



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.**

**REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ACTIVIDAD DE
BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENSA POR EL ION K Y
SUS IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DESDE UNA
PERSPECTIVA ESTRUCTURA/FUNCIÓN**

Por:

César Muñoz Bacasehua

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Cesar Muñoz Bacasehua, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor Ciencias

Elisa M. Valenzuela S.

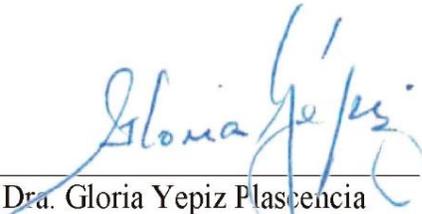
Dra. Elisa M. Valenzuela Soto
Directora de Tesis



Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez
Integrante del comité de tesis



Dr. Alonso Alexis López Zavala
Integrante del comité de tesis



Dra. Gloria Yepiz Plascencia
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Regulación de la Actividad de Betaína Aldehído Deshidrogenasa por el Ion K y sus Implicaciones Fisiológicas desde una Perspectiva Estructura/Función" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Cesar Muñoz Bacasehua, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para realizar mis estudios de doctorado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por permitirme ser parte de esta institución.

A la Dra. Elisa M Valenzuela Soto por todo el apoyo brindado durante mis estudios de posgrado, por toda la paciencia durante este proceso de formación académica, agradezco inmensamente el conocimiento que me transmitió durante estos 6 años transcurridos, las llamadas de atención que me ayudaron a forjarme como una mejor persona tanto en lo académico como en el ámbito personal agradezco la gran amistad que me brindo durante este tiempo.

Al Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez por el apoyo que me brindo en todo momento durante la realización de este proyecto, por su guía, consejos, y sobre todo la gran amistad

Al Dr. Alonso Alexis López Zavala por el apoyo, las asesorías constantes las grandes contribuciones y consejos invaluable para el desarrollo y culminación de este trabajo y su gran amistad.

A la Dra. Gloria Yepiz Plascencia por su gran entusiasmo e invaluable aportaciones en el desarrollo del proyecto, por formar parte del comité de aprobación de tesis y su amistad.

Al Dr. Aldo A. Arvizu Flores por adherirme como uno de sus estudiantes en su laboratorio, por la confianza y el gran apoyo académico que fueron indispensables en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Georgina Garza ramos de la facultad de medicina de la UNAM por facilitarnos sus instalaciones para el desarrollo de los experimentos de este trabajo.

A la Dra. Hisilia Ortega-Santacruz por sus conocimientos y asesorías en RMN, por el uso de sus instalaciones y su colaboración para el desarrollo de los experimentos de este trabajo.

A la Dra. Rosina Cabrera Ruiz por sus conocimientos, asesorías y el apoyo técnico brindado en el desarrollo de los experimentos de este trabajo.

A la M.C. Ciria Guadalupe Figueroa Soto, por apoyarme en la adecuada realización de este trabajo, por los consejos que fueron indispensables para la parte experimental del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Fernanda Delgado, Sergio Hernández, Abel Verdugo, Andrea Romero, Magally Hernández por la colaboración y apoyo en la parte experimental de este trabajo.

Por compartir conmigo esta experiencia en esta etapa de mi vida.

Al personal del de la coordinación de docencia de CIAD: Dra. Adriana Sañudo Barajas, Verónica Araiza, Argelia Marín, Laura García y Norma García. Por su dedicación, esfuerzo y atención en los trámites realizados. A Héctor Galindo, Alfonso Coronado y Aurora Vidal por la asesoría y su servicio de calidad en el uso de los medios digitales.

A toda mi familia por el apoyo incondicional en cada momento de mi vida, principalmente a mis padres César Muñoz Reyes y Carmen Bacasehua Guerrero, que cada día me inspiran a ser una mejor persona, que sin duda alguna son el mejor ejemplo de vida y agradezco a Dios me permitió tener. A mis hermanas, Asiraneth, Hazarith, Karem Elisama, Carmen Dalí, por su cariño y comprensión.

A mi esposa Karla Ortega Vidal, por acompañarme en esta importante etapa de nuestras vidas por todo el apoyo moral, por darme ánimo y cariño, por motivarme a seguir adelante cada día, ¡y ayudarme a superarme como una mejor persona cada día Gracias!

DEDICATORIA

Principalmente a Dios, que de él proviene la sabiduría el conocimiento y la inteligencia (Pr 2:6) por permitirme llegar con éxito a este momento en la realización de este proyecto, por darme las fuerzas para levantarme cada día y no desistir para cumplir mis metas.

A mis padres Cesar Muñoz Reyes y Carmela Bacasehua Guerrero, por darme la vida, y ser una importante fuente de buenos principios, son mi gran ejemplo vida, gracias por apoyarme y estar presentes en las decisiones más importantes de mi vida y estar siempre incondicionalmente a mi lado.

A mi esposa Karla Ortega Vidal. Porque cada logro y meta superada es también parte de tu éxito.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. SINOPSIS	13
1.1. Justificación.....	13
1.2. Antecedentes.....	14
1.2.1. Superfamilia de Aldehído Deshidrogenasas	14
1.2.2. Función de ALDHs.....	15
1.2.3. Características Estructurales de las ALDHs	16
1.2.4. Requerimiento de Cationes Monovalentes en ALDHs.....	17
1.2.5. Sitios de Unión para Cationes Monovalentes en ALDHs.....	18
1.2.6. Betaína Aldehído Deshidrogenasa.....	20
1.2.6.1. Localización subcelular.....	21
1.2.6.2. Especificidad por sustrato.	21
1.2.7. Características Cinéticas de BADHs	22
1.2.8. Características Estructurales	23
1.2.9. Sitio Activo	25
1.2.10. Requerimientos de K ⁺ en BADHs.....	26
1.2.11. Función Renal	26
1.2.11.1. Formación de orina diluida.	28
1.2.11.2. Formación de orina concentrada.	29
1.3. Hipótesis	30
1.4. Objetivo General.....	30
1.5. Objetivos Específicos	30
1.6. Sección Integradora del Trabajo.....	31
2. ROLE OF POTASSIUM LEVELS IN PKBADH HETEROGENEITY OF NAD⁺ BINDING SITE	35
3. SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF COENZYME BINDING TO BETAINE ALDEHYDE DEHYDROGENASE DEPENDENT OF POTASSIUM	46

CONTENIDO (continuación)

4. INTERACTION STUDIES OF THE PKBADH-NAD⁺-K⁺ COMPLEX REVEALS A NEW POSSIBLE MECHANISM BETWEEN POTASSIUM AND GLUTAMIC 254 OF PORCINE KIDNEY BETAINE ALDEHYDE DEHYDROGENASE RECOMBINANT	57
5. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE PKBADH EN CÉLULAS RENALES	76
6. CONCLUSION	79
7. RECOMENDACIONES	80
8. BIBLIOGRAFIA	81

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Modelos estructurales de los estados de oligomerización de BADHs.....	26
2	Componentes principales de la nefrona.....	30

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Parámetros cinéticos de BADHs de diferentes organismos.....	24

RESUMEN

En mamíferos, glicina betaína (GB) es el principal osmolito sintetizado y acumulado en las células renales; su síntesis es catalizada por la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) utilizando NAD^+ como coenzima. Estudios previos con la BADH de cerdo (pkBADH) sugieren que ésta presenta heterogeneidad de sitios activos y cambios conformacionales inducidos por potasio. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue demostrar que la unión del potasio a la betaína aldehído deshidrogenasa provoca cambios en el ordenamiento y/o en la flexibilidad de los aminoácidos implicados en la formación del complejo BADH- NAD^+ lo cual regula la catálisis enzimática. Se realizaron estudios de interacción y espectroscópicos de pkBADH en presencia y/o ausencia de NAD^+ y de KCl para analizar cambios en: 1) la afinidad de la enzima, 2) la flexibilidad y orientación de los aminoácidos del sitio de unión al NAD^+ , 3) la estructura secundaria y terciaria de pkBADH. Los resultados de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) mostraron que K^+ induce cambios en la entalpía y entropía de unión y en la constante de asociación (K_a) de pkBADH por NAD^+ sugiriendo la participación de un sistema de compensación de energías. Los estudios de dicroísmo circular (CD) mostraron que K^+ aumenta la termoestabilidad de la enzima y modifica el contenido de α -hélices 4 % y 13 % a 25 mM y 100 mM K^+ , respectivamente. Mediante modelación *in silico* se encontraron tres sitios de unión a K^+ en pkBADH. Los datos de fluorescencia evidenciaron cambios en la estructura terciaria y en la exposición de los triptófanos del sitio de unión del NAD^+ en función de la concentración de K^+ . El análisis de resonancia magnética nuclear (NMR) del complejo pkBADH- NAD^+ - K^+ mostró desplazamientos químicos de las señales correspondientes a la cisteína y al glutámico catalítico, indicando que la interacción del glutámico con el catión ocurre con el grupo COOH, formando glutamato (COO-K^+), lo cual estabiliza las cargas del entorno. El ensanchamiento de la señal de la cisteína catalítica indica rigidez de la estructura, consistente con las conformaciones posibles de la cisteína en el proceso catalítico. Los resultados indican que el K^+ modifica la afinidad con la que pkBADH une NAD^+ mediante un sistema de compensación de energía, que se traduce en pequeños movimientos de los aminoácidos del sitio de unión a NAD^+ y de los sitios de unión al K^+ . el potasio regula la actividad de la enzima en la médula renal manteniendo elevada síntesis de glicina betaína.

Palabras claves: Betaína aldehído deshidrogenasa, Cooperatividad, Glicina betaína, Osmorregulación, compensación entalpía/entropía

ABSTRACT

In mammals, glycine betaine (GB) is the main osmolyte synthesized and accumulated in kidney cells; its synthesis is catalyzed by betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) using NAD^+ as a coenzyme. Previous studies with porcine kidney (pkBADH) suggested that it presents heterogeneity of active sites and undergoes potassium-induced conformational changes. Therefore, this work aimed to demonstrate that the binding of the K ion to betaine aldehyde dehydrogenase causes changes in the ordering and/or flexibility of the residues involved the formation of BADH- NAD^+ complex, which regulates the enzymatic catalysis. Interaction and spectroscopic studies of pkBADH in the presence and/or absence of NAD^+ and KCl were performed to analyze changes in the enzyme's affinity, the flexibility and orientation of the amino acids of the NAD^+ binding site, and in the protein secondary and tertiary structure. The results of isothermal titration calorimetry (ITC) showed that K^+ induces changes in the enthalpy and entropy of binding and in the association constant (K_a) of pkBADH by NAD^+ , suggesting the participation of an energy compensation system. Circular dichroism data (DC) showed that K^+ increases the enzyme's thermostability and modifies the content of α -helix at 4 % and 13 % at 25 mM and 100 mM K^+ , respectively. In silico modeling exhibited three possible K^+ binding sites in the pkBADH. The fluorescence data showed changes in the pkBADH tertiary structure and changes in the exposure of tryptophan near the NAD^+ binding site. Nuclear magnetic resonance (NMR) analysis of the pkBADH- NAD^+ - K^+ complex showed a chemical shift of the signals corresponding to the catalytic glutamic acid indicating an interaction of glutamic with the K^+ the COOH group, forming glutamate (COO-K^+) and stabilizing the charges of the environment. The broadening of the catalytic cysteine signal indicates rigidity of the structure, consistent with the possible cysteine conformations during the catalytic process. The results suggest that K^+ modifies the pkBADH affinity by the NAD^+ through an energy compensation system that results in small movements of the amino acids of the NAD^+ binding site and the K^+ binding sites. Potassium regulates the enzyme activity in the renal medulla, maintaining a high synthesis of glycine betaine.

Keywords: Betaine aldehyde dehydrogenase, Cooperativity, Glycine betaine, Osmoregulation, enthalpy / entropy compensation

1. SINOPSIS

1.1. Justificación

La regulación de la actividad enzimática a nivel de la proteína ocurre mediante compartimentalización, interacciones alostéricas, modificaciones covalentes y por metales, a la fecha, la regulación por cationes monovalentes no ha sido estudiada a profundidad. Se ha descrito que en algunas enzimas como las piruvato cinasas durante la evolución y por procesos de selección natural sufrieron una mutación puntual, que cambió un residuo de lisina por glutámico, adquiriendo una dependencia evolutiva por el potasio, lo que dió como resultado un requerimiento estricto de este catión para el proceso de catálisis. En diversos estudios realizados en enzimas aldehído deshidrogenasas (ALDHs) se ha descrito la existencia de sitios de unión a cationes monovalentes. Por lo que se ha propuesto que, bajo condiciones fisiológicas el K^+ se une a esos sitios debido a que es el catión monovalente intracelular más abundante, su concentración oscila entre 75-120 mM. En ALDHs aún no se elucidado por completo la posible función del potasio en cuanto a estructura-función. Se ha propuesto que el K^+ puede ocasionar cambios conformacionales en regiones específicas, los cuales pueden alterar o modificar alguna de las etapas catalíticas de estas enzimas. La Betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) NAD^+ oxidoreductasas (EC 1.2.1.8) pertenece a la superfamilia de ALDHs, estas enzimas utilizan la nicotinamida adenina dinucleótido $NAD(P)^+$, como cofactor para catalizar la reacción de oxidación irreversible de betaína aldehído (BA) a su correspondiente ácido la glicina betaína (GB). En el ser humano la actividad de BADH se encuentra en músculo cardiaco, cerebro, hígado y riñón donde desempeña la función de sintetizar GB para contrarrestar las condiciones de hipertonicidad en la médula renal.

GB desempeña la función de osmoprotector de los componentes estructurales celulares resguardándolos de los efectos caotrópicos de la urea, además GB promueve la expresión de acuaporinas ayudando a regular el volumen celular. Por lo tanto, realizar estudios *in vitro* utilizando técnicas biofísicas y de interacción de la pKBADH en presencia y ausencia de K^+ y NAD^+ nos ayudaría a comprender y explicar a un nivel estructural los mecanismos de regulación y analizar los cambios en la flexibilidad y/o rigidez de los residuos involucrados en la formación del complejo

pkBADH-NAD⁺ y conocer cómo se lleva a cabo el proceso de regulación de la catálisis enzimática mediada por el ion K⁺.

1.2. Antecedentes

1.2.1. Superfamilia de Aldehído Deshidrogenasas

La superfamilia de aldehído deshidrogenasas (ALDHs) representa un grupo de enzimas relacionadas con el metabolismo de una gran variedad de aldehídos que son producto de diversos procesos fisiológicos, biológicos y farmacológicos a partir de precursores endógenos o exógenos (Vasiliou et al., 2000). A través de los años se estandarizó una nomenclatura sistematizada basada en la evolución divergente y la identidad de los residuos en las ALDHs. Para nombrar una proteína que pertenece a una familia de ALDHs en específico, debe presentar un 40% de homología con otra familia de ALDH. Con base a esta homología, dos genes que pertenecen a miembros de una misma subfamilia deben presentar un 60 % de identidad en su secuencia de aminoácidos y se espera que estén localizados en el mismo sitio sub-cromosómico. Para nombrarlas se toma como raíz la palabra ALDH que denota la superfamilia de aldehído deshidrogenasa y con un número arábigo se denota la familia y cuando es necesario, una letra denota la subfamilia seguido de un número arábigo denotando el gen individual con la subfamilia (Vasiliou et al., 1999).

La superfamilia de ALDHs consta de distintos genes, presentes y distribuidos en los genomas de diferentes reinos, por ejemplo, en el reino archaea hay 32 genes, 351 en eubacteria y 172 en eucariota. En el genoma humano hay 19 genes funcionales y 3 pseudogenes ya identificados.

La importancia de las ALDHs en el metabolismo, soporta la teoría que estas enzimas provienen de un gen ancestral común de unos 3000 millones de años (Sophos y Vasiliou, 2003; Vasiliou et al., 2004). La superfamilia de ALDHs se está expandiendo continuamente gracias al avance de la ciencia en el campo de la secuenciación de genomas, el descubrimiento de genes que codifican proteínas con actividad ALDH en los genomas de archaea, eubacteria y eucariota indican que las ALDH son importantes componentes del metabolismo en los organismos vivos.

Se ha demostrado que las ALDHs están distribuidas en diferentes regiones subcelulares, incluyendo el citosol, mitocondria, retículo endoplásmico y núcleo (Izaguirre et al., 1997). Hay isoenzimas que se encuentran en organelos diferentes, además del citosol, y poseen un péptido señal que les permite ser translocadas a diferentes regiones subcelulares específicas (Braun et al., 1987; Marchitti et al., 2008). La actividad de ALDH se expresa constitutivamente en tejidos de mamíferos encontrándose los niveles más altos en hígado, seguido por el riñón, útero y cerebro, esta actividad está dada por una o más de las isoenzimas de las ALDH (Izaguirre et al., 1997). En algunas células, la expresión y síntesis de ALDHs puede ser inducida por condiciones de estrés (Alnouti y Klaassen, 2007; Rice et al., 2008).

