es de una enzima tetramérica poco probable ya que los grupos carboxilo de los dos Asp118 de las subunidades vecinas quedaron enfrentados a 2.4 Å de distancia (Fig. 33). Debido a que estos residuos en el modelo quedaron a una distancia de 2.5 Å de la Arg73 de la subunidad enfrentada, ambos deberían estar desprotonados, por el efecto de la carga positiva de la Arg, y por tanto debería existir una fuerte repulsión electrostática entre ellos y tal vez por esta razón se obtengan dímeros de esta mutante en solución. En el dímero las cadenas laterales de las argininas y de los aspárticos estarían expuestas al solvente y no representarían ningún problema ni para su estructura ni para su estabilidad.

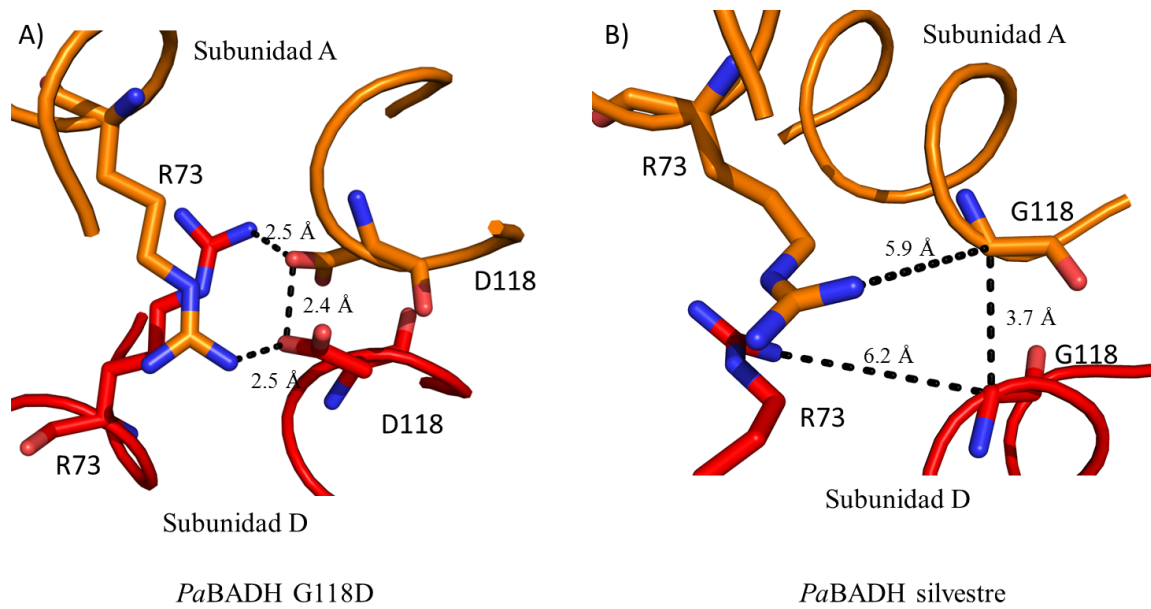


Figura 33. A) Modelo de la *PaBADH* Gly118Asp. En el modelo, las cadenas laterales del Asp118 quedaron enfrentadas a 2.4 Å. B) Estructura de la *PaBADH* silvestre, se observa que los carbonos α están a 3.7 Å de distancia.

VIII. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo era conseguir dímeros de la *PaBADH* cuya caracterización pudiera darnos información valiosa sobre el papel de la estructura tetramérica para la función catalítica y/o estabilidad de esta enzima. Para ello identificamos tres residuos de aminoácidos que por su posición en la intercaras dímero-dímero y por su naturaleza parecían ser críticos en el mantenimiento del tetrámero y por tanto podrían dar lugar a dímeros si se mutaban. A continuación discutimos los resultados obtenidos con estas mutantes.

VIII.1. Gly125

La mutación del primero de estos residuos, la Gly125, no permitió obtener dímeros estables ya que las enzimas mutantes obtenidas (Gly125Lys en el trabajo previo de mi tesis de licenciatura y Gly125Pro en este trabajo) tenían alterada la estructura terciaria de las subunidades. La Gly125 está en una región en la que se reúnen tres de las cuatro subunidades del tetrámero nativo (Fig. 11), que parece ser muy crítica para mantener no sólo el estado de oligomerización sino la estructura activa de las subunidades aunque no se pierda el estado tetramérico. La Gly125 es el primer residuo de una de las tres hebras β del dominio de oligomerización involucrado en la formación del dímero en el caso de las enzimas ALDH diméricas (es decir en la intercara A-B) y también del tetrámero en el caso de las enzimas tetraméricas (en las intercaras A-C y B-D). Dada la posición de la Gly125 en esta hebra β , la cadena lateral del residuo introducido en la mutación se orienta hacia el interior de la propia subunidad en lugar de hacerlo hacia la intercara dímero-dímero (A-C o B-D), lo que de haber ocurrido habría producido un impedimento estérico y de repulsión (este último en el caso de la mutante Gly125Lys) entre las subunidades vecinas sin afectar a la estructura de la subunidad. Cualquier otro residuo que se introduzca en esta posición alterará la estructura del monómero, como se ha probado con las dos mutaciones hechas por nosotros, e interferirá con el correcto plegamiento de la proteína para dar una estructura nativa, pero no impide que se formen tetrámeros si el residuo introducido es pequeño y no produce una repulsión electrostática con algún otro del monómero. Por tanto esta posición no puede ser mutada, al menos en la *PaBADH*, para obtener dímeros.

