

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

En presencia de α -(^2H)acetaldehído, la actividad de PAD disminuye más del 50%. Este efecto isotópico es indicativo de que el paso limitante de la reacción es la transferencia del hidruro. En presencia del acetaldehído con un sustituyente cloro, que es un grupo aceptor de electrones, la actividad de esta enzima fue solo un 15% de la actividad original. La disminución en la actividad en presencia de estos dos substratos muestra que el paso limitante de la reacción para PAD es la transferencia del hidruro. La actividad de la enzima ALD no fue afectada en presencia del substrato deuterado. La ausencia de efecto isotópico indica que el paso limitante de la reacción no es la transferencia del hidruro. En presencia del substrato con el sustituyente nitro, la actividad no solo no disminuyó, sino que se incrementó alrededor de 3 veces. Este efecto indica que el ataque nucleofílico (desacilación) está involucrado en el paso limitante de la reacción.

Graficando los datos de fluorescencia de la tabla 2 contra tiempo se obtienen las figuras 2 y 3.

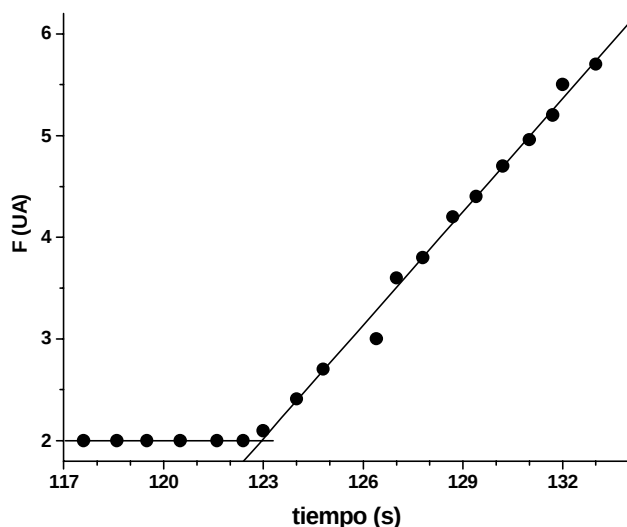


Figura 2. Actividad de deshidrogenasa de la PAD. La actividad se determinó adicionando 5 nmol de enzima en una cubeta que contenía 100 mM de buffer de fosfatos a pH 7.4 y 1 mM de NAD^+ a 14 °C.

En la figura 2 se observa que al adicionar el sustrato inmediatamente se inicia la reacción en el estado estacionario de la PAD, sin que se presente ningún salto en la actividad. Esta observación corrobora que el paso limitante para esta enzima es la transferencia del hidruro.

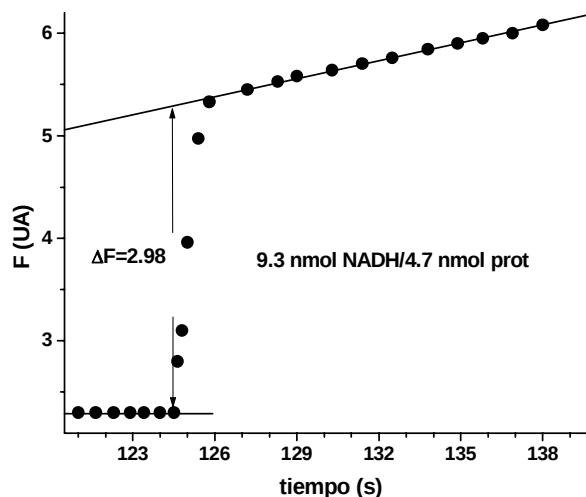


Figura 3. Determinación del burst antes del estado estacionario en la ALD. La reacción se llevó a cabo adicionando 4.7 nmol de ALD en una celda conteniendo 100 mM de buffer de fosfatos pH 7.4 y 1 mM NAD^+ . El ensayo se realizó a 14 °C para hacer lenta la reacción y captar más puntos en la región del "burst".

En cambio, cuando se adicionó el sustrato a la ALD, se observó un salto en la actividad antes de que la reacción alcanzara el estado estacionario (Fig. 3). Este resultado corrobora que el paso limitante para esta enzima se encuentra después de la formación del NADH. El ΔF del "burst" fue de 2.98 UF. Este valor fue interpolado en una curva de calibración de NADH generada en el fluorómetro (Fig. 4), y se determinó que es equivalente a 9.3 nmol de NADH. En el ensayo se utilizaron 4.7 nmol de enzima, por lo que al dividir el valor de 9.3 entre la enzima total se obtiene un rendimiento de 1.98 nmol NADH/nmol de enzima. Este resultado nos indica que la ALD posee reactividad de medio sitio como se ha reportado para las enzimas tetraméricas humanas ALDH1 y ALDH2 (4).