1.2.2. Función de ALDHs

El metabolismo celular y los diferentes procesos fisiológicos generan una gran diversidad de aldehídos endógenos, los cuales se forman durante el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, lípidos, aminas biogénicas, vitaminas y esteroides (Vasiliou et al., 2000). Adicionalmente, la biotransformación de muchos fármacos y agentes ambientales producen aldehídos, que son compuestos altamente reactivos que tienen efecto citotóxico, genotóxico, mutagénico y carcinogénico (Vasiliou et al., 2000).

La principal función de las ALDHs es la detoxificación de aldehídos, ya que catalizan la reacción de oxido-reducción de diferentes aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos utilizando NAD^+ o NADH como coenzima (Lindahl, 1992). La detoxificación de compuestos exógenos se realiza por la modificación química mediante la adición de un grupo hidroxilo o remoción de electrones para formar intermediarios más hidrosolubles que pueden ser excretados con mayor facilidad (Vasiliou et al., 2000). Por ejemplo, la adición de un hidroxilo por el citocromo p450 es la etapa inicial del metabolismo de diversos compuestos, que da como resultado un intermediario hidroxilado, que sirve como sustrato para las posteriores oxidaciones por diferentes oxidorreductasas tales como la alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasas (Koppaka et al., 2012).

1.2.3. Características Estructurales de las ALDHs

Entre las características estructurales que se destacan en todas las familias de ALDHs tetraméricas (Steinmetz et al., 1997; Moore et al., 1998; Lamb y Newcomer, 1999; Ahvazi et al., 2000; Cobessi et al., 2000) y diméricas (Liu et al., 1997) está su particular forma de plegarse que es estrictamente conservada (Johansson et al., 1998). En cada subunidad se pueden identificar tres dominios estructurales característicos: el dominio de unión a la coenzima en el extremo N-terminal, que está formado por una estructura α/β con un plegamiento tipo Rossmann; el dominio catalítico que está formado por 6 láminas β paralelas, donde al final de un túnel hidrofóbico se sitúan los residuos catalíticos; y el dominio de oligomerización que es una extensión del dominio de unión a la coenzima y está formado por 3 láminas β antiparalelas, lo que explica los efectos importantes que tiene la coenzima en el mantenimiento de la estructura cuaternaria y la comunicación entre subunidades en algunas ALDHs (Johansson et al., 1998; Wei et al., 2000).

Las enzimas ALDHs tetraméricas están conformadas por pares de dímeros. La interfaz de la subunidad dentro de un par de dímeros, es decir la interfaz monómero-monómero, es distinta de la que existe entre los dímeros. En la interfaz del monómero-monómero, hay 10 láminas beta-plegadas formadas por el dominio de oligomerización de una subunidad y el dominio catalítico de la otra subunidad. Además, se ha demostrado que el área de la superficie hidrofóbica entre los monómeros en las ALDH tetraméricas es mayor respecto a las de ALDH diméricas, lo que explica las diferencias en el estado de oligomerización de estas enzimas (Perez-Miller y Hurley, 2003).

En las secuencias de aminoácidos de las ALDHs estudiadas a la fecha se conoce que hay regiones altamente conservadas, que son de gran importancia para el funcionamiento de esta familia de enzimas. Respecto al sitio activo de las ALDHs, todas las ALDHs estudiadas presentan una cisteína altamente conservada en el sitio activo, la cual une al sustrato aldehído (Cobessi et al 1999; Perez-Miller y Hurley, 2003; Díaz-Sánchez et al., 2011; Muñoz-Clares et al., 2017). Los residuos conservados de ácido glutámico participan en la polarización del grupo carbonilo del sustrato aldehído y estabiliza los intermediarios de la reacción (Muñoz-Clares et al., 2010). Los residuos relacionados con el dominio de unión a la coenzima, como lisina (K192), glicina (G245 y G250), ácido glutámico (E245 y E399) y fenilalanina (F401) están estrictamente conservados. El enlace amida formado entre los residuos de leucina (L269) y glicina (G270) son componentes cruciales

para la catálisis (Gruez et al., 2004).

Otra región importante conservada en estas proteínas es la región conocida como la caja de residuos aromáticos, en las ALDHs de la familia 10 se conservan cuatro residuos importantes que son Y160, W167, W285 y W456. En las familias ALDHs 9, 25, 26 y 27 se presentan al menos tres de estos residuos equivalentes que forman la caja aromática y se conservan en todas las AMDHs secuenciadas a la fecha (Riveros-Rosas et al., 2013)

En un estudio realizado por Muñoz-Clares et al. (2011) sobre la arquitectura del sitio activo de las ALDHs se encontró evidencia de tres regiones vinculantes o "agujeros" formados por átomos de la proteína, que participan en la estabilización del sustrato, estas regiones desempeñan papeles críticos en la catálisis y dinámica del sitio activo. La primera región es llamada el agujero del oxianión y participan la cadena principal de la cisteína catalítica y la cadena lateral de la asparagina 169, la cual está involucrada en la unión y posicionamiento preciso del sustrato para que se lleve a cabo el ataque nucleofílico por la cisteína catalítica (Muñoz-Clares et al., 2011).

La segunda región identificada fue el agujero de la carboxiamida, que participa en el posicionamiento adecuado de la nicotinamida oxidada y está conformado por la cadena principal de la leucina 269 y la cadena principal del glutámico 268. Por último, la tercera región llamada el agujero del carboxilo, y participa en mantener la conformación interior del glutámico catalítico, el cual está formado por la cadena principal de fenilalanina 465 y por la cadena principal del glutámico 476 (Muñoz-Clares et al., 2011).

1.2.4. Requerimiento de Cationes Monovalentes en ALDHs

Se ha demostrado que hay algunos miembros de la superfamilia ALDH que requieren del ion potasio para ser activas, como por ejemplo la ALDH2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Black, 1951), la ALDH9 de *Pseudomonas sp.* (Von Tigerstrom y Razzell, 1968), la ALDH9 de *Pseudomonas aeruginosa* (Valenzuela-Soto et al., 2003). Estas enzimas no presentan actividad en ausencia del ion potasio, y se hipotetiza que el potasio induce cambios conformacionales en alguna de las etapas catalíticas o que induce cambios conformacionales que afectan la estructura nativa y por lo tanto la estabilidad de la estructura cuaternaria afectando la actividad de estas enzimas (González-Segura

et al., 2013). Estudios realizados por González-Segura et al. (2013), revelan que estos sitios de unión a cationes monovalentes pueden estar presentes en diferentes miembros de la superfamilia de las ALDHs. Sin embargo, aún se desconoce el potencial funcional de estos sitios y el papel que juegan estos iones en las enzimas que los presentan.

1.2.5. Sitios de Unión para Cationes Monovalentes en ALDHs

En algunos miembros de la familia de las ALDHs se han encontrado tres sitios principales de unión a cationes monovalentes que se han denominado sitio intra-subunidad, inter-subunidad, y el sitio de la cavidad central (González-Segura et al., 2009). En el estudio realizado por González-Segura et al. (2013), se describe el posible potencial funcional de los sitios de unión a cationes monovalentes y la frecuencia con la que pueden estar presentes en las ALDHs.

El sitio de unión intra-subunidad se ha encontrado en la mayoría de las estructuras cristalinas de las ALDHs estudiadas a excepción de la ALDH3. Se conoce que los residuos aminoácidos involucrados en coordinar al catión en el sitio intra-subunidad, son grupos de la cadena principal de los residuos de Q196, V39 y del D109, equivalentes a los residuos de la ALDH2 de humano (González-Segura et al., 2013). Aún y cuando los residuos equivalentes Q196 y V39 presentan alto grado de variación en diferentes ALDH, ellos son los que contribuyen a la coordinación del catión. Por otra parte, el residuo D109 está conservado en las familias ALDH9, ALDH10, ALDH25 y algunos miembros de las familias ALDH1 y ALDH23. El residuo Q196 es conservado en las familias ALDH5, ALDH6, ALDH7, y ALDH11 (González-Segura et al., 2013).

Con base a lo anterior, se ha propuesto que hay cuatro posibles impedimentos para que los miembros de las ALDHs presenten este sitio de unión intra-subunidad. El primero de ellos se relaciona con la sustitución del D109 por una N. El segundo impedimento es la conformación de la Q196 está alterada por algún residuo vecino que causa una conformación diferente en el espacio que lo hace no compatible para coordinar al catión. El tercer impedimento es cuando hay una cadena lateral de una arginina cargada positivamente, la cual causaría repulsión entre el ion y la cadena lateral de la arginina en la posición 346. En las estructuras cristalinas de la BADH de *P. aeruginosa* y la de espinaca, se muestran las distancias de coordinación entre el K^+ y los átomos

de la cadena principal de la proteína, que van de 2.7 a 3.5 Å, las distancias de coordinación son más cortas en las estructuras cristalinas donde se encuentran iones sodio en los sitios intra-subunidad que van de 2.2 a 3.4 Å (Gonzales-Segura et al., 2009; Diaz-Sánchez et al., 2012; González-Segura et al., 2013).

El sitio inter-subunidad es característico de enzimas tetraméricas como la BADH de *P. aeruginosa*, pero también puede estar presente en enzimas diméricas como la BADH de espinaca. El sitio inter-subunidad está localizado en la interfaz de una subunidad y la subunidad vecina, y está conformado por los grupos de la cadena principal de los residuos de K469, G472 y L262 equivalentes a los residuos de la ALDH2 de humano. González-Segura et al., (2013) propusieron que en varios miembros de la familia de las ALDH, se encuentran los sitios inter-subunidad debido a que presentan los residuos capaces de coordinar al catión con la geometría y las distancias de enlaces consistentes con dicha coordinación.

El tercer sitio de unión a cationes es el de la cavidad central, el cual parece ser característica única de enzimas con estructura tetramérica. La estructura cristalina de la BADH de *P. aeruginosa*, muestra los residuos involucrados en coordinar al catión en el sitio de la cavidad central, estos son: la cadena principal de los residuos de E124, E126 y E450 equivalentes a los residuos de la ALDH2 de humano (González-Segura et al., 2013). Estos residuos de glutámico están expuestos en la cavidad interna formada por las cuatro subunidades de la enzima, de este modo los residuos de glutámico están muy cercanos entre sí causando un potencial electrostático negativo que debe ser neutralizado para evitar la repulsión y choques estéricos entre ellos y que puede ser compensado por la unión de iones K^+ . Además, se ha propuesto la unión de cuatro iones K^+ a cada uno de los cuatro sitios, formados geoméricamente entre los monómeros de las subunidades ACD, BDC, DCA y DAB en la cavidad central de la proteína (González-Segura et al., 2009; González-Segura et al., 2013). Los residuos involucrados en la coordinación del K^+ al provenir de subunidades diferentes, formarían puentes de hidrogeno entre los tres monómeros y se puede inferir que los iones K^+ , juegan un papel importante en el manteamiento de la estructura cuaternaria de la enzima (González-Segura et al., 2013).

La estructura cristalina de la ALDH9 de *P. aeruginosa*, mostró iones K unidos en los sitios de unión intra-subunidad y además cuatro iones situados simétricamente en la interfase monómero/monómero de sus dos unidades diméricas (González-Segura et al., 2009). En ALDH9 bacterianas solo algunas pueden tener este sitio ya que varias presentan residuos de lisina o arginina

en la posición 479 que evitaría la unión del catión (González-Segura et al., 2013). Respecto a las ALDH9 de peces y anfibios, se propone que pueden presentar estos sitios dada la semejanza estructural con la ALDH9 de bacalao (González-Segura et al., 2013). Recientemente, se propuso el sitio teórico de unión a K^+ en la cavidad central de la BADH de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), perteneciente a la familia ALDH9 (Delgado-Gaytán et al., 2017).

En la estructura cristalina de la ALDH2 de humano, se encontraron iones sodio colocados en el interior de cada subunidad situados entre el dominio catalítico y el dominio de unión a la coenzima (Perez-Miller y Hurley, 2003). Igualmente, en la estructura cristalina de la ALDH10 de *Pisum sativum* se observaron iones sodio en el sitio de unión a cationes intra-subunidad (Tylichová et al., 2010).

1.2.6. Betaína Aldehído Deshidrogenasa

Las betaína aldehído deshidrogenasas (BADH NAD^+ oxidorreductasa EC 1.2.1.8) son enzimas que pertenecen a la superfamilia de las ALDHs. Estas enzimas utilizan la nicotinamida adenina dinucleótido $NAD(P)^+$, como cofactor para catalizar la reacción de oxidación irreversible de betaína aldehído (BA) a su correspondiente ácido la glicina betaína (GB) (Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto, 2008; Muñoz-Clares et al., 2009). La actividad de BADH se encontró por primera vez en hígado de rata, en donde se observó que había una actividad enzimática diferente a la de la colina oxidasa y tenía la capacidad para oxidar betaína aldehído (Klein y Handler, 1942). Desde 1942 en adelante, la actividad de BADH fue localizada en diferentes organismos, ya que esta enzima se caracteriza por encontrarse en la mayoría de los reinos de la naturaleza (planteé, animal, fungí, mónera); es una de las enzimas aldehído deshidrogenasas más ancestrales (Julian-Sanchez et al., 2007). Se ha demostrado que las BADHs estudiadas en diferentes organismos presentan características diferentes en cuanto a parámetros cinéticos, características bioquímicas, especificidad por sustrato, distribución subcelular, orden filogenético, función fisiológica y estado de oligomerización (Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto, 2008).

1.2.6.1. Localización subcelular. La BADH hepática de mamíferos se encuentra distribuida mayoritariamente en el citosol y alrededor del 7% en la mitocondria, con una única secuencia codificante para BADH en mamíferos, lo que sugiere que ambas isoenzimas son producto del mismo gen (Chern y Pietruszko, 1999; Pietruszko y Chern, 2001; Julián-Sánchez et al., 2007). En organismos marinos como la ostra, la enzima es mitocondrial pero sintetizada a partir de un gen nuclear (Perrino y Pierce, 2000). En plantas, la actividad de BADH se encuentra localizada principalmente en el estroma del cloroplasto, y alrededor de un 10% de su actividad total, es citosólica (Weretilnyk y Hanson, 1989).

Aun y cuando los genes que codifican las BADH de plantas también son nucleares, las secuencias de BADH encontradas en cloroplastos no presentan péptido señal para la importación al cloroplasto, se ha propuesto que los primeros 8 residuos en el extremo N-terminal pueden funcionar como péptido señal (Weretilnyk y Hanson, 1990). También se ha demostrado que la BADH se puede localizar en los peroxisomas de algunas plantas y se conoce que el péptido señal es una secuencia tripeptídica serina-lisina-leucina en el extremo carboxilo terminal que dirige a la proteína para ser importada al peroxisoma (Nakamura et al., 1997; Fujiwara et al., 2008).

1.2.6.2. Especificidad por sustrato. Las BADHs que se han estudiado a la fecha muestran que no son únicamente específicas para betaína aldehído, si no que tienen la capacidad de catalizar la reacción de diferentes aminoaldehídos con relación estructural, pero con menor eficiencia catalítica (Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto 1998). En relación con la especificidad por la coenzima, la mayoría de las BADHs de organismos procariotas y eucariotas que han sido caracterizadas bioquímicamente, muestran preferencia por el NAD^+ con la excepción de algunas enzimas bacterianas que tienen preferencia por el NADP^+ como la BADH de *Pseudomonas aeruginosa* y la BADH de *Xanthomonas translucens* (Nagasawa et al., 1976; Mori et al., 1992; Velasco-García et al., 2000). Gracias a estas características, las BADHs se relacionan y se integran con diferentes rutas metabólicas celulares esenciales. En mamíferos, la BADH está involucrada en varios procesos fisiológicos ya que participa en el catabolismo de poliaminas (Ambroziak y Pietruszko, 1991), en la síntesis del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (Lin et al., 1996), la biosíntesis de carnitina (Vaz et al., 2000) y la biosíntesis de glicina betaína (Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto, 2008).

1.2.7. Características Cinéticas de BADHs

A pesar de que se ha demostrado la importancia de las BADHs en diferentes organismos, son pocas las BADHs que se han caracterizado cinéticamente. La información generada a la fecha muestra que los parámetros cinéticos varían entre BADHs, por ejemplo, la K_m para la coenzima y para el sustrato betaína aldehído (BA) varía de 2 a 14 veces (Cuadro 1). Las BADHs de bacterias como la de *Arthrobacter globiformis* presenta un valor de K_m de 36 μM para BA y de 1035 μM para NAD^+ representando una K_m para BA 3.4 veces más baja y una K_m para NAD^+ 7.2 veces más alta que la BADH de *Bacillus subtilis*. Por otra parte, la BADH de *Xanthomonas translucens* presenta una mayor afinidad por la coenzima con una K_m para el NAD^+ 14 veces más baja y una K_m para BA 5.2 veces más alta que la BADH de *Arthrobacter globiformis* (Mori et al., 1992; Boch et al., 1997; Velasco-García et al., 2000; Oishi y Ebina, 2005).