En el trabajo de Julián-Sánchez y colaboradores (2007) se propuso que la Gly125 era una sinapomorfía de las BADHs tetraméricas, pero esta conclusión se alcanzó en base a alineamientos de sólo las enzimas con actividad BADH conocidas en aquel momento. Sin embargo, cuando posteriormente se hicieron alineamientos que incluían a todas las secuencias conocidas de las ALDHs (918 secuencias) se observó que esta conclusión no era correcta, aunque es cierto que la Gly en esta posición es un residuo muy conservado en las enzimas tetraméricas y mucho más que en las diméricas (Fig. 34). Este residuo está estrictamente conservado en toda la familia ALDH9 (que incluye enzimas bacterianas, como la *PaBADH*, de animales y de hongos), en la familia ALDH7 (que incluye enzimas de animales, plantas y protozoarios), en las familias ALDH1 y ALDH2 (que agrupan enzimas de animales, plantas y bacterias), en la familia ALDH1L (que sólo contiene enzimas de animales), en la familia ALDH5 (que incluye enzimas de bacterias, hongos y animales) y en todas las enzimas ALDH11 de bacterias. Este residuo está altamente conservado en las ALDH26 que son enzimas bacterianas (Fig. 32). Todas éstas son enzimas tetraméricas y por las estructuras cristalográficas que existen de ellas podemos decir que esta Gly ocupa una posición similar a la que ocupa en la *PaBADH*, de manera que se podría pensar que la presencia de este residuo es condición para que se produzca la tetramerización y por tanto serviría para predecir si la enzima es tetramérica. Pero puede también estar presente en enzimas diméricas como las ALDH4 (de animales y en algunas de bacterias), en muchas de las ALDH25 (que son enzimas exclusivamente bacterianas) y en unas pocas ALDH10 de plantas y bacterias. Por lo tanto, parecería que pudiera ser más bien su ausencia la que tuviera un carácter predictivo. Por ejemplo, puesto que no está presente en ninguna de las ALDH11 de plantas, podría predecirse que estas enzimas no son tetraméricas, a diferencia de las ALDH11 de bacterias que sí lo serían. Sin embargo, la caracterización bioquímica de algunas ALDH11 de bacterias y de plantas indica que ambas son tetraméricas (Iddar *et al.*, 2002, Iglesias *et al.*, 1987, Casati *et al.*, 2000), por lo que la presencia o ausencia de este residuo no posee un valor predictivo sobre el estado de oligomerización de la proteína. En la mayor parte de las ALDH11 de plantas en esta posición hay un glutámico, pero como no existe a la fecha ninguna estructura cristalográfica de estas enzimas, no podemos saber cómo se arregla esta intercara en ellas. A pesar de esto, su alto grado de conservación en las enzimas tetraméricas y el hecho de que en las estructuras tridimensionales conocidas ocupe la misma posición crítica en la intercara A-C fuertemente

sugiere que juega un papel muy importante para la correcta, es decir funcional, organización de las subunidades en muchas de las ALDHs tetraméricas.

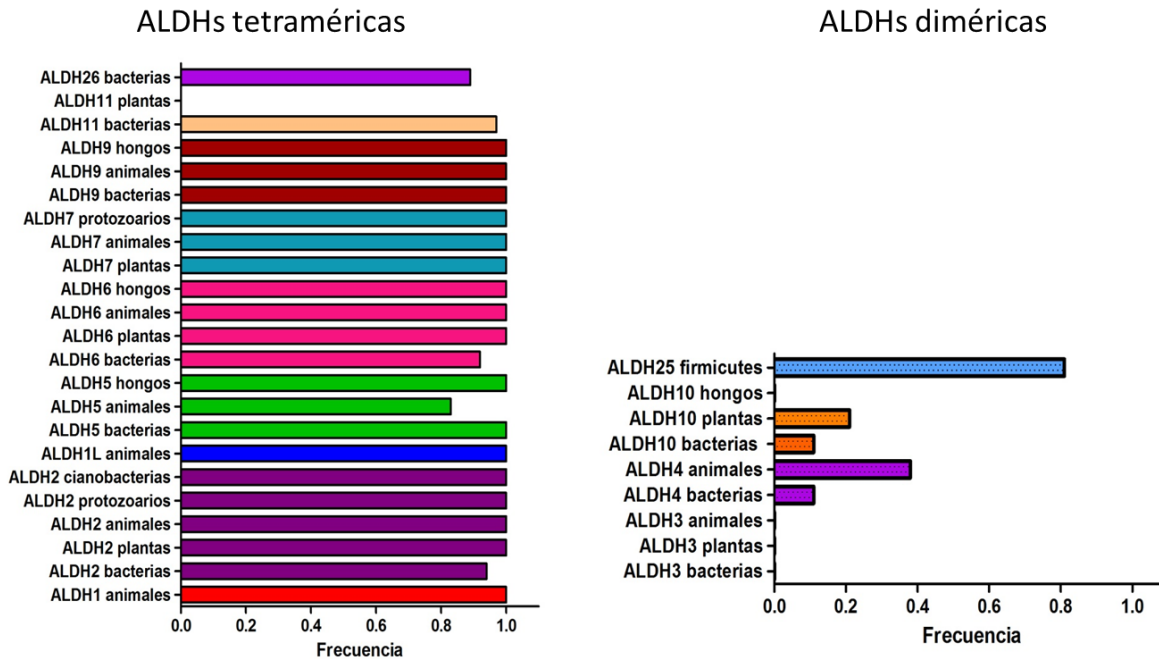


Figura 34. Frecuencia de aparición del residuo de glicina equivalente a la Gly125 de la *PaBADH* en las familias caracterizadas de las ALDHs tetraméricas y diméricas. Cada color representa a una familia diferente de las ALDHs.

La Gly 125 se ubica en la región de la cavidad central de la *PaBADH* y de las otras enzimas tetraméricas de estructura conocida. Se ha propuesto (Garza-Ramos *et al*, 2013; González-Segura *et al*, 2013) que en esta cavidad existen cuatro sitios idénticos de unión de cationes monovalentes, concretamente K^+ , formado por el Glu124 de una subunidad y el Glu126 de otra subunidad del dímero enfrentado (cuyas cadenas laterales están a 2.4 Å de distancia por lo que de no estar presente el K^+ surgirían repulsiones electrostáticas) y por el carbonilo del Glu450 y el nitrógeno amídico de la Leu 467, ambos de una tercera subunidad. Al participar residuos de tres subunidades distintas se piensa que estos sitios de unión a potasio son críticos para el establecimiento de la estructura cuaternaria nativa de la *PaBADH*. En estudios preliminares de nuestro grupo de trabajo, se mutó por separado al Glu124 y al Glu126 y se encontró que la mutante Glu124Ser es muy parecida a la Gly125Pro, es decir, no tiene actividad enzimática, no se une a la resina de afinidad que tiene un análogo del $NADP^+$ y conserva un estado tetramérico

pero inactivo. La mutante Glu126Ala sí tiene actividad y se puede purificar usando el protocolo de purificación que se usa para la enzima silvestre. Probablemente, la mutación Gly125Pro provocó que el Glu124 o el Glu126 no pudieran colocarse de forma correcta ocasionando que la enzima no pudiera unir al potasio en esta cavidad central.

