

PROBLEMA BIOQUÍMICO

José Salud Rodríguez Zavala
Departamento de Bioquímica,
Instituto Nacional de Cardiología.
Correo E: rodjos@cardiologia.org.mx

Determinación del paso limitante en aldehído deshidrogenasas atípicas de *Escherichia coli*.

Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) son enzimas que oxidan a los aldehídos a sus correspondientes ácidos por medio de la utilización de NAD(P)⁺. La importancia de las ALDHs radica en que estas enzimas participan inespecíficamente en la destoxificación de aldehídos en los organismos pues pueden utilizar una gama amplia de estos compuestos. Las ALDHs se encuentran como dímeros o tetrámeros formados por subunidades idénticas (1-3). Los tetrámeros de la ALDH1 y la ALDH2 poseen lo que se conoce como reactividad de medio sitio (4). Esto es, a pesar de que la enzima contiene 4 sitios activos completos, solo dos de ellos presentan actividad. El rendimiento de este tetrámero es de 2 moles de NADH/mol de enzima, en lugar de 4.

El mecanismo general de reacción de las ALDHs se ilustra en la figura 1, donde se indica que los substratos se unen a la enzima de manera secuencial ordenada, uniéndose en primer lugar la coenzima. En la figura 1 se muestra también, el paso limitante de la reacción para los miembros de las ALDHs clase 1, 2 y 3. El paso limitante para la clase 1 es k₉, la liberación de la coenzima (5), para la clase 2 es k₇, la desacilación (6) y para la clase 3 es k₅, la transferencia del hidruro (7).

Para discernir el paso limitante de la reacción en estas enzimas se utilizan diferentes estrategias. Para determinar si el paso limitante es la transferencia del hidruro, se utilizan análogos del sustrato que faciliten o dificulten

la reacción. La utilización de aldehídos con el hidrógeno alfa substituido por deuterio, hará lenta la reacción, si el paso limitante es la transferencia del hidruro. La utilización de aldehídos con substituyentes aceptores de electrones como cloro o nitro en la molécula, también harán más lenta la reacción, si la transferencia del hidruro es el paso limitante.

Si el paso limitante no es la transferencia del hidruro, éste se encontrará entonces después de la formación del NADH. El hecho de que el paso limitante se encuentre después de la reducción de la coenzima, permite que se presente lo que se conoce como "burst" o "salto" antes del estado estacionario de la reacción (8). Esto es posible debido a que el NADH después de formarse, permanece un tiempo en los sitios activos antes de ser liberado al medio y puede ser medido por fluorescencia excitando a 340 nm, y midiendo la fluorescencia emitida a 460 nm. Sin embargo, existe la posibilidad de que la fluorescencia del NADH unido a la enzima sea mayor que la del NADH al liberarse al medio de incubación (la fluorescencia del NADH es mayor en ambientes hidrofóbicos), y que por tanto la concentración del NADH determinada en los sitios activos se encuentre sobreestimada.

Otra característica de las ALDHs que se puede utilizar para la determinación del paso limitante es el efecto del Mg²⁺. Este ión activa la desacilación (6) e inhibe la liberación de la coenzima (9), mientras que no ejerce efecto sobre la transferencia del hidruro (7). Se ha determinado que el Mg²⁺ hace mas fuerte la unión de la coenzima en ALDH1 y ALDH2, por lo anterior, el paso limitante de la reacción en ALDH1 se vuelve más lento. Por otro lado, al

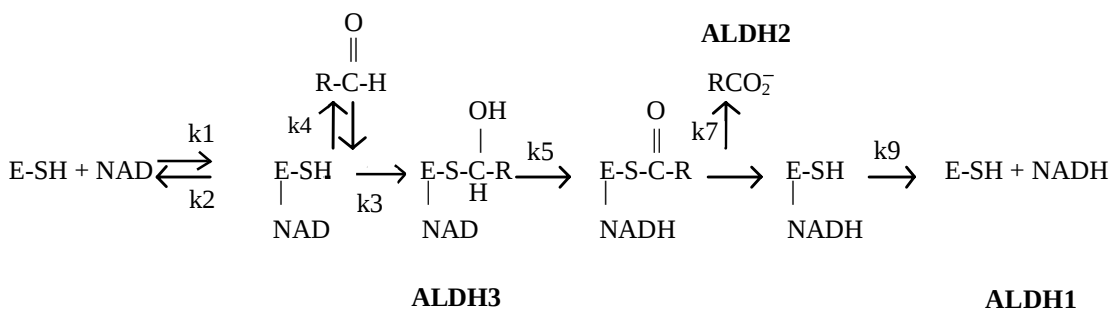


Figura 1. Mecanismo general de reacción de las aldehído deshidrogenasas.