En las BADHs de plantas la K_m para BA varía desde 10 veces más alta en la BADH de *Amaranthus hypochondriacus* con respecto a la BADH de *Avena sativa* y una K_m para NAD^+ 10 veces mas alta (Valenzuela-Soto y Munoz-Clares, 1993; Livingstone et al., 2003) (Cuadro 1). En cambio, en mamíferos, la BADH de *Homo sapiens* presenta una K_m de 140 μM para BA y de 4 μM para NAD^+ (Kurys et al., 1989), y la de *Sus scrofa* una K_m de 146 μM para BA y de 45 μM para NAD^+ , mostrando valores muy similares tanto para la coenzima como para el BA. (Figuroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000).

Cuadro 1. Parámetros cinéticos de BADHs de diferentes organismos

Fuente	k_m (μM)		
	BA	NAD^+	NADP^+
Organismo			
<i>A. globiformis</i>	36	1035	48
<i>B. subtilis</i>	125	143	1000
<i>X. translucens</i>	190	70	50
<i>P. aeruginosa</i>	435	385	83
Plantas			
<i>A. hypochodriacus</i>	56	40	2500
<i>A. sativa</i>	5	4.1	ND
Animales			
<i>H. sapiens</i>	140	4	ND
<i>R. norvegicus</i>	118	34	1630
<i>S. scrofa</i>	146	45	NA

ND= no determinada, NA= no activa.

A la fecha, se conocen 3 mecanismos cinéticos, el mecanismo ping-pong reportado para la BADH del hongo *Cylindrocarpon didymum*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Mori et al., 1980; Falkenberg y Strom, 1990; Boch et al., 1997); el mecanismo iso-bibi-ordenado para la BADH de *Amaranthus hypochondriacus* y de riñón de cerdo (Valenzuela-Soto y Munoz-Clares, 1993; Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000) y el mecanismo al azar para la BADH de *P. aeruginosa* (Velasco-García et al., 2000). Es difícil explicar las diferencias en el mecanismo cinético que presentan estas enzimas ya que el mecanismo ping-pong no es consistente con el mecanismo químico que debería seguir una cinética secuencial. Además, el mecanismo iso bi-bi ordenado que presentan las BADH de *A. hypochondriacus* y de riñón de cerdo son excepcionales y únicos ya que ninguna otra ALDH estudiada presenta esta característica (Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto, 2008).

El mecanismo iso bi-bi ordenado implica que existe un orden específico en la unión y la liberación de los ligandos, en el cual la coenzima (NAD^+) es el primer sustrato en unirse a la enzima formándose el complejo enzima- NAD^+ . Posteriormente se une el sustrato (BA), formándose el complejo ternario. El producto GB es liberado primero y finalmente la coenzima en su forma reducida (NADH). Para que la enzima una de nuevo a los sustratos, es necesario un paso de isomerización a la forma estable de la enzima para iniciar nuevamente el proceso de catálisis (Valenzuela-Soto y Munoz-Clares, 1993; Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000)

Algunos autores proponen que en el mecanismo iso bi bi ordenado, la coenzima al unirse a una subunidad aumenta o disminuye la afinidad por el ligando que se unirá en la siguiente subunidad, traducido como un proceso de cooperatividad positiva o negativa (Hurley et al., 2001; Weiner et al., 2001). Aun y cuando se conoce que las ALDHs siguen una cinética de Michaelis-Menten no se descarta la posible comunicación entre subunidades, una forma de cooperatividad negativa se ha demostrado en estudios de velocidad inicial de algunas ALDHs incluyendo BADHs de mamíferos (Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto, 2008).

1.2.8. Características Estructurales

Las BADHs que han sido estudiadas y caracterizadas, presentan un estado de oligomerización tetramérico y dimérico siendo los monómeros la forma inactiva de la enzima (Fig. 1). Mediante

estudios filogenéticos se ha clasificado a las BADHs, de acuerdo con su estado de oligomerización, las enzimas tetraméricas de animales y plantas pertenecen a la familia ALDH9, mientras que las enzimas dimericas de plantas y algunas bacterias pertenecen a la familia ALDH10 (Julian-Sanchez et al., 2007; Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto, 2008). La variabilidad de las BADHs en su estructura cuaternaria y en el tamaño de sus subunidades se debe a la gran diversidad de enzimas existentes en esta familia, sin embargo, son muy similares en el plegamiento (Julián-Sánchez, et al., 2007).

Al igual que en la gran mayoría de las ALDHs, las BADHs presentan tres dominios por subunidad: el de unión de la coenzima, el catalítico y el de oligomerización (Johansson, et al., 1998; González-Segura, et al., 2009; Díaz-Sánchez, et al., 2012; Halavaty et al., 2015). El tetrámero se forma de dos dímeros que interactúan en sus lados opuestos al sitio de unión de la coenzima. Ambos dominios de oligomerización del dímero forman puentes de hidrógeno con las partes correspondientes del dímero vecino. Entre los residuos de cisteína que se encuentran en el homotetrámero de BADH, hay cuatro conservados en cada subunidad: C288, C353, C377 y la C439 (Johansson et al., 1998).

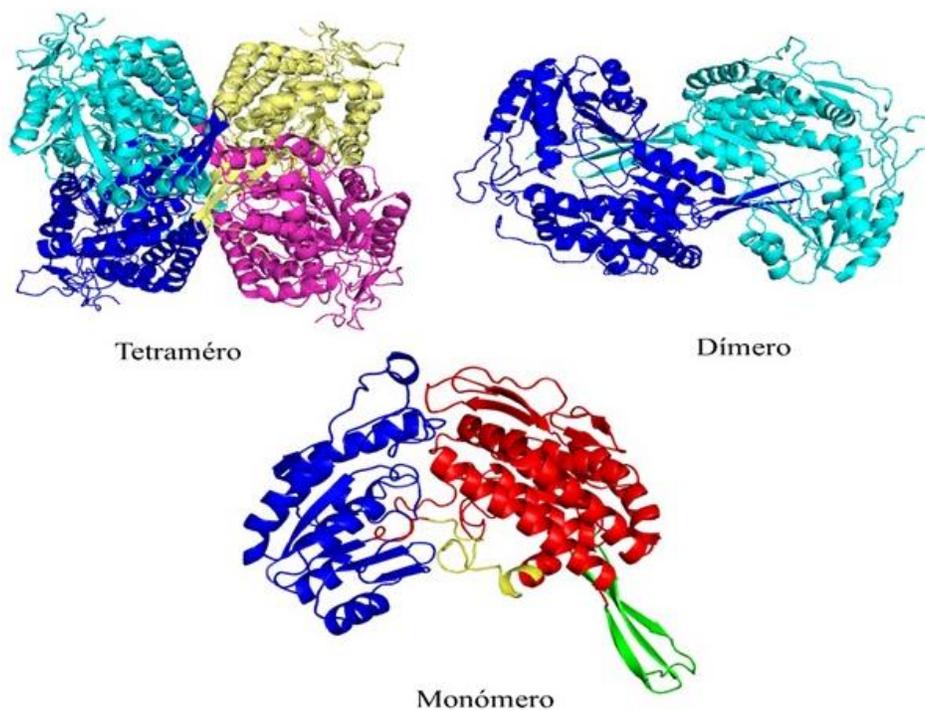


Figura 1. Modelos estructurales de los estados de oligomerización de BADHs. Monómero: Verde: dominio de oligomerización, Rojo dominio de unión a la coenzima, Azul dominio catalítico.

En un modelo tridimensional, puede observarse que la C439 está localizada en la interfase monómero–monómero de los pares diméricos (Johansson et al., 1998); lo cual resalta la importancia de este residuo para el mantenimiento de la estructura tetramérica. Además, en las secuencias de BADHs hay regiones conservadas que son importantes para mantener la estabilidad y conformación de la estructura cuaternaria. Los aminoácidos como el aspartato (D80, D147), serina (S82, S500), lisina (K498) y arginina (R84) están implicados en la estabilidad de los dímeros y tetrámeros (Gonzalez-Segura et al., 2005).

1.2.9. Sitio Activo

A la fecha se conocen las estructuras cristalinas de las BADHs de hígado de bacalao (Johansson et al., 1998), de *P. aeruginosa* (González-Segura., et al., 2009), espinaca (Díaz-Sánchez., et al., 2012), *Pisum sativum* (Tylichová et al., 2010), y de *Staphylococcus aureus* (Halavaty et al., 2015). La cristalización ha contribuido a determinar con mayor precisión la estructura de dichas proteínas y conocer las características relacionadas con el sitio activo de estas enzimas.

Todas las BADHs estudiadas poseen una cisteína altamente conservada en el sitio activo, la cual une al sustrato aldehído (Johansson, et al., 1998; González-Segura., et al., 2009; Díaz-Sánchez., et al., 2012; Halavaty et al., 2015). Así mismo, se han encontrado residuos conservados de ácido glutámico que participa en la polarización del grupo carbonilo del sustrato aldehído y estabiliza los intermediarios de la reacción (Muñoz-Clares et al., 2010). Los residuos relacionados con el dominio de unión a la coenzima, como lisina (K192), glicina (G245 y G250), ácido glutámico (E245 y E399) y fenilalanina (F401) están estrictamente conservados. El enlace amida formado entre los residuos de leucina (L269) y glicina (G270) son componentes cruciales para la catálisis (González-Segura et al., 2009; Gruez et al., 2004).

Mediante un análisis de la secuencia aminoacídica de la BADH de riñón de cerdo se encontró que los residuos conservados son: la cisteína catalítica C288, el glutámico E254 que participa en la polarización del grupo carbonilo de la betaína aldehído (y que estabiliza los intermediarios de la reacción), la asparagina N157 y la glicina G285. Los residuos relacionados con el dominio de unión a la coenzima, como lisina (K180), glicina (G232 y G256), ácido glutámico (E254 y E391) y

fenilalanina (F393) también están estrictamente conservados (Muñoz-Bacasehua et al., 2020).

1.2.10. Requerimientos de K⁺ en BADHs

Al ser el potasio el ion más abundante en las células, su metabolismo se relaciona ampliamente con las actividades celulares y la conservación de la excitabilidad de algunas células (Koeppen, 2018). La concentración intracelular de potasio es de alrededor de 120 mM y en el líquido extracelular entre 3.5 y 4.5 mM (Brown, 1986). Diversos autores han descrito el requerimiento de K⁺ como un potenciador de la actividad de algunas BADHs aun y cuando no son enzimas dependientes de este catión monovalente para ser activas. Hay evidencia de que en las BADH de *E. coli* (Falkenberg y Strom, 1990), amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994), cangrejo herradura (Dragolovich et al., 1994), *B. subtilis* (Boch et al., 1997) y de riñón de cerdo (Valenzuela-Soto et al., 2003), el potasio tiene un impacto directo sobre la estabilidad y el proceso de catálisis enzimática.

Datos experimentales de la BADH de *P. aeruginosa* en ausencia de potasio muestran que esta enzima pierde su actividad por completo en ausencia de K⁺, ya que el K⁺ causa cambios en la estructura terciaria y estos cambios son dependientes de la concentración del catión en el medio (Garza-Ramos et al., 2013; Valenzuela-Soto et al., 2003). Por otra parte, la BADH de riñón de cerdo en ausencia del ion K⁺ pierde su estructura cuaternaria y por tanto la forma activa de la enzima (Valenzuela-Soto et al., 2003). Se propone que el potasio ocasiona cambios conformacionales que se relacionan con alguna de las etapas catalíticas de estas enzimas y que además ayuda a mantener la estructura cuaternaria y por tanto la conformación adecuada para que la enzima sea estructuralmente funcional (González-Segura et al., 2013).

1.2.11. Función Renal

El riñón es un órgano par que se encuentra en la región retroperitoneal, entre la doceava vértebra

torácica y la tercera vértebra lumbar, en su aspecto normal asemeja a un frijol de gran tamaño, el riñón derecho se encuentra ubicado en una posición más baja al ser desplazado por el hígado, presenta una longitud de 12 ± 2 cm, una amplitud de 6 cm y un grosor de 3 cm y su peso normal en adulto es de 150-170 gramos (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011).

Los riñones tienen numerosas funciones, sin embargo, las más importantes son la eliminación de las sustancias de desecho del metabolismo, la regulación del volumen y la composición de los líquidos corporales que es la función crítica y decisiva para el mantenimiento de un ambiente estable para el buen funcionamiento de todas las actividades celulares (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011).

En el humano, la unidad funcional de los riñones es la nefrona, la cual se encarga de excretar las cantidades adecuadas de agua, electrolitos y productos de desecho (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011). Anatómicamente la nefrona está constituida, por el glomérulo que es un conjunto de capilares glomerulares a través del cual se filtran grandes cantidades del líquido de la sangre; y un largo túbulo en el que el líquido se filtra y se convierte en orina (Fig. 2). Desde el túbulo proximal el líquido fluye al interior del asa de Henle que se encuentra en el interior de la médula renal, cada asa está formada por un asa ascendente y una descendente las cuales por sus características delgadas en las paredes de la rama descendente y en el extremo inferior de la rama ascendente se le conoce como segmento delgado del asa de Henle. En la corteza renal el tubo del asa de Henle se vuelve grueso y se le llama segmento grueso del asa ascendente, al final de la cual se encuentra situada la macula densa, la cual participa en la regulación de la función de las nefronas (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011).

Pasando la mácula densa el líquido atraviesa al túbulo distal que también se encuentra en la corteza renal, pasando el túbulo distal se encuentran los túbulos de conexión y el túbulo colector cortical terminando en el conducto colector cortical, al final se unen entre 8 y 10 túbulos corticales para formar uno más grande denominado túbulo colector medular (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011). El proceso fundamental para la formación de orina es el resultado de la filtración glomerular, la reabsorción y la secreción tubular, mediante este proceso los riñones se encargan de excretar los solutos indeseables del metabolismo y regular el equilibrio hidroelectrolítico de acuerdo con las condiciones medioambientales en las que el individuo se encuentre (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011).

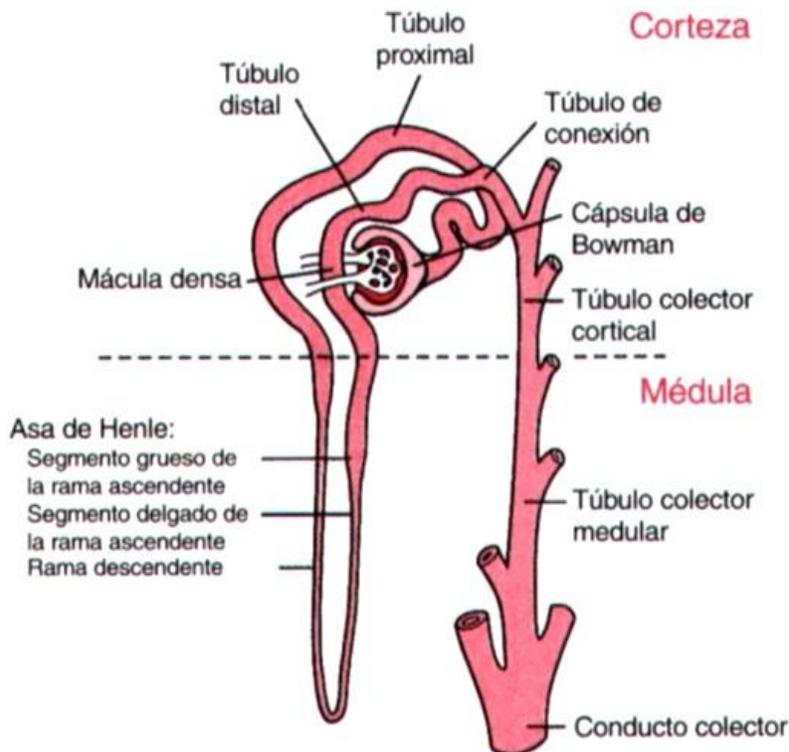


Figura 2. Componentes principales de la nefrona (Tomado de Guyton y Hall, 2006).

1.2.11.1 Formación de orina diluida. Cuando existe exceso de agua el riñón reabsorbe continuamente solutos mientras deja de absorber grandes cantidades de agua. Recién formado el filtrado glomerular presenta una osmolaridad similar a la del plasma 300 mOsm/L. El filtrado glomerular se diluye conforme avanza a lo largo de los túbulos, en el túbulo proximal los solutos y el agua se reabsorben en la misma proporción de tal forma que el líquido permanece siendo isosmótico con respecto al plasma. A medida que el líquido pasa por el asa de Henle descendente, el agua se reabsorbe por ósmosis y el líquido tubular alcanza el equilibrio con el líquido intersticial de la médula renal, el cual es muy hipertónico, por lo tanto, el líquido tubular aumenta su concentración a medida que se adentra al interior de la médula (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011). En el segmento grueso del asa de Henle se reabsorben rápidamente sodio, potasio y cloruro, pero el agua no se reabsorbe, esto hace que el líquido se vaya diluyendo a través del asa de Henle donde alcanza una osmolalidad de 100 mOsm/L al final del túbulo contorneado distal dando origen a la formación de orina diluida (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011).