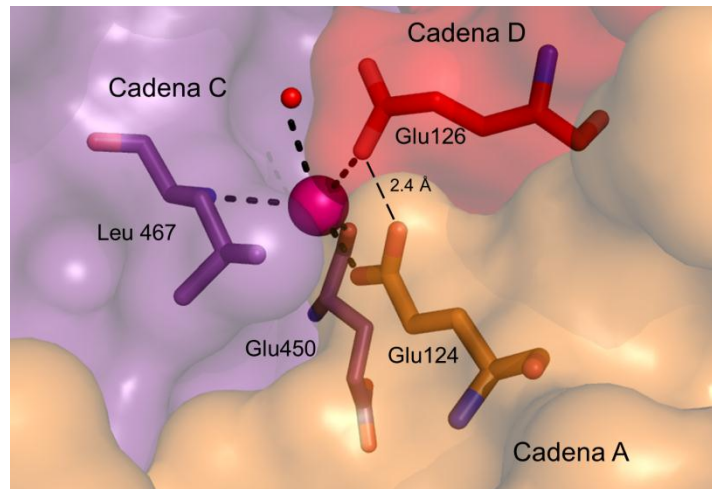


Figura 35. Sitio de unión a potasio (esfera rosa) de la cavidad central de la *PaBADH* que se forma entre las subunidades A, C y D. En bastones se muestran los residuos con los que el potasio forma enlaces de coordinación; el agua coordinada se muestra como una esfera rojas más pequeña.

VIII.2. Glu114

El segundo residuo mutado, Glu114, se localiza en la hélice $\alpha 5$ que forma parte de las intercaras A-D y B-C, en donde está formando una extensa red de interacciones iónicas con tres residuos de arginina de la hélice $\alpha 2$: Arg80 de su propia subunidad y Arg70 y Arg73 de la subunidad vecina (Fig. 15). Debido a su participación crítica en esta extensa red de puentes salinos que existen en esta intercara dímero-dímero, se decidió en primer lugar mutar el residuo Glu114 por una arginina, para introducir una fuerte repulsión electrostática con las otras argininas y porque éste es el residuo encontrado en otras enzimas tetraméricas como las ALDH1 y 2. La mutante Glu114Arg no se expresó en forma soluble, lo que indica que se afectó seriamente el plegamiento de la proteína probablemente por la repulsión tanto estérica como electrostática con la Arg80 de su propia subunidad. La ruptura de las interacciones que este residuo de arginina hace con su propia subunidad (con el carboxilo del Glu111 y con el carbonilo de la Val107) (Fig. 36C), sin

duda provocan la desestabilización del monómero. Las Arg70 y 73 de la otra subunidad quedarían expuestas al solvente al no formarse el tetrámero y no afectarían el plegamiento, ya que las interacciones que están haciendo los residuos de arginina con los oxígenos del grupo carboxilo del Glu114 (Figs. 36A y B, respectivamente) las harían con agua.

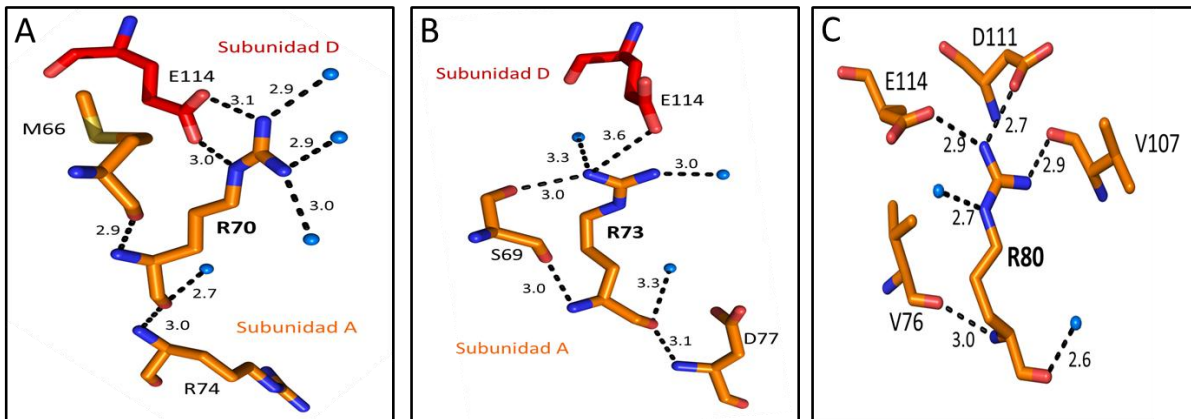


Figura 36. Residuos que interaccionan con el Glu114. A) Arg70, B) Arg73 y C) Arg80. Se muestran las distancias de las interacciones que forman en la *PaBADH* silvestre.

Se mutó entonces este residuo por una alanina para impedir que los puentes salinos se formen sin alterar la estructura de la propia subunidad, y así probar la importancia de estas interacciones en la formación del tetrámero. Sin embargo, la mutante Glu114Ala está como proteína tetramérica en una proporción significativa y el tetrámero parece ser bastante estable y no formar dímeros y/o monómeros cuando se diluye en el intervalo de concentración estudiado, que es de 100 veces. Entonces, ¿por qué existen dímeros a 2.5 mg/ml que es una concentración a la que la enzima silvestre es sólo tetramérica? Una posible explicación es que en la célula de *E. coli* el plegamiento de esta mutante lleva a dos especies diferentes: un tetrámero “casi nativo”, que tiene una actividad específica y una estabilidad frente a la dilución similar al tetrámero silvestre, y un dímero que posee actividad muy baja y que se disocia en monómeros al diluirse. En el tetrámero “casi nativo” en la enzima mutante Glu114Ala es posible que el lugar del carboxilo del Glu114 lo ocupen una o dos moléculas de agua que harían las mismas interacciones que estaban haciendo los oxígenos del carboxilo y den así estabilidad a la intercara.

A pesar de que con esta mutación sí se obtienen dímeros a una concentración de proteína en la que la enzima silvestre es tetramérica, esta mutante tampoco sirvió para alcanzar nuestro objetivo inicial debido a que los dímeros se acompañan del tetrámero en todo el intervalo de concentración de proteína estudiado y a que no pudimos separar ambas especies. Sólo podemos

obtener dímeros puros en ausencia de glicerol, como especies inactivas, y a una concentración de proteína demasiado baja (0.025 mg/ml) para realizar difracción de rayos X que nos daría la información que deseamos tener sobre los cambios de conformación de residuos específicos de la proteína originados por la mutación.