En la tabla 3 se observa que el Mg^{2+} no ejerció efecto sobre la actividad de la PAD cuando se utilizó hasta 10 mM del ión. Esto es consistente con las observaciones anteriores que indicaban que para la enzima PAD el paso limitante es la transferencia del hidruro.

Cuando se evaluó el efecto del Mg^{2+} sobre la actividad de la ALD, se observó que este ión inhibe en un 7% la actividad de la enzima a una concentración de 100 μM , mientras que, cuando se incrementa la concentración de Mg^{2+} a 10 mM se alcanza una inhibición del 40%. Esto sugiere

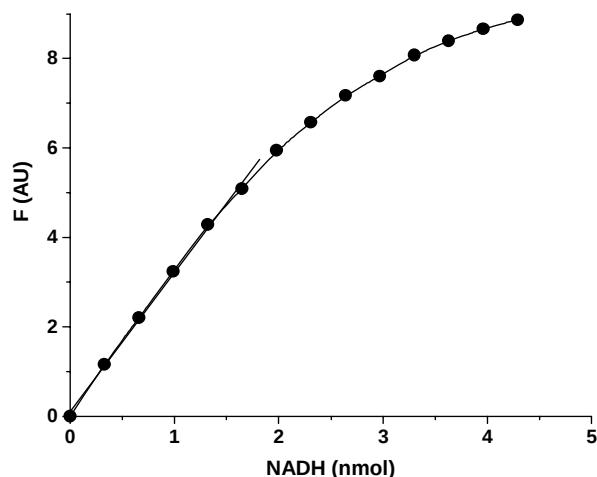


Figura 4. Curva de calibración de fluorescencia del NADH.

que en el paso limitante de la ALD, también interviene la liberación de la coenzima.

En resumen podemos concluir que el paso limitante de la PAD es la transferencia del hidruro (13). Este resultado es novedoso ya que para las enzimas tetraméricas se ha determinado que el paso limitante se encuentra después de la formación del NADH (6, 7). Por otra parte, el paso limitante de la reacción para la ALD parece estar influenciado por la desacilación y por la liberación de la coenzima (13). Es decir, tanto k_7 como k_9 son comparablemente bajos y limitantes. Este resultado también es novedoso, ya que se ha determinado que en las aldehído deshidrogenasas tetraméricas existe un solo paso limitante de la reacción (6, 7). La caracterización de estas ALDHs de *E. coli* con propiedades cinéticas *sui generis*, puede ser utilizada como base para el diseño de experimentos de mutagénesis sitio-dirigida, encaminados a determinar qué regula la actividad de las aldehído deshidrogenasas.

REFERENCIAS

1. Steinmetz CG, Xie P, Weiner H, Hurley TD (1997) Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* 5:701-11.
2. Liu ZJ, Sun YJ, Rose J, Chung YJ, Hsiao CD, Chang WR, Kuo I, Perozich J, Lindahl R, Hempel J, Wang BC (1997) The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD⁺ and the Rossmann fold. *Nat Struct Biol* 4:317-26.
3. Moore SA, Baker HM, Blythe TJ, Kitson KE, Kitson TM, Baker EN (1998) Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* 6:1541-51.
4. Weiner H, Hu JH, Sanny CG (1976) Rate-limiting steps for the esterase and dehydrogenase reaction catalyzed by horse liver aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* 251:3853-55.
5. MacGibbon AK, Buckey PD, Blackwell LF (1977) Evidence for two-step binding of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide to aldehyde dehydrogenase. *Biochem J* 165:455-62.
6. Wang XP, Weiner H (1995) Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 34:237-43.
7. Mann CJ, Weiner H (1999) Differences in the roles of conserved glutamic acid residues in the active site of human class 3 and class 2 aldehyde dehydrogenases. *Protein Sci* 8:1922-29.
8. Rout UK, Weiner H (1994) Involvement of serine 74 in the enzyme-coenzyme interaction of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* 33: 8955-61.
9. Ho KK, Allali-Hassani A, Hurley TD, Weiner H (2005) Differential effects of Mg²⁺ ions on the individual kinetic steps of human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Biochemistry* 44:8022-29.
10. Halton SP, Hill TK, Flavell MA, Stringfellow JM, Cooper RA (1997) 2-Phenylethylamine catabolism by *Escherichia coli* K-12: gene organization and expression. *Microbiology* 143: 513-18.
11. Ferrandez A, Prieto MA, Garcia JL, Diaz E (1997) Molecular characterization of PadA, a phenylacetaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 406:23-7.
12. Baldoma L, Aguilar J (1988) Metabolism of L-fucose and L-rhamnose in *Escherichia coli*: aerobic-anaerobic regulation of L-lactaldehyde dissimilation. *J Bacteriol* 170:416-21.
13. Rodriguez-Zavala JS, Hassani A, Weiner H (2006) Characterization of *E. coli* tetrameric aldehyde dehydrogenases with atypical properties compared to other aldehyde dehydrogenases. *Protein Sci.* En Prensa.