1.2.11.2 Formación de orina concentrada. Se forma orina concentrada cuando: (1) aumenta la concentración de ADH, lo cual incrementa la permeabilidad del agua a los túbulos distales y colectores para que puedan reabsorber agua rápidamente; (2) existe una osmolaridad elevada del líquido intersticial medular renal, éste proporcione un gradiente osmótico adecuado para que se dé la reabsorción de agua a concentraciones elevadas de ADH (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011).

La osmolaridad del intersticio en todos los lugares del organismo es de alrededor de 300 mOsm/L que es similar a la del plasma. Sin embargo, la osmolaridad del líquido del intersticio de la médula renal es mayor por la acumulación excesiva de solutos, creando un ambiente hiperosmótico cuatro veces más concentrado que el plasma. La osmolalidad de líquido tubular en el asa de Henle aumenta hasta 500 mOsm/L mientras que la osmolaridad intersticial aumenta a 1400 mOsm/L ocasionado por el continuo bombeo de iones a todo lo largo del asa de Henle (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011). La elevada osmolaridad en el intersticio medular es consecuencia del transporte activo de sodio y el co-transporte de potasio, cloruro y otros iones desde el segmento grueso del asa de Henle.

El proceso de formación de orina provoca que las células de la médula renal se encuentren sometidas a estrés hídrico constante, debido a los grandes cambios en la tonicidad que se dan principalmente por el transporte activo de iones sodio, cotransporte de potasio y otros iones desde el segmento grueso del asa de Henle al espacio intersticial de la médula, y a las grandes cantidades de urea que provienen de los túbulos colectores hacia el mismo espacio intersticial (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011). Este acumulo de solutos influencia cambios en la forma y función de las células de la médula renal causando la pérdida de la turgencia celular (encogimiento) (Handler y Kwon, 1993).

Estos cambios constantes de tonicidad en las células de la médula renal, pudieran provocar efectos adversos en los principales componentes estructurales y funcionales de la célula ocasionando daños al ADN, causar inhibición de actividades enzimáticas esenciales, incluso puede llegar a limitar la comunicación celular (Kültz y Chakravarty, 2001; Brigotti et al., 2003). Sin embargo, para contrarrestar estos efectos negativos las células de la médula renal tienen mecanismos altamente finos y regulados. Por ejemplo, el aumento en la expresión y la síntesis de proteínas de respuesta a estrés, estas proteínas a su vez, llevan a cabo la síntesis de osmolitos orgánicos, metabólicamente neutros, ayudando a mantener las funciones celulares (Beck et al., 1988; Neuhofer y Beck, 2006; Burg et al., 2007; Burg y Ferraris, 2008). Los osmolitos sintetizados y acumulados en las células de la médula renal son glicerolfosforilcolina (GPC), mio-inositol, sorbitol y glicina betaína

(Neuhofer y Beck, 2006; Burg y Ferraris, 2008).

1.3. Hipótesis

La unión del K^+ a la betaína aldehído deshidrogenasa induce cambios en el ordenamiento y/o en la flexibilidad de los residuos implicados en la formación del complejo BADH-NAD⁺ lo cual regula la catálisis enzimática.

1.4. Objetivo General

Demostrar que la unión del ion K a la betaína aldehído deshidrogenasa provoca cambios en el ordenamiento y/o en la flexibilidad de los residuos implicados en la formación del complejo BADH-NAD⁺ lo cual regula la catálisis enzimática.

1.5. Objetivos Específicos

1. Evaluar cambios en la estabilidad de la pkBADH en presencia de concentraciones variables de K^+ .
2. Determinar la K_d para el NAD⁺ y el número de sitios de unión de K^+ en la pkBADH.
3. Determinar la flexibilidad de los aminoácidos implicados en la formación del complejo pkBADH-NAD⁺.
4. Proponer las implicaciones fisiológicas de la regulación de la pkBADH por K^+ a nivel estructural.

1.6. Sección Integradora del Trabajo

Los efectos reguladores del ion potasio en las células es diversa y compleja ya que participa en una gran variedad de procesos celulares, como la síntesis de proteínas y glucógeno, regulación del volumen celular, pH intracelular y la actividad de numerosas enzimas (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011; Blanco-Santos, 2019). Adicionalmente, la relación de K^+ intra y extracelular es el principal factor para crear el potencial de membrana que genera un potencial fundamental para la función neural y muscular. Son varios los procesos que regulan la entrada y salida de ion K a la célula y que ocasionan pequeñas variaciones en las concentraciones intracelulares que podrían regular la actividad de pkBADH (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011; Blanco-Santos, 2019).

La entrada de potasio a la célula es regulada por: cambios en la concentración de hormonas como la insulina, la aldosterona; condiciones patológicas como la alcalosis metabólica y algunos compuestos como los agonistas β_2 (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011). Por otra parte, los factores que regulan la salida de potasio de la célula son la alta hiperosmolaridad extracelular, lisis celular, condiciones como la acidosis metabólica y agonistas α (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011). Sin embargo, los mayores cambios en la concentración de K^+ están dados por la excreción renal regulados a su vez por factores como la aldosterona, flujo tubular distal y aporte distal de sodio, ingesta de K en la dieta, concentración de K plasmático, pH sistémico y la carga distal de aniones no reabsorbibles (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011).

A través de los años de estudio de la BADH de riñón de cerdo en nuestro grupo de trabajo, se ha avanzado en el conocimiento y la comprensión de las características cinéticas y bioquímicas de la pkBADH, así como también su estado de oligomerización y algunas características estructurales. Los estudios cinéticos realizados en pkBADH generaron interrogantes relacionadas con comportamientos extraños de la enzima en estudios *in vitro*, al ser una enzima que presenta una cinética micaliana, no se entendía por qué los resultados de los estudios arrojaban indicios de comportamientos alostéricos (Rosas-Rodríguez, 2010).

Estudios de modificación química con disulfiram, fármaco inhibidor de aldehído deshidrogenasas, encontraron cambios en la reactividad de los sitios activos de pkBADH inducidos por NAD^+ (Ayala-Castro et al., 2007). Adicionalmente, al evaluar cambios espectroscópicos mediante fluorescencia intrínseca de triptófanos se evidenció que la pkBADH presenta cooperatividad

negativa con respecto al NAD^+ , primer sustrato que se une a la enzima (Rosas-Rodríguez, 2010). El conjunto de resultados previos indicó que la pkBADH presenta cambios de transición a nivel del sitio de unión de la coenzima, que a concentraciones variables de NAD^+ son más evidentes. Con base en el conocimiento antes mencionado y a la propuesta de algunos autores respecto a que al unirse la coenzima a una subunidad, aumenta o disminuye la afinidad por el ligando que se unirá en la siguiente subunidad (Hurley et al., 2001; Weiner et al., 2001). Se hipotetizó que los cambios en la afinidad son el resultado de la modificación de la flexibilidad de los aminoácidos implicados en la formación del complejo enzima-sustrato; lo cual puede ser un sistema de regulación de la catálisis en algunas ALDH donde se ha encontrado evidencia de comunicación entre subunidades que conduce a un proceso de cooperatividad negativa o positiva.

Para abordar todas estas interrogantes planteadas y ampliar el conocimiento sobre la estructura-función de pkBADH se emplearon técnicas biofísicas que permiten estudiar las macromoléculas a un nivel atómico y estructural para entender cómo las macromoléculas cambian su conformación en eventos funcionalmente relevantes, y cómo las enzimas llevan a cabo el proceso catalítico y cómo son reguladas. Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue demostrar que la unión del ion K a la betaína aldehído deshidrogenasa provoca cambios en el ordenamiento y/o en la flexibilidad de los residuos implicados en la formación del complejo pkBADH- NAD^+ lo cual regula la catálisis enzimática.

El desarrollo de este trabajo se concluye con tres productos de investigación original, en los que quedan implícitos los objetivos específicos planteados en este trabajo para dar cumplimiento a la hipótesis y al objetivo general.

En el artículo 1 se presenta la investigación original publicada en el *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* [2020, 52, 61-70] titulado *Role of potassium levels in pkBADH heterogeneity of NAD^+ binding site*. El objetivo de este trabajo de investigación fue analizar si la concentración de potasio juega un papel en la heterogeneidad de los sitios activos de la pkBADH a través de cambios en la constante de afinidad del NAD^+ , cambios en la estructura secundaria y en la estabilidad. Se llevaron a cabo ensayos de titulación de la enzima con NAD^+ a concentraciones fijo-variables de KCl y la interacción se determinó mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Se evaluaron los cambios espectroscópicos mediante dicroísmo circular (DC) y se realizaron estudios de desnaturalización inducidos por temperatura.

Los resultados de ITC mostraron que la constante de afinidad del primer sitio de unión a NAD^+

aumentó de forma dependiente de la concentración de K^+ . Se obtuvieron los parámetros termodinámicos de la interacción donde los valores del ΔG para la unión del NAD^+ , se da de forma espontánea y que no es dependiente de la concentración de potasio, los valores de ΔH y ΔS muestran que la unión del NAD^+ al sitio activo es un proceso exotérmico y que se llevan a cabo a expensas de los cambios en la entropía de unión. Los resultados de DC mostraron que las concentraciones de potasio modifican la estructura secundaria de pkBADH con cambios más marcados en la estructura en forma de α -hélice y estos cambios son dependientes de la concentración de potasio evaluadas. Los datos de termoestabilidad demuestran que el potasio ayuda a mantener la estabilidad de la estructura frente a la temperatura.

Adicionalmente, se encontraron tres posibles sitios de unión a K^+ en pkBADH, el primer sitio de unión a K^+ intra-subunidad interactúa con N98, F32 y F184, formando parte de α -hélices ubicadas el sitio de unión a la coenzima. El segundo sitio de unión a K^+ inter-subunidad se encontró en una cavidad ubicada entre dos monómeros (que forman el dímero), formado por los residuos K461 subunidad A, G464 subunidad A y subunidad B I248. Un tercer sitio fue encontrado en la parte central de la proteína formada por los residuos E130 subunidad C, R471 y E454 subunidad D, demostrando que la unión del potasio a una de estas cavidades explica los cambios encontrados en la estructura secundaria y los cambios en la afinidad con la que pkBADH une al NAD^+ .

En el artículo 2 se presenta la investigación original aceptada para publicación en el Journal of Biological and Chemical Luminescence, titulado Spectroscopic analysis of coenzyme binding to betaine aldehyde dehydrogenase dependent of potassium. El objetivo de este trabajo fue analizar los cambios en la estructura secundaria y terciaria de pkBADH a concentraciones variables de NAD^+ y evaluar el papel que juega el K^+ . En este estudio se llevaron a cabo ensayos de fluorescencia intrínseca de triptófanos a concentraciones fijo-variables de K^+ y se llevó a cabo la titulación de pkBADH con NAD^+ . El análisis de los datos de fluorescencia evidenció cambios en el máximo de emisión y corrimientos hacia la región del rojo a medida que aumentaba la concentración de potasio en el medio, indicando cambios en la estructura terciaria. Además, mediante el análisis de Stern-Volmer se encontraron cambios en la exposición de los triptófanos cercanos al sitio de unión a la coenzima cuando se llevó a cabo la titulación de la enzima con NAD^+ en presencia de potasio. Adicionalmente, se encontró que en presencia de potasio el mecanismo de extinción del rendimiento cuántico de fluorescencia es un mecanismo estático y la formación del complejo pkBADH- NAD^+ se facilita en presencia de K^+ .

El análisis de los datos de DC mostró cambios en la estructura secundaria de pkBADH y la presencia de K^+ durante la unión de NAD^+ a pkBADH aumenta la estabilidad térmica del complejo. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el potasio facilita la formación del complejo pkBADH- NAD^+ y sugieren que la unión de K^+ a pkBADH provoca pequeños cambios a nivel del contenido de α -hélices y de la disposición en el espacio de los átomos de los triptófanos del sitio de unión del NAD^+ de la enzima; lo que puede influir sobre las conformaciones posibles en el sitio activo, ello puede estar modificando el microambiente del sitio de unión a la coenzima y que ésto a su vez facilite la formación del complejo enzima-sustrato.

Para concluir este trabajo en el artículo 3 se presenta una investigación original enviado a Biochemical Biophysical Research Communications titulado “Interaction studies of the pkBADH- NAD^+ - K^+ complex reveals a new possible mechanism between potassium and glutamic 254 of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase recombinant” El objetivo de este trabajo fue analizar el papel del potasio en la heterogeneidad de sitios activos de pkBADH y determinar cambios en la flexibilidad de los aminoácidos del sitio de unión a NAD^+ . Se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear de pkBADH en presencia y ausencia de NAD^+ y K^+ para determinar cambios en la flexibilidad de los aminoácidos del sitio de unión a la coenzima.

Los resultados muestran que durante la formación del complejo enzima sustrato en presencia de K^+ hay un desplazamiento químico de las señales correspondientes al glutámico catalítico que participa en la transferencia del H^+ en la reacción de oxidación del NAD^+ . Además, se encontró ensanchamiento de las señales características de la cisteína catalítica indicando mayor rigidez o menor grado de rotación de la estructura, que es consistente con las posibles conformaciones que puede adoptar la Cys-288 durante el proceso de catálisis. También, se encontraron cambios químicos en el ambiente que rodea el NAD^+ , confirmando la unión de éste en el sitio activo, localizado en la parte interna de la proteína. Mediante la modelación estructural *in silico* se encontraron cambios en la orientación de los residuos del sitio de unión a la coenzima en presencia y ausencia de NAD^+ de diferentes estructuras con alta homología estructural.

2. ROLE OF POTASSIUM LEVELS IN PKBADH HETEROGENEITY OF NAD⁺ BINDING SITE

¹César Muñoz-Bacasehua, ²Jesus A. Rosas-Rodríguez, ²Aldo A. Arvizu-Flores, ¹Elisa M. Valenzuela-Soto*

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Apartado Postal 1735, Hermosillo 83304, Sonora, México.

²Universidad de Sonora Unidad Regional Sur, Apartado Postal 85390, Navojoa, Sonora, México

³Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Apartado Postal 83000, Hermosillo, Sonora, México

* To whom correspondence should be addressed: E. M. Valenzuela-Soto E-mail: elisa@ciad.mx

Tel: +52 (662) 289-2400 ext. 518

Artículo publicado en el Journal of Bioenergetics and Biomembranes

[2020, 52, 61-70]

<https://doi.org/10.1007/s10863-020-09827-7>



Role of potassium levels in pkBADH heterogeneity of NAD⁺ binding site

César Muñoz-Bacasehua¹ · Jesus A. Rosas-Rodríguez² · Aldo A. Arvizu-Flores³ · Elisa M. Valenzuela-Soto¹

Received: 11 November 2019 / Accepted: 26 February 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) catalyzes the oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine using NAD⁺ as a coenzyme. Studies in porcine kidney BADH (pkBADH) suggested that the enzyme exhibits heterogeneity of active sites and undergoes potassium-induced conformational changes. This study aimed to analyze if potassium concentration plays a role in the heterogeneity of pkBADH active sites through changes in NAD⁺ affinity constants, in its secondary structure content and stability. The enzyme was titrated with NAD⁺ 1 mM at fixed-variable KCl concentration, and the interaction measured by Isothermal Titration Calorimetry (ITC) and Circular Dichroism (CD). ITC data showed that K⁺ increased the first active site affinity in a manner dependent on its concentration; K_D values to the first site were 14.4, 13.1, and 10.4 μM, at 25, 50, and 75 mM KCl. ΔG values showed that the coenzyme binding is a spontaneous reaction without changes between active sites or depending on KCl concentration. ΔH and TΔS_p values showed that NAD⁺ binding to the active site is an endothermic process and is carried out at the expense of changes in entropy. α-Helix content increased as KCl increased, enzyme (T_m)_{app} values were 2.6 °C and 3.3 °C higher at 20 mM and 200 mM K⁺. PkBADH molecular model showed three different interaction K⁺ sites. Results suggested K⁺ can interact with pkBADH and cause changes in the secondary structure, it provokes changes in the enzyme affinity by the coenzyme, and in the thermostability.

Keywords Active site reactivity · Conformational changes · Glycine betaine · Betaine aldehyde dehydrogenase · Molecular characterization

Introduction

The superfamily of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) represents an outstanding group of enzymes related to the metabolism of a large variety of aldehydes that are the product of several physiological, biological, and pharmacological processes (Vasiliou et al. 2000). The structural characteristic that stands out in all families of tetrameric and dimeric ALDHs is the particular form of folding that is strictly conserved (Liu et al. 1997; Steinmetz et al. 1997; Moore et al. 1998;

Johansson et al. 1998; Lamb and Newcomer 1999; Ahvazi et al. 2000; Cobessi et al. 2000).