El residuo Glu114 está conservado en todas las ALDH9 de plantas, hongos y bacterias, así como en las ALDH6 de hongos, animales, plantas y bacterias y en menor proporción en las ALDH5 de animales y bacterias (Fig. 37). En el resto de las familias de ALDHs tetraméricas los residuos que más frecuentemente se encuentran en esta posición son: Asp en la ALDH7, Arg, Asn o Ser en la ALDH11, y muy frecuentemente una Arg en las ALDH1, ALDH2, ALDH1L y ALDH26. Aquellas enzimas que tienen Arg en la posición equivalente al Glu114 de *PaBADH*, tienen un Glu en la posición correspondiente a Arg80 y Asp, Tyr o Gln en la posición equivalente a Arg73. Entre estos residuos se establecen enlaces iónicos, pero todos ellos son de la misma subunidad (Fig.38A). Además, la Arg en la posición equivalente al Glu114 interacciona con un Asp también de su misma subunidad, residuo que también existe en la *PaBADH* (Asp 77), pero en la que orienta su cadena lateral hacia el solvente y forma puentes de hidrógeno con aguas de la intercara (Fig. 38C). Puesto que estos puentes salinos se forman dentro de una subunidad, no participan en estabilizar la intercara. Otras enzimas tetraméricas que sí poseen un Glu en la posición del Glu114 tienen sólo a la Arg equivalente a la 73, con la que hace un puente salino el Glu dentro de una subunidad (Fig. 38B). Por tanto, en estas últimas enzimas estos residuos tampoco participan en la estabilización de la intercara. En las enzimas diméricas, el Glu114 está conservado en las ALDH10 de hongos y de plantas y en las ALDH4 de bacterias, y se presenta pocas veces en las ALDH25 bacterianas y en muy pocas de las ALDH3 de animales (Fig. 37).

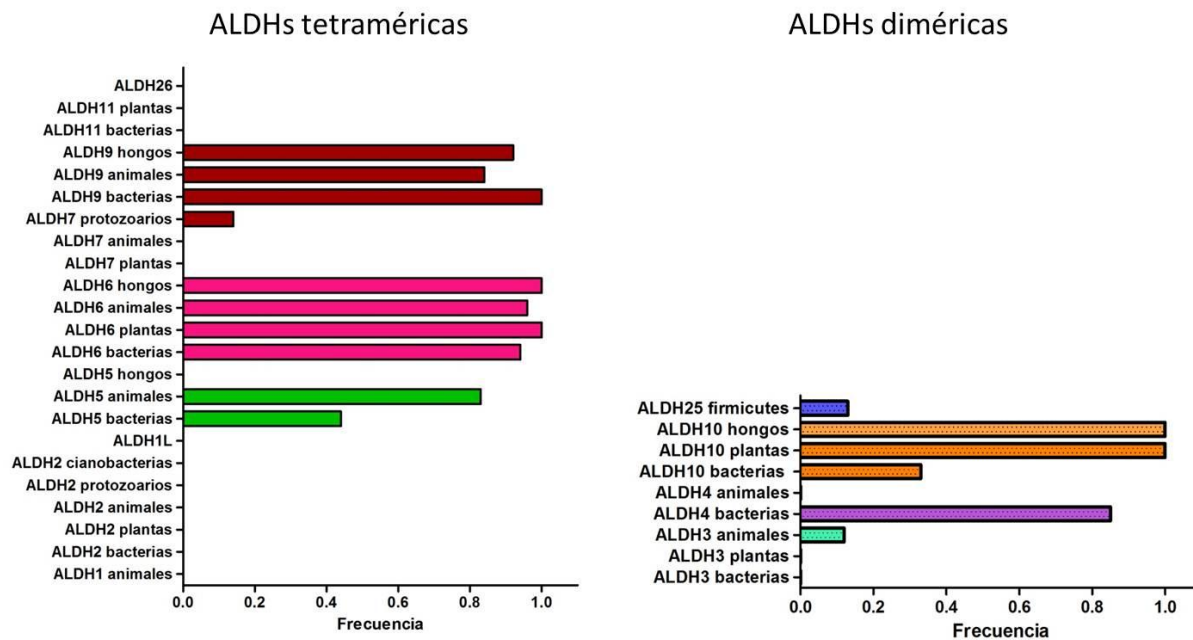


Figura 37. Frecuencia de aparición del residuo de glutámico equivalente al Glu14 de la *PaBADH* en las familias caracterizadas de las ALDHs tetraméricas y diméricas. Cada color representa a una familia de las ALDHs.