TABLA 1

PAD	acetaldehído	α -(2 H)-acetaldehído	2-cloro-acetaldehído
Vmax (nmoles/min/mg)	3900	1800	670
ALD	benzaldehído	α -(2 H)-benzaldehído	p-nitro-benzaldehído
Vmax (nmoles/min/mg)	250	222	700

Efecto de diferentes sustratos sobre la actividad de PAD y ALD. La actividad se determinó adicionando la enzima en una celda conteniendo 100 mM de buffer de fosfatos pH 7.4 y 1 mM de NAD⁺ a 25 °C. La reacción se inició con la adición del aldehído.

TABLA 2

ALD		PAD	
t (s)	F (UA)	t (s)	F (UA)
121	2.3	117.6	2
121.7	2.3	118.6	2
122.3	2.3	119.5	2
122.9	2.3	120.5	2
123.4	2.3	121.6	2
124	3.3	122.4	2
124.5	2.3	123	2.1
124.6	2.8	124	2.4
124.8	3.1	124.8	2.7
125	3.96	126.4	3
125.4	4.97	127	3.6
125.8	5.33	127.8	3.8
127.2	5.45	128.7	4.2
128.3	5.53	129.4	4.4
129	5.58	130.2	4.7
130.3	5.64	131	5
131.4	5.7	131.7	5.2
132.5	5.76	132	5.5
133.8	5.84	133	5.7
134.9	5.9		
135.8	5.95		
136.9	6		
138	6.1		

Actividad de las enzimas PAD y ALD determinadas como fluorescencia dada por la producción de NADH a lo largo del tiempo. La actividad se determinó adicionando la enzima en una celda conteniendo buffer de fosfatos pH 7.4 y 1 mM de NAD⁺ a 14°C. La reacción se inició adicionando 1 mM propionaldehído. 1 nmol de NADH produce una señal de fluorescencia de 0.32 UA.

unirse el Mg²⁺ a la coenzima aumenta la nucleofilicidad de la cisterna 302, provocando que el paso limitante de la reacción en ALDH2 se haga más rápido (9).

Se han reportado dos ALDHs de *E. coli* K12 que participan en vías metabólicas específicas: la fenilacetaldehído deshidrogenada (PAD), que participa en el metabolismo de la fenilalanina (10) y la lactaldehído deshidrogenada (ALD), que participa en el metabolismo de la fucosa (12). La PAD se reportó como un dímero

(11) y la ALD como un tetrámero (12), aunque las dos enzimas poseen una extensión de alrededor de 60 aminoácidos en el N-terminal, característica de los tetrámeros, y no poseen la extensión de 17 aminoácidos en el C-terminal característica de las enzimas diméricas.

En un trabajo reciente encaminado a la caracterización detallada de estas enzimas para poderlas ubicar en alguna de las diferentes familias de las ALDHs, determinamos que la enzima PAD es un tetrámero (13). Además, se ensayó el efecto de diferentes aldehídos sobre la actividad de estas enzimas. Los resultados se muestran en la tabla 1. También se analizó fluorométricamente la actividad enzimática para determinar la existencia de "burst". Los datos de fluorescencia a diferentes tiempos se muestran en la tabla 2. Finalmente se determinó el efecto del Mg²⁺ sobre la actividad de ambas enzimas, los datos se muestran en las tablas 3 y 4.

Analizar los datos presentados y determinar cual es el paso limitante de la reacción para las dos enzimas bacterianas.

TABLA 3

	Actividad de Deshidrogenasa (μ mol/min*mg)	% Actividad
Mg ²⁺ (mM)		
0	5.72	100
5	5.77	100.9
10	5.74	100.3

Efecto del Mg²⁺ sobre la actividad de deshidrogenasa de la enzima PAD. La actividad de la enzima se determinó en un buffer compuesto de 20 mM MOPS pH 7.4 y 1 mM de NAD⁺, variando la concentración de Mg²⁺ a 25 °C. La reacción se inició adicionando 1 mM de propionaldehído.

TABLA 4

	Actividad de Deshidrogenasa (nmol/min*mg)	% Inhibición
Mg ²⁺ (mM)		
0	500	0
0.1	465	7
0.5	430	14
1	350	30
2	312	38
5	299	40
10	299	40

Efecto del Mg²⁺ sobre la actividad de deshidrogenasa de la enzima ALD. La actividad de la enzima se determinó en un buffer compuesto de 20 mM MOPS pH 7.4 y 1 mM de NAD⁺, variando la concentración de Mg²⁺ a 25°C. La reacción se inició adicionando 1 mM de propionaldehído.