In each subunit, three characteristic structural domains can be identified: the coenzyme binding domain at the N-terminus, which is formed by an α/β structure with a Rossmann-type folding; the catalytic domain that is formed by 6 parallel β sheets, where at the end of a hydrophobic tunnel the catalytic residues are located; the oligomerization domain is an extension of the coenzyme binding domain and consists of 3 anti-parallel β sheets, which explains the critical effects that the coenzyme has on the quaternary structure maintenance and the communication between subunits in some ALDHs (Johansson et al. 1998; Wei et al. 2000; González-Segura et al. 2009; Halavaty et al. 2015).

It has shown that some members of the ALDH superfamily require the potassium ion to be active, such as the ALDH2 of *Saccharomyces cerevisiae*, the ALDH9 of *Pseudomonas sp.*, the BADHs of *Pseudomonas aeruginosa* (*PaBADH*) and porcine kidney (pkBADH) (Black 1951; Von Tigerstrom and Razzell 1968; Velasco-García et al. 1999; Valenzuela-Soto et al. 2003). Besides, potassium increased *PaBADH*,

✉ Elisa M. Valenzuela-Soto
elisa@ciad.mx

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C, GE Astiazaran Rosas 46, 83304 Hermosillo, Sonora, Mexico

² Universidad de Sonora Unidad Regional Sur, Apartado Postal, 85380 Navojoa, Sonora, Mexico

³ Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de Sonora, Apartado Postal, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico

Spinacia oleracea BADH, and pkBADH thermal stability (Valenzuela-Soto et al. 2005; Garza-Ramos et al. 2013). Studies in pkBADH indicated that it requires monovalent cations at near-physiological concentrations to maintain its quaternary structure (Valenzuela-Soto et al. 2003). These results correlate with the physiology of renal tissue, where BADH must be active under high ionic strength conditions. The crystal structure of BADH from *P. aeruginosa* showed K⁺ ions bound at the intra-subunit binding sites and four ions symmetrically located at the monomer/monomer interface of its two dimeric units (González-Segura et al. 2009).

PkBADH, chemical modification studies, suggested that the enzyme pre-incubated with NAD⁺ exhibits half of the site's reactivity (Ayala-Castro et al. 2007), also, ITC studies revealed that the pkBADH-NAD⁺ complex formation requires potassium ions (Muñoz-Bacasehua et al. submitted). Mostly ALDHs and BADHs follow a Michaelis-Menten kinetics, however, inter-subunit communication is not unusual in these enzymes inasmuch as, half of the sites reactivity has been found in initial velocity studies in several of these enzymes (Wang and Weiner 1995; Weiner et al. 1976; Testore et al. 1999; González-Segura et al. 2002; Velasco-García et al. 2000; Muñoz-Clares et al. 2003; Stines-Chaumeil et al. 2006;), similarly, positive cooperativity in nucleotide-binding has also found in several mutated ALDHs (Wei et al. 2000; Wei and Weiner 2001; Hurley et al. 2001). In this work, the aim was to analyze the effect of K⁺ concentration on NAD⁺ binding affinity constants, changes in secondary structure, and in the thermal stability of pkBADH.

Materials and methods

Materials

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), dithiothreitol (DTT), 2-BME and HEPES were obtained from Sigma-Aldrich. All other chemicals used in this study were of analytical grade.

Over-expression and purification of pkBADH

Escherichia coli ER2566 cells were transformed with the recombinant plasmid pTXB1 and cells were grown in 1 L of LB broth containing 50 µg/mL of ampicillin. Expression of the protein was induced by adding to culture medium 0.4 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) and incubated for 4 h at 37 °C. The induced cells were harvested by centrifugation at 8000 RPM at 4 °C for 8 min. Recombinant enzyme was purified by affinity chromatography using a chitin matrix. The column was previously equilibrated with buffer A (20 mM Hepes-KOH, pH 7.9, 0.5 M KCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF), applying 10 volumes and a flow rate of 1 mL/min.

Later, the filtered supernatant was injected to the column with a flow rate of 0.5 mL/min and the unbound protein was eluted with 20 volumes of buffer A at a flow rate of 2 mL/min. The column was incubated with 50 mM DTT in buffer A, applying 3 volumes at a flow rate of 1 mL/min and incubated for 16 h at 23 °C. Finally, pkBADH was eluted with 25 mL of column buffer A at a flow rate of 1 mL/min, collecting fractions of 5 mL. The molar concentration of the enzyme was determined spectrophotometrically, using molar absorptivity values at 280 nm deduced from their amino acid sequence (<http://www.expasy.org/prosite/>).

Isothermal titration calorimetry

To characterize the interaction of pkBADH/NAD⁺, thermodynamic parameters were measured by standard ITC, using a MicroCal VP-ITC device (working volume 1.5 mL, shaking 307 rpm, 25 °C). All the solutions used were degassed before use and the experiment was carried out in duplicate. The enzyme was titrated with NAD⁺ under variable concentrations of KCl (20–75 mM); for each titration, 25 µM pkBADH was added to the cell and 15 at 30 successive injections of 7 µL of 1 mM NAD⁺ solution was applied at 5 min intervals. The enzyme and NAD⁺ were prepared in 100 mM HEPES-KOH buffer, pH 8.0. As a control experiment, the same operation was performed on a cell containing only buffer to evaluate and subtract the heat of dilution. The isothermal titration calorimetry data were analyzed using a sequential binding model (MicroCal Origin) to determine the apparent binding stoichiometry (N), the association/dissociation constants ($K_a = 1/K_D$) and the binding enthalpy (ΔH), the errors on the fitted parameters are all less than 10%. The change in Gibbs free-energy of binding (ΔG°) was calculated using the eq. 1, and the change in binding entropy binding ΔS° was calculated using eq. 2.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a \quad (1)$$

Where R is the gas constant, T is the absolute temperature, and K_a is the association constant.

$$\Delta S^\circ = \Delta H^\circ - \Delta G^\circ / T \quad (2)$$

Where ΔH° is the change in enthalpy, ΔG° is Gibbs energy of binding, and T is the absolute temperature.

CD spectroscopy

CD experiments were performed on a Chirascan™ Q100 CD spectropolarimeter, equipped with a Peltier temperature control system. Far-UV circular dichroism spectra of pkBADH (0.77 mg/mL) were recorded using quartz cuvettes of 0.1 cm optical path length. Two sets of far-UV CD spectra were recorded the first set at a wavelength of 200–260 nm for pkBADH in the absence of potassium and other from 200 to

260 nm in the presence of potassium. The potassium concentrations used were as follows BADH-K⁺ 25 mM, 50 mM, 100 mM, and 200 mM. The spectra were acquired at a scanning speed of 20 nm/min, the spectral bandwidth of 1 or 2 nm, and a response time of 4 s. Spectra were averaged over 5 scans to obtain the final spectra that were considered for the analysis, in addition the average spectrum of a reference sample without protein was subtracted. The observed ellipticities were converted to mean residue ellipticities $[\Theta]$ based on a mean molecular mass per residue of 109.1 for pkBADH, for the analysis of the secondary structure CD data obtained from λ 200–260 nm, they were estimated using deconvolution software CDSSTR (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/>) using reference data set: 4.

Thermal induced protein denaturation was monitored by following the changes in ellipticity at 222 nm by increasing the temperature from 20 to 90 °C at a constant rate of 1 °C/min. The melting temperature $(T_m)_{app}$ was determined by detecting the maximum of the first derivative of the mean residue ellipticities $[\Theta]$ after fitting experimental data with a polynomial function using the software OriginPro 8 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

pkBADH molecular modeling

The pkBADH structural model was obtained using Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0 software (Phyre2). The structure model of the pkBADH was elaborated

using the crystallographic structure of the BADH with highest identity value, deposited in the RCSB protein data bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). The structure models from cod liver (PDB entry 1BPW) and *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) (PDB entry 2WME), showed identity of 72% and 56%, respectively, with the pkBADH. The cod liver BADH was used for the pkBADH structure model (Johansson et al. 1998), and to identify possible monovalent cation binding sites, the pkBADH model obtained was superimposed on the structure of PaBADH (González-Segura et al. 2009). Models obtained were analyzed with the PyMOL 1.1 molecular visualization software (DeLano Scientific LLC).

Results and discussion

Effect of K⁺ concentration in pkBADH affinity by its coenzyme

A previous study demonstrated that pkBADH requires potassium to bind the substrate NAD⁺, the binding was carried out with 1 mM K⁺, and the results showed that the enzyme has different affinity constants for each NAD⁺ binding site (Muñoz-Bacasehua et al. 2019). Therefore, in the present study, variable concentrations of potassium were tested in the pkBADH-NAD⁺ complex formation to analyze if higher K⁺ concentrations modify the affinity of the enzyme for its substrate.

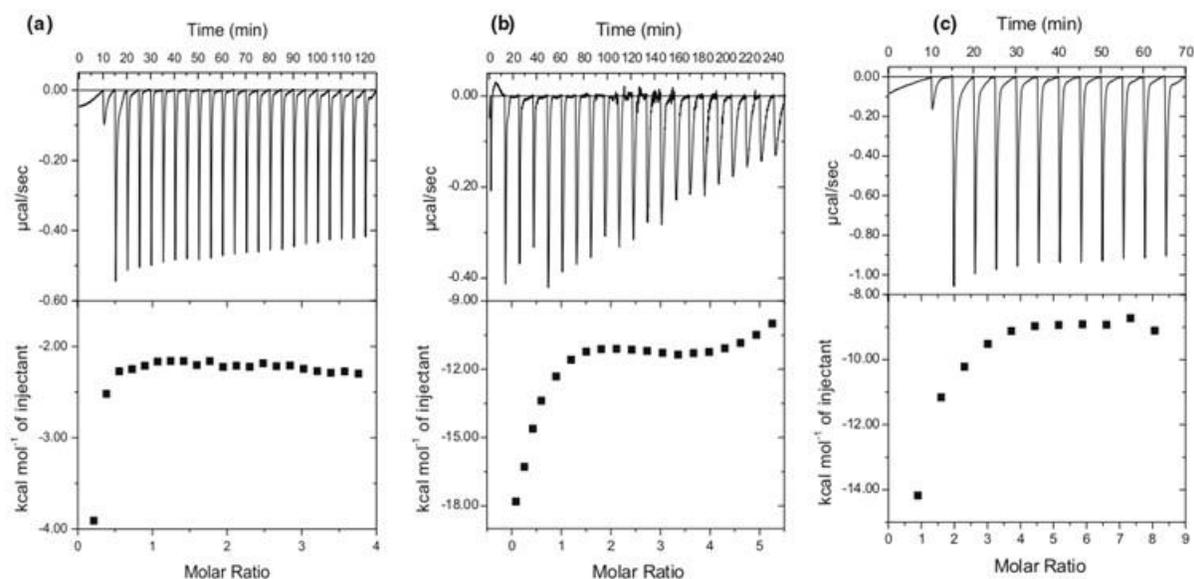


Fig. 1 Isothermal titration calorimetry analysis of pkBADH. Panel (a) 20 mM, (b) 50 mM, (c) 75 mM. The syringe contained 1 mM NAD⁺ in the same buffer. A total of 10 to 30 injections were made at 300 s intervals. The top panel show raw data of the heat pulses resulting from

each titration, whereas the bottom panels show the integrated heat normalized per mole of injectant as a function of the molar ratio (injectant concentration/enzyme tetramer concentration)

Table 1 Summary K_D and ΔG of ITC Data for pkBADH-NAD⁺-K⁺

N [*]	K_D (μ M)			ΔG (kcal mol ⁻¹)		
	K ⁺ 20 mM	K ⁺ 50 mM	K ⁺ 75 mM	K ⁺ 20 mM	K ⁺ 50 mM	K ⁺ 75 mM
1	14.4±0.95	13.1±1.02	10.4±1.12	-6.6	-6.6	-6.7
2	9.0±0.48	9.3±0.94	9.5±0.94	-6.8	-6.8	-6.8
3	8.2±0.43	7.8±1.03	7.2±0.73	-6.9	-6.9	-7.1
4	9.5±0.64	14.5±2.70	14.5±1.64	-6.8	-6.4	-6.6

The stoichiometry (*N) refers to binding of ligand per tetramer. All titration data were fitted to a sequential union model for 4 sites

ITC measurements at constant temperature and pressure were carried out in the presence of variable concentrations of potassium. As shown in Fig. 1 obtained thermograms exhibited similar characteristics; all titration curves exhibited downward peaks suggesting that the overall binding interactions were all exothermic. The fitting curves of the binding systems were all hyperbolic in shape suggested that in all were binding events, the heat quickly and then gently released following the NAD⁺ binding to pkBADH until NAD⁺ start to saturate the sites available in the enzyme (Fig. 1). The behavior of the curves suggests the fact that in all binding interactions, there was only one type of site that had the same accessibility to the NAD⁺, however differences were found between the dissociation constant for each NAD⁺ binding site.

The NAD⁺ binding data obtained fit to a sequential binding model for four sites, and it means that there are four independent and non-cooperative NAD⁺ binding sites. These results agree with the enzyme's kinetic mechanism, which is a sequential binding model (Figuroa-Soto and Valenzuela-Soto 2000), in which NAD⁺ is the first substrate that binds to the active site. Titration of the enzyme with 1 mM NAD⁺ in the presence of 20 mM, 50 mM, or 75 mM K⁺ showed that the enzyme has less affinity to bind the first molecule of NAD⁺, respect to the affinity of the second site (Table 1).

The enzyme affinity increased to the first site as potassium concentration increased, the K_D values for N₁ at 20 mM, 50 mM or 75 mM K⁺ were 14.4 μ M, 13.03 μ M, 10.38 μ M (respectively) (Table 1). The K_D values for N₂ at 20 mM, 50 mM or 75 mM K⁺ were 9 μ M, 9.3 μ M, 9.5 μ M

(respectively), whereas K_D values for N₃ at 20 mM, 50 mM or 75 mM were 8.2 μ M, 7.8 μ M, 7.2 μ M (respectively). Interestingly, in each concentration of potassium evaluated for site three, it can be seen how the affinity of the NAD⁺ increases facilitating interaction, but apparently NAD⁺ binding makes the interaction with the fourth site difficult, since the affinity of this site decreases, the K_D values for N₄ at 20 mM, 50 mM or 75 mM K⁺ were 9.5 μ M, 14.5 μ M, and 14.5 μ M (respectively) data show the heterogeneity of active sites and also prove that it is dependent on potassium concentration.

ITC data indicates that the affinity of the enzyme for NAD⁺ increases in the presence of K⁺, suggesting that K⁺ binding to the enzyme could cause conformational changes that induce the desolvation and the formation of hydrophobic interactions within the protein. As the concentration of K⁺ increases in the reaction cell, there is greater availability of ions to interact with the protein, increasing the pkBADH's affinity by the first NAD⁺ binding site. Binding sites two and three do not present considerable changes in their affinity for the NAD⁺. The possible explanation is that by forming the E-S complex, the following sites remain considerable unchanged since the protein atoms lose translational degrees of freedom, and there is also loss of conformational flexibility (Fox et al. 2018).

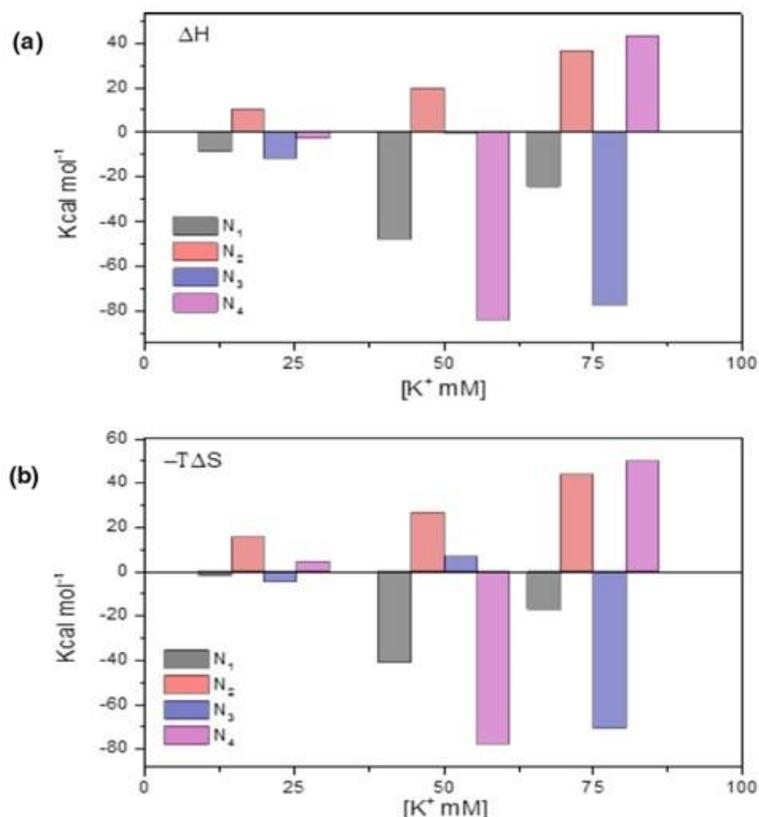
Changes in Gibbs free energy (ΔG) for the interaction at each of the sites, as well as the enthalpy (ΔH) of formation of the pkBADH-NAD⁺ complex, were obtained. The ΔG for all the sites, and each concentration of K⁺ evaluated had a negative value, indicating that the reaction is spontaneous (Table 1). ΔH values for sites one, three, and four indicate that the NAD⁺

Table 2 PkBADH ΔH and $T\Delta S$ values at variable K⁺ concentrations

N [*]	ΔH (Kcal mol ⁻¹)			$-T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)		
	K ⁺ 20 mM	K ⁺ 50 mM	K ⁺ 75 mM	K ⁺ 20 mM	K ⁺ 50 mM	K ⁺ 75 mM
1	-8.5	-47.5	-24.1	-1.93	41.3	-17.3
2	10.4	19.6	36.4	17.5	27	44
3	-11.5	-0.15	-77.3	-4.64	7	-71
4	-2.5	-83.7	43	4.4	-78	50

The stoichiometry (*N) refers to binding of ligand per tetramer. All titration data were fitted to a sequential union model for 4 sites. The errors on the fitted parameters listed in the table are all less than 10%

Fig. 2 Isothermal titration calorimetry (ITC) analysis of pkBADH. Panel (A) ΔH panel (B) $-T\Delta S$. The errors on the fitted parameters listed in the figure are all less than 10%



binding reaction was exothermic to those sites, while to the second site, the reaction was endothermic in the presence of 20 mM and 50 mM K⁺ (Table 2). At 75 mM K⁺, the ΔH values to sites one and three were negatives (exothermic process) and positive (endothermic process) to sites two and four (Table 2). The energy requirement of endothermic reactions seems to be being provided by entropy, as suggested by ΔS values (Table 2).