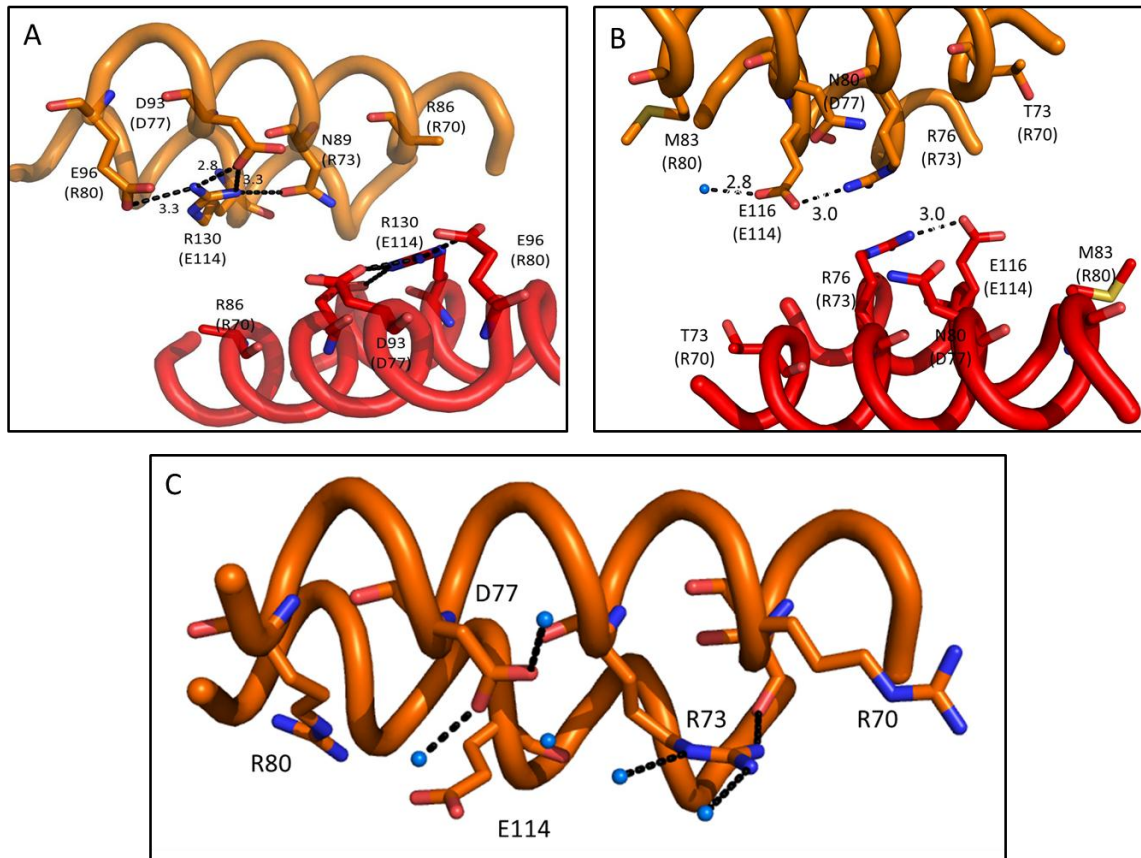


Figura 38. A) Interacciones de la Arg130 de la ALDH1 de borrego (PDB 1bxs). B) Interacciones del Glu116 de la succínico semialdehído deshidrogenasa (ALDH5) de *E. coli* (PDB 3jz4). C) Interacciones del Asp77 de la *PaBADH*. Los números entre paréntesis indican el residuo equivalente en la *PaBADH*.

VIII.3. Gly118

Como puede verse en la Fig. 16, los carbonos α de los dos residuos Gly118 enfrentados están a una distancia de 3.7 Å en la *PaBADH*. Si un residuo con cadena lateral más voluminosa ocupara esta posición habría problemas estéricos que llevarían a la enzima a adquirir un arreglo estructural diferente, lo que a su vez podría ocasionar la pérdida de otras interacciones necesarias para mantener estable la intercara A-D y que se adquiriera el estado tetramérico nativo, sin que por ello se afectara la estructura del monómero ni del dímero. Efectivamente, la sustitución de la Gly118 por un aspártico llevó a la obtención de dímeros bastante estables y que no se asocian en tetrameros incluso a concentraciones altas de proteína. Estos dímeros poseen una estructura secundaria similar a la del tetramero nativo, y también una termoestabilidad parecida. Aunque retienen la capacidad de unir al nucleótido, pero con muy baja afinidad, no son activos, lo que

indica que el sitio activo no tiene la conformación correcta para que se lleve a cabo algún o algunos paso(s) del mecanismo catalítico. Es interesante que esta mutante posee una actividad apreciable en los extractos crudos, actividad que se va perdiendo al purificarla. Una posible explicación a esta observación es que las concentraciones intracelulares de NAD(P)⁺ permitan mantener la forma tetramérica activa.

El residuo equivalente a Gly118 está estrictamente conservado en las enzimas de las familias ALDH1, ALDH2, ALDH1L, ALDH7 y en las ALDH26. Está conservado en las ALDH6 de plantas y en menor medida en las ALDH6 de bacterias y hongos, donde una Ser ocupa frecuentemente esta posición. Está muy conservado en las enzimas bacterianas y animales de la familia ALDH9, pero no lo está en las ALDH9 de hongos donde una Asn ocupa esta posición. No está conservado en las ALDH5 ni en las ALDH11 en las que se encuentra un residuo ácido, Glu o Asp (Fig. 39).

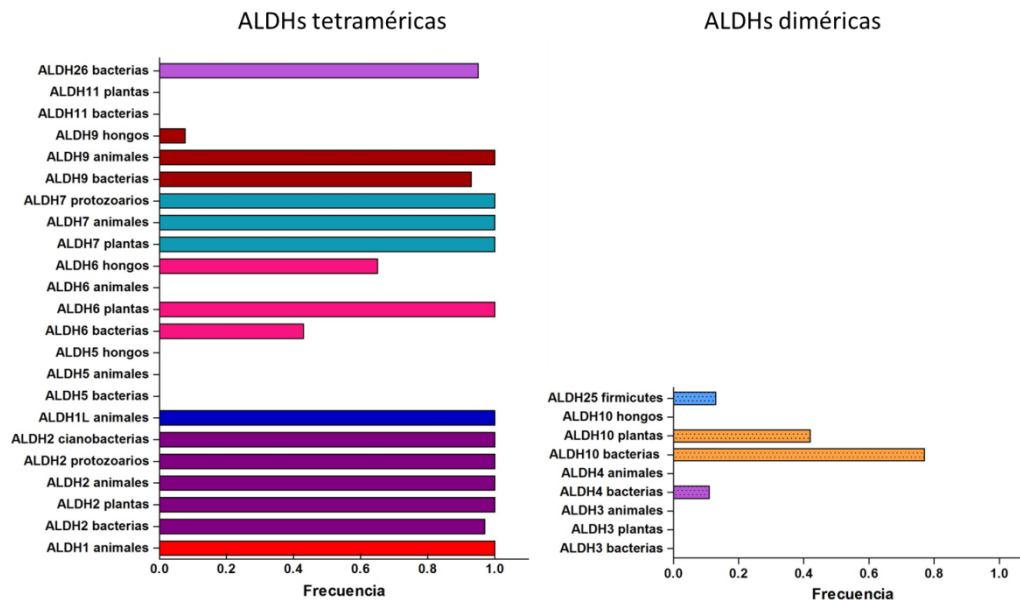


Figura 39. Frecuencia de aparición del residuo de glicina equivalente a la Gly118 de la *PaBADH* en las familias caracterizadas de las ALDHs tetraméricas y diméricas. Cada color representa a una familia de las ALDHs.

Las estructuras cristalográficas que se han determinado de miembros de algunas de estas familias muestran que esta región de la intercara A-D se organiza de forma diferente dependiendo de si la enzima tetramérica posee o no un residuo de Gly en la posición equivalente a la Gly118 de la *PaBADH*. Pero el resultado final es el mismo: las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 5$ de las subunidades A y D

quedan enfrentadas formando varias interacciones electrostáticas, como puede observarse para el caso de la succínico semialdehído deshidrogenasa (Fig. 40).

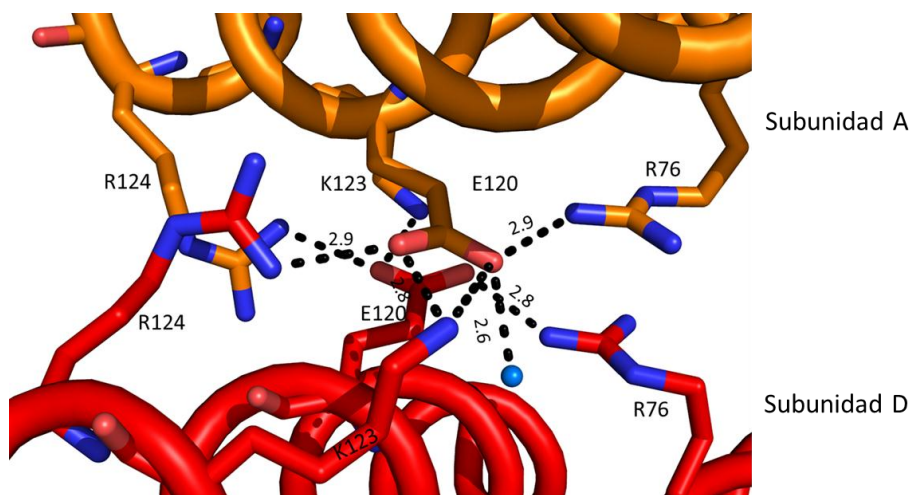


Figura 40. Interacciones del Glu120 de la succínico semialdehído deshidrogenasa de *E. coli* (ALDH5). El residuo Glu120 es equivalente a la Gly118 en la *PaBADH*.

De las tres mutantes de la *PaBADH* obtenidas en forma soluble en el trabajo de esta tesis, pensamos que la Gly118Asp es la que más merece la pena seguir estudiando, ya que da lugar a dímeros aún a las altas concentraciones de proteína que se requieren para obtener su estructura tridimensional por cristalización y difracción de rayos X. El obtener la estructura cristalográfica de esta mutante nos permitiría conocer cuáles son las diferencias entre su sitio activo y el de la enzima tetramérica nativa, y por tanto por qué la *PaBADH* parece ser un tetramero obligado y de qué forma la conformación de los sitios activos depende de la tetramerización de los dímeros.

IX. CONCLUSIONES

1. Todas las mutaciones realizadas en residuos de las intercaras provocan la disociación parcial de la enzima, sin que por ello se produzca su agregación masiva, lo que indica que los parches hidrofóbicos que aparecen al disociar a la proteína son contrarrestados por los residuos polares sin y con carga que se exponen al solvente.
2. El residuo de glicina en la posición equivalente a la Gly125 de la *PaBADH* no puede usarse para disociar al tetrámero en dímeros a pesar de estar situado en una intercara dímero-dímero y de estar altamente conservado en muchas familias de ALDHs tetraméricas. Sin embargo, este residuo sí parece ser muy importante para que el tetrámero posea la conformación nativa del sitio activo.
3. La mutación del residuo Glu114 por una alanina tampoco impide que se forme el tetrámero; esta mutación parece dar lugar a diferentes especies tetraméricas que difieren en su actividad y estabilidad frente a la dilución.
4. Si bien una proporción importante de la mutante Glu114Ala está presente como dímeros, que se disocian a monómeros en el intervalo de concentración estudiado, no se pudo separar las especies con diferente estado de agregación, por lo que esta mutación no nos resultó útil para nuestros fines.
5. La mutación del residuo Gly118 por un aspártico sí permitió obtener dímeros que no forman tetrámeros incluso a altas concentraciones de proteína. Estos dímeros, además, parecen tener actividad por lo que sería muy interesante continuar su caracterización.
6. En conjunto, los resultados de este trabajo indican que las intercaras dímero-dímero juegan un importante papel no sólo en mantener el estado de oligomerización tetramérico, sino en la adquisición de la conformación nativa del sitio activo.

X. PERSPECTIVAS

1. Hacer una caracterización cinética completa de los dímeros obtenidos en la mutante Gly118Ala, tanto en estado estacionario como en el estado pre-estacionario. Con los últimos estudios podríamos determinar si el paso limitante de la reacción cambia al cambiar el estado de oligomerización, y si sigue presentando la reactividad de la mitad de los sitios que posee la *PaBADH* silvestre tetramérica.
2. Determinar la estructura tridimensional de estos dímeros para conocer por qué son inactivos y por tanto determinar cómo la adquisición del estado tetramérico de la enzima afecta al plegamiento global y a la conformación o dinámica del sitio activo.
3. Con el mismo fin de entender el papel que juega en la *PaBADH* la tetramerización, obtener otros dímeros aislados que podamos caracterizar funcional y estructuralmente para compararlos con los obtenidos de la mutante Glu118Ala. Para ello, se podría mutar el residuo Glu114, que ya sabemos que sí juega un papel importante en la tetramerización de la enzima, sustituyéndolo por un residuo más grande que la alanina e hidrofóbico, de manera que impida que se puedan posicionar moléculas de agua que interaccionen con las argininas 70 y 73, porque es posible estas interacciones sean las que estabilicen al tetrámero en la mutante Glu114Ala.
4. Si se obtienen otros dímeros en solución, determinar si tienen actividad enzimática y en caso afirmativo hacer su caracterización cinética. Si no poseen actividad, investigar si pueden unir al nucleótido. Igualmente caracterizarlos estructuralmente y obtener, de ser posible, su estructura cristalográfica para determinar sus diferencias con la de los dímeros de la mutante Gly118Ala.
5. Obtener la estructura cristalográfica del tetrámero inactivo de la Gly125Pro para encontrar las diferencias entre esta mutante y la enzima silvestre y así contribuir a entender la influencia que esta región de la cavidad central de la enzima tiene sobre la conformación del sitio activo.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Ambroziak, W. y Pietruszko, R. 1991. Human aldehyde dehydrogenase. Activity with aldehyde metabolites of monoamines, diamines y polyamines. *J. Biol Chem.* 266: 13011-13018.
- Bergen, G.A. y Shelhamer, J.H. 1996. Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 10: 297-325.
- Byers, D. y Meighen, E. 1984. *Vibrio harveyi* aldehyde dehydrogenase. Partial reversal of aldehyde oxidation and its possible role in the reduction of fatty acids for the bioluminescence reaction. *J. Biol. Chem.* 259:7109-7114.
- Boch, J., Nau-Wagner, G., Kneip, S. y Bremer, E. 1997. Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch. Microbiol.* 168: 282-289.
- Bouché N. y Fromm H. 2004. GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci.* 9:110-115.
- Casati, D.F., Sesma J.I. y Iglesias, A.A. 2000. Structural and kinetic characterization of NADP-dependent, non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from celery leaves. *Plant Sci.* 154: 107-115.
- Chern, M.K. y Pietruszko, R. 1995. Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213: 561-568.
- DeLano, W.L. 2002. PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA) <http://www.pymol.org/>.
- D'Souza-Ault, M., Smith, L.T. y Smith G.M. 1993. Roles of N-Acetylglutaminyglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 473-478.
- Diab, F.T., Bernard, A., Bazire, D., Haras, C., Blanco, G. y Jebbar, D. 2006. Succinate-mediated catabolite repression control on the production of glycine betaine catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under low and elevated salinities. *Microbiology* 152: 1395-1406.
- Díaz-Sánchez, A.G., González-Segura, L., Rudiño-Piñera, E., Lira-Rocha A., Torres-Larios, A. y Muñoz-Clares R.A. 2011. Novel NADPH-cysteine covalent adduct found in the active site of an aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* 44: 443-452.
- Díaz-Sánchez, Á.G., González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C., Rudiño-Piñera, E., Montiel, C., Martínez-Castilla, L.P. y Muñoz-Clares, R.A. 2012. Amino acid residues critical for the specificity for betaine aldehyde of the plant ALDH10 isoenzyme involved in the synthesis of glycine betaine. *Plant Physiol.* 158: 1570-1582.