The analysis of the thermodynamic parameters obtained in the ITC indicates that pkBADH has sites with different affinity to bind to NAD⁺, which point to that pkBADH presents heterogeneity of sites. As shown in Table 1 when the concentration of the nucleotide is 1 mM, for each K⁺ concentration evaluated the affinity of the first site is low compared to that of the second or third site, but the entropy of that first site is lower than that of the second or third site (Table 2). In the different active sites of the enzyme, the entropic component was compensated by a favorable enthalpic change (Fig. 2 and Table 2). This enthalpy-entropy compensation is a phenomenon that occurs mainly in multimeric proteins during their ligands binding (Ferrante and Gorski 2012; Bezerra et al. 2017).

Increases or decreases in the entropic component for the formation of the E-S complex is related to protein conformational changes. On the other hand, the differences in affinity of

the active sites of multimeric enzymes have related to dynamic changes at the level of the secondary structure during the formation of the complex enzyme-substrate. For example, human liver glucokinase when joining to ATP exhibit

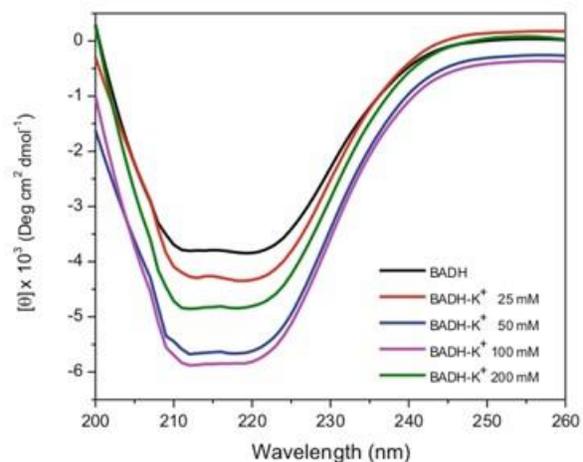


Fig. 3 Effects of K⁺ concentration on the secondary structure content of pkBADH. Far-UV CD spectra. BADH in absence of K⁺ (black line), BADH + K⁺: 25 mM (red line), 50 mM (blue line), 100 mM (magenta line), 200 mM (green line)

Table 3 Effect of K⁺ on secondary structure content of pkBADH

Condition	α -helix (%)	β -Sheet (%)	Turns (%)	Random Coil (%)
BADH	41	29	13	17
BADH + K ⁺ 25 mM	45	29	4	22
BADH + K ⁺ 50 mM	51	22	6	21
BADH + K ⁺ 100 mM	54	18	7	21
BADH + K ⁺ 200 mM	43	29	7	21

CD data obtained from λ 200–260 nm, estimated using deconvolution software CDSSTR (Dichroweb)

movements in small regions of the active site loop for ATP (Molnes et al. 2011).

In a previous study was found that the NAD⁺ binding to the enzyme causes an increase in the α -helix content and a decrease in the β -sheet content, the addition of 50 mM K⁺ decreased α -helix content and increased β -sheet content. However, in that study, assays without NAD⁺ were not included; in present work, the effect of K⁺ concentrations in the secondary content was analyzed.

pkBADH secondary structure content varying the potassium concentration

The mean residue ellipticities $[\Theta]$ value of pkBADH with 25 mM K⁺ showed a slight increase, whereas, at 50 mM and 100 mM K⁺, the value increased at double respect to the enzyme without K⁺ (Fig. 3). Besides, at 200 mM K⁺ values of $[\Theta]$ decreased concerning values obtained with 50 and 100 mM K⁺, but higher of that of the enzyme in the absence of K⁺ (Fig. 3). Changes in values of $[\Theta]$ indicate that K⁺-

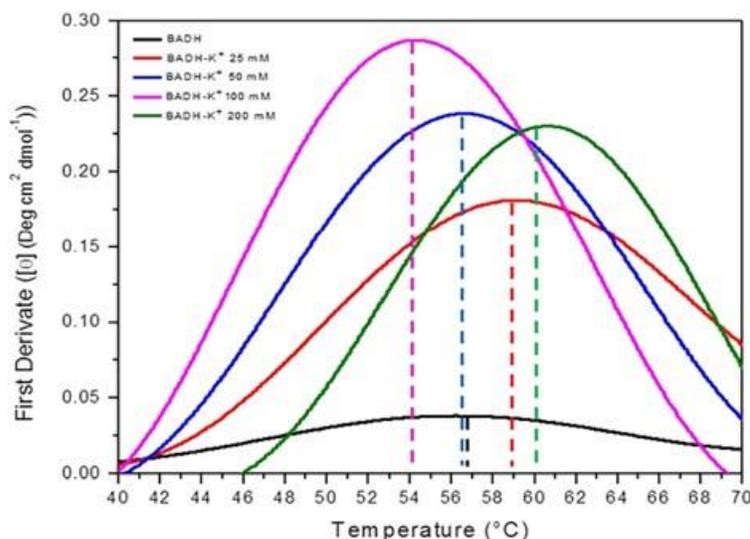
enzyme interaction is causing changes in the secondary structure.

The pkBADH α -helix content increased 4%, 10% and 13% at 25 mM, 50 mM and 100 mM K⁺ (respectively) (Table 3). Moreover, pkBADH plus 200 mM K⁺ α -helix content increased 2% respect to that of the enzyme in the absence of K⁺ (Table 3). The random coil content increased 5% at 25 mM K⁺ and 4% at all other K⁺ concentrations (Table 3). Changes in the pkBADH helical structure content come from changes in the turns content in the protein structure. Since there was a decrease of 9% in turns content at 25 mM K⁺ at higher concentrations, it decreased by 7% and 6% (Table 3). The disordered structure of the pkBADH shows an increase at 25 mM potassium, but the higher concentration does not cause changes (Table 3). The enzyme β -sheets content decreased 7% and 11% at 50 mM and 100 mM K⁺ (respectively); the other two concentrations did not show effect (Table 3).

Effect of potassium concentration on pkBADH thermal denaturation

To study the changes observed in the secondary structure of pkBADH, temperature-induced denaturation transitions were performed at 220 nm, to follow changes in α -helices. In all the tested conditions, the thermal denaturation was irreversible. The same experimental conditions were used to determine the mean denaturation temperature $(T_m)_{app}$ of pkBADH in the presence and absence of K⁺. A complete loss of the ellipticity signal and highly cooperative thermal transitions were observed in presence of K⁺ (data not shown). The first derivative analysis from pkBADH showed a peak with a $(T_m)_{app}$ value of 57.1 °C, the addition of 25 mM or 200 mM K⁺ increased the $(T_m)_{app}$ to 59.7 °C or 60.4 °C, respectively (Fig. 4).

Fig. 4 Effect of K⁺ concentration on pkBADH thermal denaturation. Heat-induced transitions of pkBADH samples (0.77 mg/ml) were determined by following the changes at 222 nm in the far-UV CD signal. BADH in the absence of K⁺ (black line), BADH-plus K⁺ 25 mM (red line), 50 mM (blue line), 100 mM (magenta line), 200 mM (green line)



While the addition of 50 mM K^+ did not affect the $(T_m)_{app}$ value (57 °C); conversely, the addition of 100 mM K^+ decreased $(T_m)_{app}$ value to 54.3 °C (Fig. 4).

These results indicate that the lowest and the highest concentrations of K^+ (25 mM and 200 mM) tested increased the thermal stability of pkBADH. Both potassium concentrations do not cause changes in β -sheets content; however, both K^+ concentrations caused changes in α -helix content (4% and 2%, respectively), turns content (9% and 6%, respectively) and in random coil content (5% and 4%, respectively). These changes in the secondary structure can be influencing the thermal stability of the enzyme. PkBADH thermal stability

results correlate with previous results in which 150 mM K^+ protected to the enzyme from inactivation at 40 °C and maintained its tetrameric active conformation (Valenzuela-Soto et al. 2003). On the other hand, the lack of effect at 50 mM K^+ in the $(T_m)_{app}$ value can be related to sizeable changes in secondary structure that 50 mM and 100 mM K^+ cause (Table 3).

Changes in β -sheets content of pkBADH could be inducing movements or increments in the flexibility of the coenzyme binding domain since in BADH from cod liver, *P. aeruginosa* and *B. subtilis* the catalytic domain is formed by 6 parallel β -sheets, that can be interacting with K^+ inducing

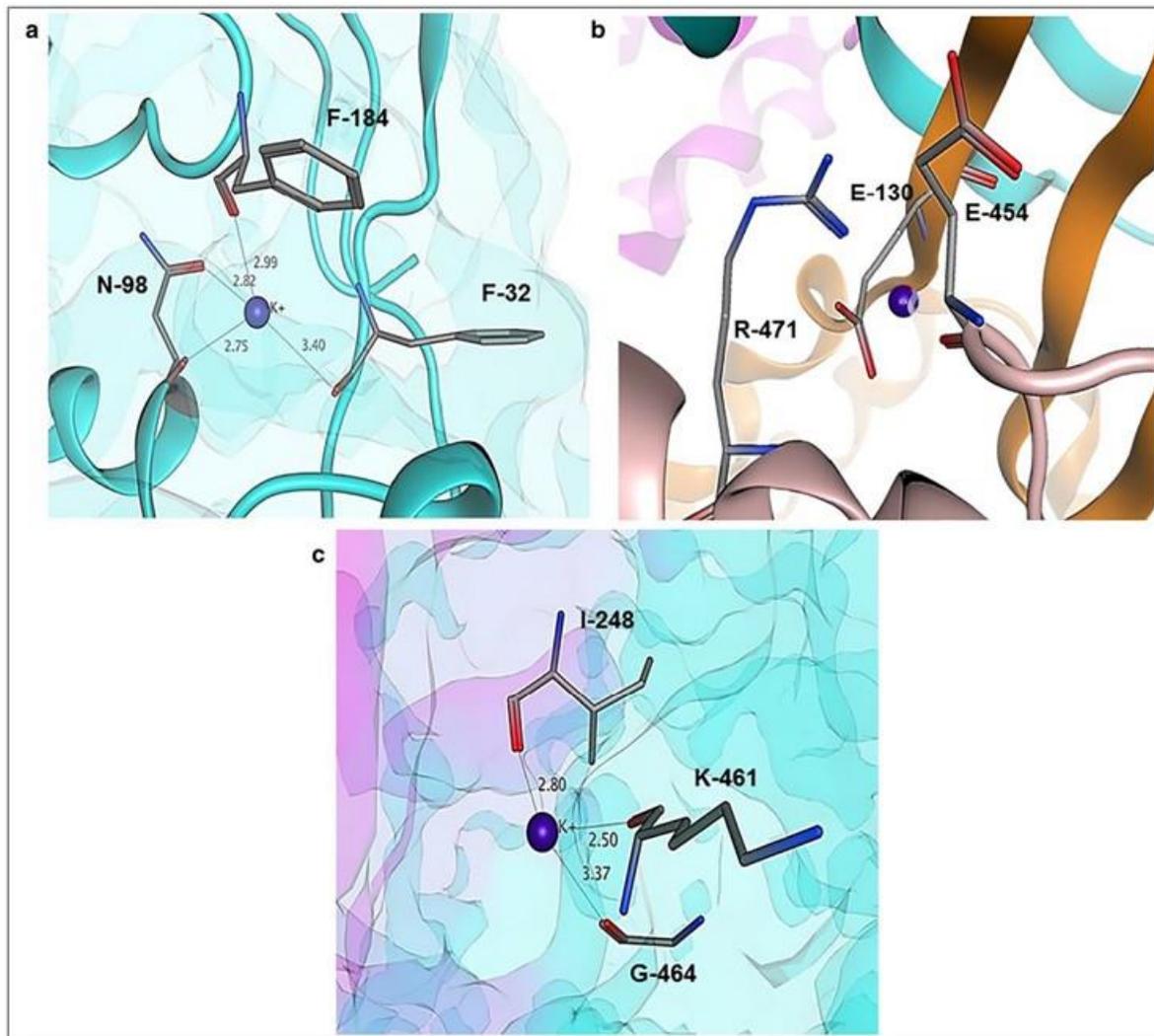


Fig. 5 Monovalent cation binding sites. pkBADH leading chains are shown as worm. K^+ ion is shown as a blue sphere. Panel (A) Intra-subunit monovalent cation binding site Panel (B) Central-cavity monovalent cation binding site Panel (C) Inter-subunit monovalent cation binding site.

pkBADH residues are indicated as sticks gray. Oxygen atoms are shown in red and nitrogen atoms in blue. Coordination distances between monovalent ion and pkBADH residues are indicated with black dashed lines. Distances are given in Ångstrom units

a reordering in the secondary structure of the pkBADH. To investigate K⁺ binding sites in the enzyme, like those found to PaBADH and white shrimp *Litopenaeus vannamei* BADH (LvBADH), a pkBADH molecular model was obtained (González-Segura et al. 2009, 2013; Delgado-Gaytán et al. 2017).

PkBADH molecular modeling

At the date, there is only three crystallographic structure of BADHs: cod liver BADH, PaBADH and *Staphylococcus aureus* BADH (SaBADH) (Johansson et al. 1998; González-Segura et al. 2013; Halavaty et al. 2015). The pkBADH structure was modeled with >90% confidence using the BADH sequence from cod liver as template, due to the high identity between them (Johansson et al. 1998). Overlap of the pkBADH model with the PaBADH structure was carried out to identify potential monovalent cation binding sites in pkBADH protein. As it found to PaBADH, three potential K⁺ binding sites were identified in PkBADH molecular modeling, in first K⁺ interacts with N-98, F-32, and F-184, all they part of α -helices located in the coenzyme binding domain in the monomer (Fig. 5A). In the second site, K⁺ potassium binding domain was identified in an inter-subunit cavity located between two monomers (forming the dimer), which is formed by the residues K-461 subunit A, G-464 subunit A and I-248 subunit B (Fig. 5B). A third site was found in the central part of the protein formed by the residues E-130 subunit C, R-471 subunit D, and E-454 subunit D (Fig. 5C).

PkBADH molecular modeling results agree with that found from crystallographic structure and molecular modeling of PaBADH and that of molecular modeling of white shrimp BADH (LvBADH), both enzymes showed three K⁺ binding sites: the intrasubunit cavity, the intersubunit cavity and the central cavity (González-Segura et al. 2009; González-Segura et al. 2013; Delgado-Gaytán et al. 2017). The K⁺ binding to one of that cavities explains the changes found in the secondary structure and explains the changes in the enzyme affinity for NAD⁺.

There are some studies about slight changes in the secondary structure of proteins when they bind to a specific ligand like its coenzyme or substrate analogs (Wei et al. 2000; Wang et al. 2016; Končítiková et al. 2019), however few of them are about changes caused by ions like potassium. In ALDHs has studied mainly changes induced by the coenzyme (NAD⁺/NADH) binding like that of human ALDH9A1 in which, a rearrangement of up to 30 Å° in the structure of the coenzyme binding domain after the nucleotide-binding was found, in the region comprising residues 232–256 of HsADLH9A1, that residues belong to the coenzyme domain and usually form the dimer interface in other known ALDH's (Končítiková et al. 2019). Structural rearrangements in proteins after the

binding of their ligands can be explained by the intrinsic conformational flexibility of the proteins, which determines the functionality and stereospecificity that characterize them.