- Falkenberg, P. y Strom A.R. 1990. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1034: 253-259.
- Feldman, R.I. y Weiner, H. 1972. Horse liver aldehyde dehydrogenase. II. Kinetics and mechanistic implications of the dehydrogenase and esterase activity. *J. Biol. Chem.* 247: 267-272.
- Garza-Ramos, G., Carrillo-Nava, E., Costas, M., Mújica-Jiménez, C., Velasco-García, R. y Muñoz-Clares, R.A. En: H. Weiner, E. Maser, R. Lindahl, B. Plapp (Eds.), *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 13, Purdue University Press, West Lafayette, Indiana, USA, 2007, pp. 83-90.
- Garza-Ramos, G., Mújica-Jiménez, C. y Muñoz-Clares R.A. 2013. Potassium and ionic strength effects on the conformational and thermal stability of two aldehyde dehydrogenases reveal structural and functional roles of K⁺ binding sites. *PLoS One.* 8(1):e54899.
- George, R.H. 1987. *Pseudomonas* infection in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* 62: 438-439.
- Gill, S.C. y von Hippel, P.H. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182: 319-326.
- González-Segura, L., Velasco-García, R., Rudiño-Piñera, E., Mújica-Jiménez, C. y Muñoz-Clares, R.A. 2005. Site-directed mutagenesis and homology modeling indicate an important role of cysteine 439 in the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 87: 1056-1064.
- González-Segura, L., Rudiño-Pinera, E., Muñoz-Clares, R.A. y Horjales, E. 2009. 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 phosphate of NADP⁺ at a novel cation binding site. *J. Mol. Biol.* 385: 542-557.
- González-Segura, L., Riveros-Rosas, H., Díaz-Sánchez, A.G., Julián-Sánchez, A. y Muñoz-Clares, R.A. 2013. Potential monovalent cation-binding sites in aldehyde dehydrogenases. *Chem.-Biol. Interact.* 202: 41-50.
- Govan, J.R. y Deretic, V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60: 539-574.
- Gruez, A., Roig-Zamboni, V., Grisel, S., Salomonii, A., Valenceia, C., Campanacci, V., Tegoni, M. y Cambillau, C. 2004 Crystal structure and kinetics identify *Escherichia coli* YdcW gene product as a medium chain aldehyde dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 343: 29-41.
- Grunewald, R.W. y Eckstein, A. 1995. Osmotic regulation of the betaine metabolism in immortalized renal cells. *Kidney Int.* 48: 1714-1720.

- Hanson, A.D. y Wyse, R. 1982. Biosynthesis, translocation, and accumulation of betaine in sugar beet and its progenitors in relation to salinity. *Plant Physiol.* 70:1191-1198.
- Hardalo, C. y Edberg, S. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23: 47-75.
- HyperChem (TM) Professional 7.51, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA.
- Holloway, B.W. 1955. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 13:572-581.
- Horecker, B.L. y Kornberg, A. 1948. The extinction coefficients of the reduced band of the pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 175: 385-390.
- Iddar, A., Valverde, F., Serrano, A. y Soukri, A. 2002. Expression, purification, and characterization of recombinant nonphosphorylating NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*. *Protein Expr. Purif.* 25: 519-26.
- Iglesias, A.A., Serrano, A., Guerrero, M.G., Losada, M. 1987. Purification and properties of NADP-dependent non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 925: 1-10.
- Jakoby, W.B. 1963. Aldehyde dehydrogenases. In *The Enzymes*, 2nd edn, vol. 7. (eds Boyer, P. D., Lard, H. y Myrback, K.). New York: Academic Press. pp. 203-221.
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswawamy, S., Hjelmqvist, L., Jornvall, H. y Eklund H. 1998. Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Prot. Sci.* 7: 2106-2117.
- Julián-Sánchez, A., Riveros-Rosas, H., Martínez-Castilla, L.P., Velasco-García, R. y Muñoz-Clares, R.A.: Phylogenetic and structural relationships of the betaine aldehyde dehydrogenases. En: Weiner, H., Maser, E., Lindahl, R. y Plapp, B. (Eds.), *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana, 2007. pp 64-76.
- Karplus, K., Barrett, C. y Hughey, R. 1998. Models for detecting remote protein homologies. *Bioinformatics* 14(10): 846-856.
- Kopecny, D., Tylichova, M., Snegaroff J., Popelkova, H. y Sebela, M. 2011. Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of α -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. *FEBS J.* 278: 3130-3139.
- Kopecny, D., Koncitikova, R., Tylichova, M., Vigouroux, A., Moskalikova, H., Soral, M., Sebela, M. y Morera, S. 2013. Plant ALDH10 family: identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate. *J. Biol. Chem.* 288: 9491-

9507.

- Krissinel, E. y Henrick, K. 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* 372: 774-797.
- Kurys, G., Ambroziak, W. y Pietruszko, R. 1989. Human aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of a third isozyme with low K_m for γ aminobutyraldehyde. *J. Biol. Chem.* 264: 4715-4721.
- Lessie, T.G. y Phibbs, P.V. Jr. 1984. Alternative pathways of carbohydrate utilization in *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Microbiol.* 38: 359-387.
- Lucchesi, G., Pallotti, C., Lisa, A. y Domenech, C. 1998. Constitutive choline transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 162: 123-126.
- Luo, M., Singh, R.K. y Tanner, J.J. 2013 Structural determinants of oligomerization of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase: identification of a hexamerization hot spot *J. Mol. Biol.* 425: 3106-3120.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. 1997. Brock Biology of Microorganisms, 8a edición. Prentice Hall. New Jersey. pp. 698-701.
- Meskys, R., Harris, R.J., Casaite, V., Basran, J. y Scrutton, N.S. 2001. Organization of the genes involved in dimethylglycine and sarcosine degradation in *Arthrobacter spp*: implications for glycine betaine catabolism. *Eur. J. Biochem.* 268: 3390-3398.
- Mori, N., Yoshida, N. y Kitamoto, Y. 1992. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. *J. Ferment. Bioeng.* 73: 352-356.
- Mori, N., Fuchigami, S. y Kitamoto, Y. 2002. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase with high affinity for NADP from *Arthrobacter globiformis*. *J. Biosci. Bioeng.* 93: 130-135.
- Muntz, J.A. 1950. The inability of choline to transfer a methyl group directly to homocysteine for methionine formation. *J. Biol. Chem.* 182: 489-499.
- Muñoz-Clares, R.A. y Velasco-García, R. 2004 Genio y figura de la betaína aldehído deshidrogenasa. *Mensaje bioquímico.* 28: 203-223.
- Muñoz-Clares, R.A., González-Segura, L. y Díaz-Sánchez, A.G. 2011 Crystallographic evidence for active-site dynamics in the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. Implications for the deacylation step of the catalyzed reaction. *Chem.-Biol. Interact.* 191: 137-146.
- Nagasawa, T., Kawabata, Y. y Ogata, K. 1976. Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Agric. Biol. Chem.* 40: 1743-1749.

- Pemberton, T.A., Srivastava, D., Sanyal, N., Henzl, M.T., Becker, D.F. y Tanner, J.J. 2014. Structural Studies of Yeast $\Delta(1)$ -Pyrroline-5-carboxylate Dehydrogenase (ALDH4A1): Active Site Flexibility and Oligomeric State. *Biochemistry*. 4;53:1350-1359.
- Perez-Miller, S.J. y Hurley, T.D. 2003 Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* 42: 7100-7109.
- Pesin, S.R. y Candia, O.A. 1982. Acetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22: 651-659.
- Pier, G.B. 1985. Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. *J. Infect. Dis.* 151: 575-580.
- Rathinasabapathi, B., McCue, K.F. Gage, D.A. y Hanson, A.D. 1994. Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta* 193: 155-162.
- Rodríguez-Zavala, J.S. y Weiner, H. 2002. Structural aspects of aldehyde dehydrogenase that influence dimer-tetramer formation. *Biochemistry* 41: 8229-8237.
- Rossmann, M.G., Moras, D. y Olsen, K.W. 1974. Chemical and biological evolution of nucleotide binding protein. *Nature* 250: 194-199.
- Rothschild, H.A. y Guzman-Barron, E.S. 1954. The oxidation of betaine aldehyde by aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 209: 511- 523.
- Sage, A. y Vasil, M. 1997. Osmoprotectant-dependent expression of plcH, encoding the hemolytic phospholipase C, is subject to novel catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 179: 4874-4881.
- Sánchez-Izquierdo, A. 2010 Obtención y caracterización funcional y estructural de la mutante G125K de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- Smith, L.T., Pocard, J.A., Bernard, T. y Le Rudulier, D. 1988. Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 170: 3142-3149.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Edwin, A. L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, K.S., Wu, Z., Paulsenk, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock R.E., Lory, S. y Olson M.V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959–964.

- Tylichová, M., Kopečný, D., Moréra, S., Briozzo, P., Lenobel, R., Snégaroff, J. y Šebela M. 2010. Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes *J. Mol. Biol.* 396: 870-882.
- Trossat, C., Rathinasabapathi, B. y Hanson, A.D. 1997. Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde and ω -aminoaldehydes. *Plant Physiol.* 113: 1457-1461.
- Valenzuela-Soto, E.M. y Muñoz-Clares, R.A. 1994. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* subjected to water deficit. *J. Plant Physiol.* 143: 145-152.
- Valenzuela-Soto, E.M., Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Gaviria-González, L.L. y Muñoz-Clares, R.A. 2003. Monovalent cations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidney and amaranth leaves. *Chem.-Biol. Interact.* 143-144: 139-148.
- Vaz, F.M., Fouchier, S.W., Ofman, R., Sommer, M. y Wanders, R.J. 2000. Molecular and biochemical characterization of rat gamma-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 275: 7390-7394.
- Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G. y Muñoz-Clares R.A. 1999. Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181: 1292-1300.
- Velasco-García, R., González-Segura, L. y Muñoz-Clares, R.A. 2000. Steady-state kinetic mechanism of NADP⁺ and NAD⁺ dependent reactions catalyzed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* 352: 675-683.
- Velasco-García, R., Villalobos, M.A., Ramirez-Romero M.A., Mujica-Jimenez, C., Iturriaga G. y Muñoz-Clares, R.A. 2006a. Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt. *Arch. Microbiol.* 185: 14-22.
- Velasco-García, R., Zaldivar-Machorro, V.J., Mujica-Jiménez, C., González-Segura, L. y Muñoz-Clares, R.A. 2006b. Disulfiram irreversibly aggregates betaine aldehyde dehydrogenase. A potential target for antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341: 408-415.
- Vojtechová, M., Hanson, A.D. y Muñoz-Clares, R.A. 1997. Betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD⁺ dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde to dimethylsulfoniopropionate. *Arch. Biochem. Biophys.* 337: 81-88.

- Wargo, M., Szwegold, B. y Hogan, D. 2008. Identification of two gene clusters and a transcriptional regulator required for *Pseudomonas aeruginosa* glycine betaine catabolism. *J. Bacteriol.* 190: 2690–2699.
- Weretilnyk, E.A. y Hanson, A.D. 1989. Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, *in vitro* translation of the mRNA and regulation by salinity. *Arch. Biochem. Biophys.* 271:56-63.
- Wright, J.R. y Clements, J.A. 1987. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: 426-444.
- Yoval-Sánchez B, Pardo J.P. y Rodríguez-Zavala, J.S. 2013. New insights into the half-of-the-sites reactivity of human aldehyde dehydrogenase 1A1. *Proteins* 81: 1330-1339.
- Zaldivar-Machorro, V.J., Lopez-Ortiz, M., Demare, P., Regla, I. y Muñoz-Clares, R.A. 2011. The disulfiram metabolites S-methyl-N,N-diethylthiocarbamoyl sulfoxide and S-methyl-N,N-diethylthiocarbamoyl sulfone irreversibly inactivate betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, both *in vitro* and *in situ*, and arrest bacterial growth. *Biochimie* 93: 286-295.