Besides, secondary structure data correlates with previous studies which showed that pkBADH and *P. aeruginosa* requires monovalent cations for the maintenance of the quaternary structure and therefore the active form of the enzyme, as well as for its thermal stability, whereas in the BADH from spinach K⁺ only caused an increase in its thermal stability (Velasco-García et al. 1999; Valenzuela-Soto et al. 2003, 2005; Garza-Ramos et al. 2007, 2013). It has been proposed to PaBADH that K⁺ binding in the central cavity of the protein is contributing to maintain the thermal stability, because K⁺ avoid the electrostatic repulsion of two carboxylic groups close, Glu 124 from one subunit and Glu 126 of a neighbor subunit (Garza-Ramos et al. 2013). Since pkBADH molecular modeling, the central cavity was found, we proposed that the K⁺ effect on pkBADH thermal stability is the same proposed to PaBADH.

Conclusion

Data suggest that potassium ions concentration modifies the affinity of pkBADH for the NAD⁺ and enzyme thermostability because K⁺ interacts with the enzyme and causes changes in the content of secondary structure. The results in our work show that it is crucial to understand the mechanism by which potassium can act as a regulator of the function of BADH at the physiological level, since potassium levels and salt concentrations at the renal level are found in constant movement. Since some ALDHs also contain monovalent cation binding sites, it would be interesting to investigate whether potassium is modifying the enzyme's affinity for NAD and the physiological relevance of it. Additionally, these results help explain the heterogeneity of sites for NAD⁺ binding found in pkBADH kinetic studies (Ayala-Castro et al. 2007).

Acknowledgments César Muñoz-Bacasehua gratefully acknowledges a scholarship from CONACyT for graduate studies. Authors are grateful to Dr. G. Garza-Ramos for providing facilities and constant support to carry out CD spectra.

References

- Ahvazi B, Coulombe R, Delarge M, Vedadi M, Zhang L, Meighen E, Vrielink A (2000) Crystal structure of the NAD⁺-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity. *Biochem J* 349(3):853–861
- Ayala-Castro HG, Valenzuela-Soto EM, Figueroa-Soto CG, Munoz-Clares RA (2007) Complex, unusual conformational changes in kidney betaine aldehyde dehydrogenase suggested by chemical modification with disulfiram. *Arch Biochem Biophys* 468(2):167–173

- Bezerra GA, Ohara-Nemoto Y, Comaciu I, Fedosyuk S, Hoffmann G, Round A, Márquez JA, Nemoto TK, Djinić-Carugo K (2017) Bacterial protease uses distinct thermodynamic signatures for substrate recognition. *Sci Rep* 7(1):2848
- Black S (1951) Yeast aldehyde dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 34(1):86–97
- Cobessi D, Tête-Favier F, Marchal S, Branlant G, Aubry A (2000) Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J Mol Biol* 300(1):141–152
- Delgado-Gaytán MF, Rosas-Rodríguez JA, Yepiz-Plascencia G, Figueroa-Soto CG, Valenzuela-Soto EM (2017) Cloning and molecular characterization of the betaine aldehyde dehydrogenase involved in the biosynthesis of glycine betaine in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chem Biol Interact* 276:65–74
- Ferrante A, Gorski J (2012) Enthalpy–entropy compensation and cooperativity as thermodynamic epiphenomena of structural flexibility in ligand–receptor interactions. *J Mol Biol* 417(5):454–467
- Figueroa-Soto CG, Valenzuela-Soto EM (2000) Kinetic study of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 269:596–603
- Fox JM, Zhao M, Fink MJ, Kang K, Whitesides GM (2018) The molecular origin of enthalpy/entropy compensation in biomolecular recognition. *Annu Rev Biophys* 47:223–250
- Garza-Ramos G, Carrillo-Nava E, Costas M, Mújica-Jiménez C (2007) Thermal stability of Betaine aldehyde dehydrogenase. In: Weiner H, Plapp B, Lindahl R, Maser E (eds) *Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism 13*. Purdue University Press, West Lafayette, pp 64–76
- Garza-Ramos G, Mújica-Jiménez C, Muñoz-Clares RA (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
- González-Segura L, Velasco-García R, Muñoz-Clares RA (2002) Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* 361(3):577–585
- González-Segura L, Rudiño-Piñera E, Muñoz-Clares RA, Horjales E (2009) The crystal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* provides new insight into the reaction mechanism and shows a novel binding mode of the 2'-phosphate of NADP⁺ and a novel cation binding site. *J Mol Biol* 385(2):542–557
- González-Segura L, Riveros-Rosas H, Díaz-Sánchez ÁG, Julián-Sánchez A, Muñoz-Clares RA (2013) Potential monovalent cation-binding sites in aldehyde dehydrogenases. *Chem Biol Interact* 202(1):41–50
- Halavaty AS, Rich RL, Chen C, Joo JC, Minasov G, Dubrovskaya I, et al (2015) Structural and functional analysis of betaine aldehyde dehydrogenase from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 71(5):1159–1175
- Hurley TD, Perez-Miller S, Breen H (2001) Order and disorder in mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Chem Biol Interact* 130:3–14
- Johansson K, Ramaswamy S, Eklund H, El-Ahmad M, Hjelmqvist L, Jönvall H (1998) Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci* 7(10):2106–2117
- Končítiková R, Vigouroux A, Kopečná M, Šebela M, Moréra S, Kopečný (2019) Kinetic and structural analysis of human ALDH9A1. *Biosci Rep:BSR20190558*
- Lamb AL, Newcomer ME (1999) The structure of retinal dehydrogenase type II at 2.7 Å resolution: implications for retinal specificity. *Biochemistry* 38(19):6003–6011
- Liu ZJ, Sun YJ, Rose J, Chung YJ, Hsiao CD, Chang WR, Kuo I, Perozich J, Lindahl R, Hempel J (1997) The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD⁺ and the Rossmann fold. *Nat Struct Mol Biol* 4(4):317–326
- Molnes J, Teigen K, Aukrust I, Bjørkhaug L, Søvik O, Flatmark T, Njølstad PR (2011) Binding of ATP at the active site of human pancreatic glucokinase–nucleotide-induced conformational changes with possible implications for its kinetic cooperativity. *FEBS J* 278(13):2372–2386
- 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 I aldehyde dehydrogenases. *Structure* 6(12):1541–1551
- Muñoz-Bacasehua C, Rosas-Rodríguez JA, Arvizu-Flores AA, Stephens-Camacho A, Soñanez-Organis JG, Figueroa-Soto CG and Valenzuela-Soto EM (2019) Heterogeneity of active sites in porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase is modulated by potassium. *J Mol Recognit* (Submitted)
- Muñoz-Clares RA, González-Segura L, Mújica-Jiménez C, Contreras-Díaz L (2003) Ligand-induced conformational changes of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves affecting the reactivity of the catalytic thiol. *Chem Biol Interact* 143:129–137
- Steinmetz CG, Xie P, Weiner H, Hurley TD (1997) Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* 5(5):701–711
- Stines-Chaumeil C, Talfournier F, Branlant G (2006) Mechanistic characterization of the MSDH (methylmalonate semialdehyde dehydrogenase) from *Bacillus subtilis*. *Biochem J* 395(1):107–115
- Testore G, Cravanzola C, Bedino S (1999) Aldehyde dehydrogenase from rat intestinal mucosa: purification and characterization of an isozyme with high affinity for γ -aminobutyraldehyde. *Int J Biochem Cell Biol* 31(7):777–786
- Valenzuela-Soto EM, Velasco-García R, Mújica-Jiménez C, Muñoz-Clares RA (2003) Monovalent cations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidney and amaranth leaves. *Chem Biol Interact* 143:139–148
- Valenzuela-Soto EM, Ayala-Castro H, Muñoz-Clares R, Maser E, Plapp B, Lindahl R, Weiner H (2005) Effects of monovalent and divalent cations on the thermostability of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. In: Weiner H, Plapp B, Lindahl R, Maser E (eds) *Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism 12*. Purdue University Press, West Lafayette, pp 104–109
- Vasilio V, Pappa A, Petersen DR (2000) Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem Biol Interact* 129(1):1–19
- Velasco-García R, Mújica-Jiménez C, Mendoza-Hernández G, Muñoz-Clares RA (1999) Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181(4):1292–1300
- Velasco-García R, González-Segura L y Muñoz-Clares RA (2000) Steady-state kinetic mechanism of the NADP⁺- and NAD⁺-dependent reactions catalysed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* 352(3):675–683
- Von Tigerstrom RG, Razzell W (1968) Aldehyde dehydrogenase I. purification and properties of the enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 243(10):2691–2702
- Wang X, Weiner H (1995) Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 34(1):237–243
- Wang Y, Zhu M, Liu F, Wu X, Pan D, Liu J, Fan S, Wang Z, Tang J, Na R (2016) Comparative studies of interactions between fluorodihydroquinazolin derivatives and human serum albumin with fluorescence spectroscopy. *Molecules* 21(10):1373
- Wei B, Weiner H (2001) Making an oriental equivalent of the yeast cytosolic aldehyde dehydrogenase as well as making one with positive cooperativity in coenzyme binding by mutations of

- glutamate 492 and arginine 480. *Chem Biol Interact* 130:173–179
- Wei B, Ni L, Hurley TD, Weiner H (2000) Cooperativity in nicotinamide adenine dinucleotide binding induced by mutations of arginine 475 located at the subunit interface in the human liver mitochondrial class 2 aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* 39(18):5295–5302
- Weiner H, Hu J, Sanny CG (1976) Rate-limiting steps for the esterase and dehydrogenase reaction catalyzed by horse liver aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* 251(13):3853–3855

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3. SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF COENZYME BINDING TO BETAINE ALDEHYDE DEHYDROGENASE DEPENDENT OF POTASSIUM

^a César Muñoz-Bacasehua, ^bJesus A. Rosas-Rodríguez, ^cAlexis Alonso López-Zavala, ^a Elisa M. Valenzuela-Soto*

^a Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo 83304, Sonora, México.

^b Departamento de Ciencias Químico-Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora Unidad Regional Sur, Navojoa 85880, Sonora, México

^c Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo 83000, Sonora, México

* To whom correspondence should be addressed: E. M. Valenzuela-Soto, E-mail: elisa@ciad.mx
Tel: +52 (662) 289-2400 ext. 518. Fax: +52 (662) 280-0381

Artículo publicado en Luminescence, The Journal of Biological and Chemical Luminescence
<https://doi.org/10.1002/bio.4115>

Spectroscopic analysis of coenzyme binding to betaine aldehyde dehydrogenase dependent on potassium

César Muñoz-Bacasehua¹ | Jesús A. Rosas-Rodríguez² |
Alexis Alonso López-Zavala³ | Elisa M. Valenzuela-Soto¹ 

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C, Hermosillo, Sonora, Mexico

²Departamento de Ciencias Químico-Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora Unidad Regional Sur, Navojoa, Sonora, Mexico

³Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico

Correspondence

Elisa M. Valenzuela-Soto, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo 83304, Sonora, Mexico, ext. 518.

Email: elisa@ciad.mx

Abstract

Glycine betaine is the main osmolyte synthesized and accumulated in mammalian renal cells. Glycine betaine synthesis is catalyzed by the enzyme betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) using NAD^+ as the coenzyme. Previous studies have shown that porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase (pkBADH) binds NAD^+ with different affinities at each active site and that the binding is K^+ dependent. The objective of this work was to analyze the changes in the pkBADH secondary and tertiary structure resulting from variable concentrations of NAD^+ and the role played by K^+ . Intrinsic fluorescence studies were carried out at fixed-variable concentrations of K^+ and titrating the enzyme with varying concentrations of NAD^+ . Fluorescence analysis showed a shift of the maximum emission towards red as the concentration of K^+ was increased. Changes in the exposure of tryptophan located near the NAD^+ binding site were found when the enzyme was titrated with NAD^+ in the presence of potassium. Fluorescence data analysis showed that the K^+ presence promoted static quenching that facilitated the pkBADH- NAD^+ complex formation. DC data analysis showed that binding of K^+ to the enzyme caused changes in the α -helix content of 4% and 12% in the presence of 25 mM and 100 mM K^+ , respectively. The presence of K^+ during NAD^+ binding to pkBADH increased the thermal stability of the complex. These results indicated that K^+ facilitated the pkBADH- NAD^+ complex formation and suggested that K^+ caused small changes in secondary and tertiary structures that could influence the active site conformation.

KEYWORDS

betaine aldehyde dehydrogenase, coenzyme binding, negative cooperativity, protein structure model

1 | INTRODUCTION

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, EC 1.2.1.8 betaine aldehyde: NAD^+ oxidoreductase) belongs to the aldehyde dehydrogenase class 9 family (ALDH9).^[1,2] BADH catalyzes the irreversible NAD(P)^+ -dependent oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine (GB). GB is a crucial osmolyte and osmoprotectant in prokaryotic and eukaryotic organisms. pkBADH is a homotetramer of 232 kDa^[3,4]

formed by two pairs of dimers. It presents typical folding observed in all known ALDHs structures with three domains: coenzyme binding, oligomerization, and catalytic domains. The enzyme contains the conserved catalytic residues C288, G285, N157, and E254; and the decapeptide involved in NAD binding VTLEGGKSP that is highly conserved in ALDHs and all BADHs currently known.^[5]

pkBADH follows an iso bi-bi ordered mechanism^[6] in which NAD^+ is the first substrate to bind to pkBADH and NADH is the

last product released. An isomechanism has also been found in amaranth BADH.^[6,7] pkBADH kinetic analysis showed that NADH is a mixed inhibitor of the enzyme compared with being a competitive inhibitor as expected, given the ordered nature of the mechanism.^[1,6-8] After NADH release, the enzyme cannot start a new catalytic cycle, possibly because of the catalytic residue protonation state.^[6,7]

Previous studies on chemical modification of pkBADH by disulfiram suggested that the enzyme exhibited a half-of-the-sites reactivity.^[9] A recent study published by our group found that NAD⁺ binding to the first active site of pkBADH decreased the affinity of the coenzyme for the second active site, whereas the potassium presence increased the affinity to each active site.^[10] Similarly, NAD⁺ binding to pkBADH provoked changes in the pkBADH secondary structure content and thermal stability; however, those changes were influenced by potassium.^[11] The potassium binding sites have been described in PaBADH, LvBADH, and pkBADH previously; all the enzymes share the intracavity and the intercavity binding sites, while the central cavity has not been found for pkBADH.^[10,12,13]

The concentration of potassium ions changes in the cytoplasm of renal medulla cells depending on whether it is in the form of concentrated urine or dilute urine. During the formation of concentrated urine, synthesis and accumulation of GB are required, and synthesized by pkBADH. GB is the main osmolyte and osmoprotectant in renal medulla cells; accordingly, it is essential to determine whether the environment of the renal medulla regulates the activity of the enzyme. One form of regulation of the enzyme can be through changes in the enzyme's affinity for the substrate through small changes in the structure of the amino acids that shape the active site. This work aimed to analyze the effect of NAD⁺ concentration at varying potassium concentrations in pkBADH secondary and tertiary structures. Results obtained contribute to expand the understanding of the changes caused by potassium in the enzyme to explain the changes in the affinity of the enzyme for NAD⁺.

2 | EXPERIMENTAL

2.1 | Materials

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), betaine aldehyde chloride (BA), EDTA, HEPES buffer, and KCl were purchased from Sigma. All other chemicals used in this study were of analytical grade.

2.2 | Overexpression and purification of pkBADH

pkBADH was overexpressed as recombinant protein in *E. coli* cells and purified to homogeneity following the procedures described by Muñoz-Bacasehua *et al.* (2020).^[11] The enzyme's molar concentration was determined spectrophotometrically using molar absorptivity values at 280 nm deduced from the pkBADH amino acid sequence (<http://www.expasy.org/prosite/>).

2.3 | Intrinsic tryptophan fluorescence

Intrinsic fluorescence was measured with a QM-2003 fluorometer (Photon Technology International) with a 75-W xenon lamp as the light source. The samples were excited at 296 nm and emission data were collected from 300 to 400 nm with, in total, three readings. The assay was carried out using a 2×10^{-6} M enzyme monomer in 0.1 M HEPES buffer (pH 8.0) at 25°C.

The pkBADH enzyme was titrated with increasing concentrations of NAD⁺ (5–800 μM final concentration in cells) in the presence of 0, 25, 50, 75 and 100 mM KCl. Titration points were prepared independently, and the fluorescence data were corrected for buffer fluorescence, dilution of the sample, and inner filter effects according to the following equation:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \text{antilog}[(O_{\text{Dex}} + O_{\text{Dem}})/2] \quad (1)$$

where F_{corr} is fluorescence corrected for inner filter effects, F_{obs} is the observed fluorescence, O_{Dex} and O_{Dem} are the absorbances at the excitation and emission wavelengths, respectively.

To detect changes in the tertiary structure of pkBADH with KCl concentration, the mass spectral centre (MSC) was calculated according to the Equation 2:

$$\text{CEM} = \Sigma(\lambda * I\lambda) / \Sigma I\lambda \quad (2)$$

where I is maximum intensity of fluorescence, λ wavelength of the maximum intensity.

The pkBADH fluorescence quenching mechanism by NAD⁺ was analyzed using the Stern–Volmer equation.

$$F_0/F = 1 + K_{\text{SV}}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (3)$$

where F_0 and F are fluorescence intensity of pkBADH without and with the quencher, respectively; K_{SV} is Stern–Volmer quenching constant, K_q is the bimolecular quenching constant, $[Q]$ is the concentration of the quencher, τ_0 is the average lifetime of the biomolecule in the absence of the quencher ($\tau_0 = 10^{-8}$ s⁻¹).

The affinity constant K_a for the binding between NAD⁺ and pkBADH was analyzed using the modified Stern–Volmer equation:

$$F_0/\Delta F = [1/f_a K_a][1/Q] + 1/f_a \quad (4)$$

where f_a is the fraction of the initial fluorescence that is accessible to quencher; K_a is the Stern–Volmer quenching constant of the accessible fraction.

The number of active sites was calculated using the following equation and considering a process of static binding:

$$\text{Ln}[(F_0 - F)/F] = \text{Ln} K_b + n \text{Ln}[Q] \quad (5)$$

where in Equation 5 K_b and n are the binding constant and the number of binding sites, respectively.

2.4 | CD spectroscopy

To perform the CD assays, a Chirascan™ Q100 CD spectropolarimeter equipped with a Peltier temperature control system was used. Far-UV CD spectra of pkBADH (0.77 mg/ml) were recorded using quartz cuvettes with 0.1 cm optical path length. Two sets of far-UV CD spectra were recorded one at a wavelength of 200–260 nm for pkBADH–NAD⁺ in the absence of potassium and the other for pkBADH–NAD⁺ in the presence of potassium (200 to 260 nm). Potassium concentrations used were 25, 50, and 100 mM. The spectra were acquired at a scanning speed of 20 nm/min, the spectral bandwidth of 1 or 2 nm and a response time of 4 s. Spectra were averaged over five scans and the average spectrum of a reference sample without protein was subtracted. The observed ellipticities were converted to mean residue molar ellipticities $[\theta]$ based on a mean molecular mass per residue of 109.1 for pkBADH. The secondary structures of pkBADH in the presence and absence of NAD⁺ and potassium were estimated using the deconvolution software CDSSTR (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/>) with reference data set 4.^[14]

Thermal-induced protein denaturation was monitored following the ellipticity changes at 222 nm and increasing the temperature from 20°C to 90°C at a constant rate of 1°C/min. The melting temperature (T_m)_{app} was defined by detecting the maximum of the first derivative of the mean residue ellipticities $[\theta]$ after fitting the experimental data with a polynomial function using OriginPro 8 software (OriginLab, Northampton, MA, USA).

2.5 | PkBADH molecular modelling

The pkBADH structural model was obtained using Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0 software (Phyre2). The structure model of the pkBADH was set up using the crystallographic structure from *Gadus morhua* (GmBADH) (PDB entry 1BPW)^[15] and ALDH9A1 from human (HsALDH9A1) (PDB entry 6QAK)^[16] which showed an identity of 72% and 95%, respectively, with the pkBADH. The 3D structure of ALDH9A1 was used for the pkBADH structure model to locate tryptophans near the coenzyme binding domain. The PyMOL 1.1 molecular visualization software (DeLano Scientific LLC) was used to analyze the models obtained.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Changes in the tertiary structure of pkBADH titrated with NAD⁺ at variable potassium concentrations

An increase in the NAD⁺ concentration decreased the fluorescence intensity of pkBADH (Figure 1). However, each maximum of fluorescence intensity is at the same wavelength in the absence of K⁺ (Figure 1a). In the presence of K⁺ at any evaluated concentration, the

maximum fluorescence intensity changed to higher wavelengths (therefore it shifted towards the red end of the spectrum) (Figure 1b–1e).

The fluorescence decay as KCl concentration increases suggested that K⁺ could interact with residues near the NAD⁺ binding site in the protein. That interaction enabled NAD⁺ to quench the fluorescence, but K⁺ may be the quencher, considering that the size of both compounds was different enough to propose that NAD⁺ is the quencher.

The red shift of the maximum emission in the presence of K⁺ indicated a growth of polarity environment in the vicinity of tryptophans located in the pkBADH active site that can be attributed to molecular conformation changes due to the pkBADH–K⁺ interaction. The binding of K⁺ to the enzyme has been proposed for pkBADH and other BADHs, where K⁺ can bind to different sites: (1) amino acid residues located in the coenzyme binding domain (called intramolecular subunit cavity), (2) in the intersubunit cavity, and (3) in the central cavity of the tetramer.^[10,12,13] The binding of K⁺ into previously described pkBADH sites, could cause residue conformational changes or modification of the tertiary structure. Garza-Ramos *et al.* found a similar effect in *Pa*BADH, where changes in the protein's tertiary structure were dependent on the K⁺ concentration.^[17]

Analysis of the pkBADH spectral centre of mass revealed that the maximum fluorescence emission of pkBADH did not change as a function of the NAD⁺ concentration in the absence of K⁺ (Figure S1). These data indicated that the binding of NAD⁺ to pkBADH does not modify the tertiary structure (Figure S1); instead, the presence of K⁺ induced a shift towards higher wavelengths (shift red), suggesting changes in the tertiary structure of pkBADH, and that this effect occurs with all the K⁺ concentrations evaluated (Figure S1).

The analysis of pkBADH fluorescence data using the Stern–Volmer equation (Equation 3) showed a sigmoidal behaviour in the absence of K⁺ (Figure 2a), indicating that there are accessible and nonaccessible tryptophans to the quencher. That result also indicated that NAD⁺ is the quencher. Data analysis at different K⁺ concentrations showed a linear behaviour at all K⁺ concentrations tested (Figure 2b–2e). Subsequently, our results pointed out that the presence of K⁺ changes the enzyme tertiary structure, allowing all the tryptophans to be quenched by NAD⁺.

K_{sv} values in the absence of potassium cannot be calculated due to a lack of data linearity (Figure 2a). Conversely, when K⁺ is included in the assay K_{sv} values were $9.5 \pm 0.4 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$, $9.0 \pm 0.4 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$, $10.3 \pm 0.5 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ and $9.8 \pm 0.4 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ at 25 mM, 50 mM, 75 mM, and 100 mM KCl, respectively. K_{sv} values indicated that at all K⁺ concentrations the quenching constant is similar, which suggested that the K⁺ presence is important to allow the accessibility of the NAD⁺ to the pkBADH active site.

To look for the tryptophan's location in the pkBADH, a homology model of pkBADH was obtained. The enzyme modelling showed that, in the active site, there are two tryptophans (W-156 and W-165) in the NAD⁺-binding domain (Figure 3a). Other two tryptophans are located at each subunits surface (W-65 and W-114) (data not shown). Fluorescence data and modelling analysis suggested that NAD⁺

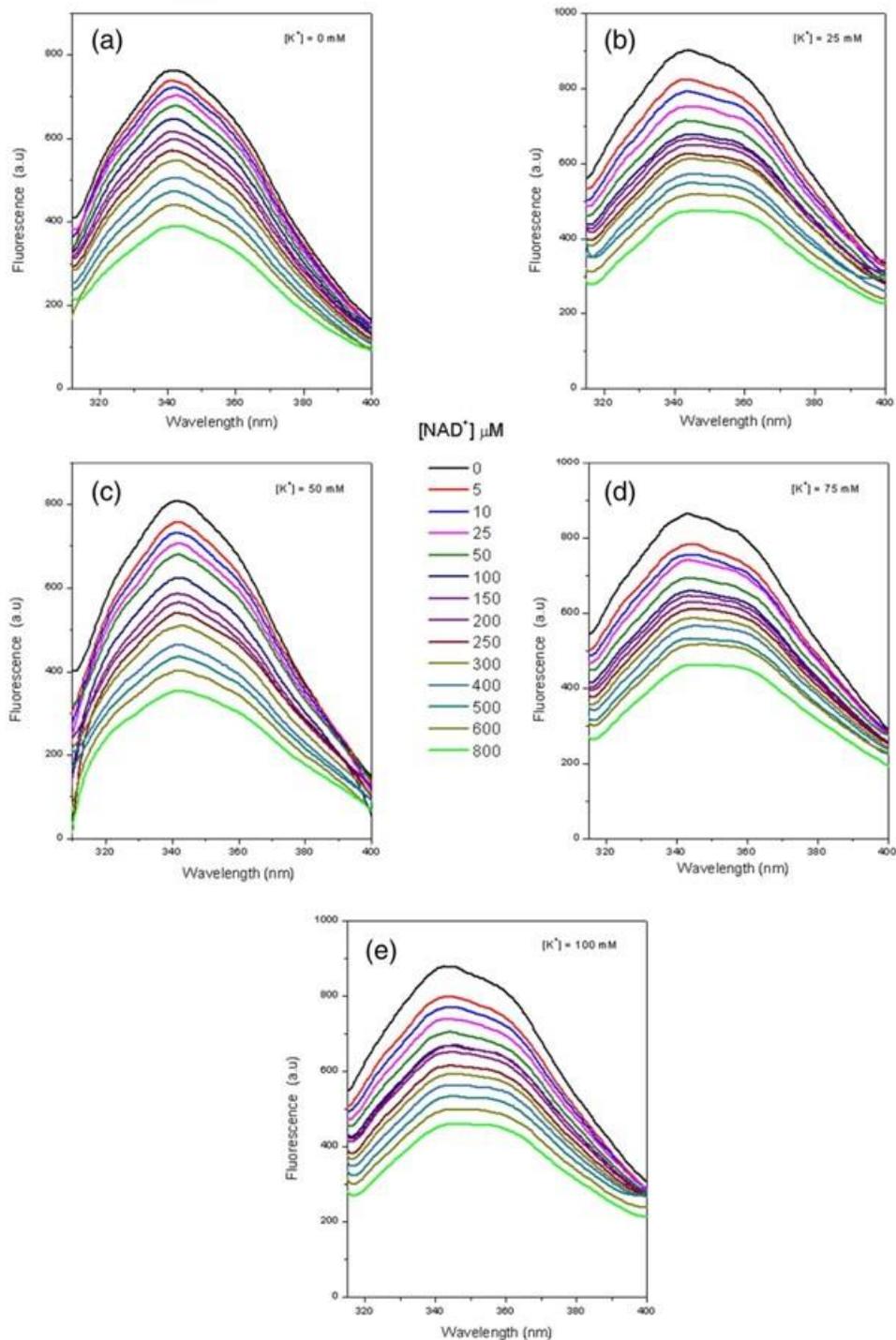


FIGURE 1 Fluorescence quenching spectra of pkBADH titrated with variable NAD^+ concentrations in presence of potassium. (a) $[\text{K}^+] = 0 \text{ mM}$, (b) $[\text{K}^+] = 25 \text{ mM}$, (c) $[\text{K}^+] = 50 \text{ mM}$, (d) $[\text{K}^+] = 75 \text{ mM}$, (e) $[\text{K}^+] = 100 \text{ mM}$

binding to the active site in the presence of K^+ caused an increase in the tryptophan's exposure to the solvent at the active site, which suggested changes in pkBADH tertiary structure (Figure 3b).

The modified Stern-Volmer equation (Equation 4) was used to calculate the Stern-Volmer quenching constant of the tryptophan's accessible fraction to the NAD^+ (K_s) and the fraction of the initial

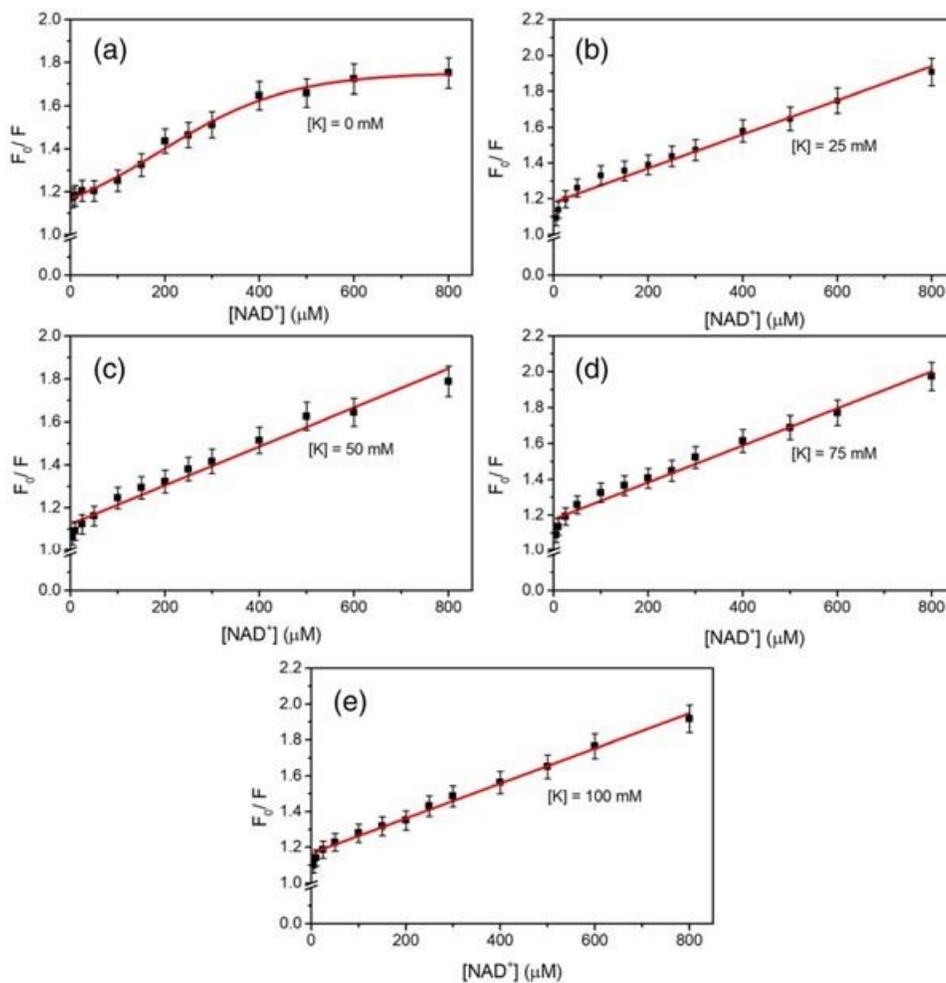


FIGURE 2 Stern–Volmer plot of pkBADH quenching by NAD^+ binding. (a) $[\text{K}^+] = 0 \text{ mM}$, (b) $[\text{K}^+] = 25 \text{ mM}$, (c) $[\text{K}^+] = 50 \text{ mM}$, (d) $[\text{K}^+] = 75 \text{ mM}$, (e) $[\text{K}^+] = 100 \text{ mM}$

fluorescence that is accessible to NAD^+ (f_a). Results showed no linear graphics to the pkBADH- NAD^+ complex with or without K^+ in the assay mixture (Figure 4). However, the analysis of data at low (5 to 150 μM) and high (200–800 μM) NAD^+ concentrations allowed us to determine the association constant between pkBADH and the quencher (K_a) with respect to K^+ concentration (Table 1). Nevertheless, the calculation was not possible in the absence of K^+ and low NAD^+ concentrations.

The corresponding values of K_a to NAD^+ showed that, at low NAD^+ concentrations, the K_a values were very similar at all K^+ concentrations, varying from 92 to $122 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Table 1). Conversely, at high NAD^+ concentrations and in the absence of K^+ , the K_a value was $3.5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Table 1). In the presence of K^+ , the K_a value was very similar at all K^+ concentrations, varying between 7.6 and $4.5 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Table 1). Those results indicated that, in the absence of K^+ , quenching is caused by static and dynamic mechanisms. In a K^+ presence the quenching mechanism is static, indicating that K^+ facilitates the pkBADH- NAD^+ complex formation.

The accessible fraction of tryptophan residues of pkBADH sensitive to NAD^+ quenching (f_a) was also calculated. f_a values for low NAD^+ concentrations (5–150 μM) were 0.26, 0.20, 0.25 and 0.24 for 25, 50, 75 and 100 mM KCl (Table 1), in addition, f_a values for high NAD^+ concentrations (200–800 μM) were 0.46, 0.58, 0.59, 0.61 and 0.63 for 0, 25, 50, 75 and 100 mM KCl (Table 1). There was an increase in the accessible fraction of tryptophans to NAD^+ as the K^+ concentration was increased. These data suggested that K^+ is modifying the accessibility of tryptophans to the NAD^+ , which could be explained as a change in the structure of the active site, however, more studies are needed to confirm this finding.

3.2 | Binding sites on pkBADH

The data were analyzed with Equation 5 to calculate the number of the binding sites in the pkBADH (Figure 5). The analysis showed n approximates to 1, suggesting a unique type of site with the same

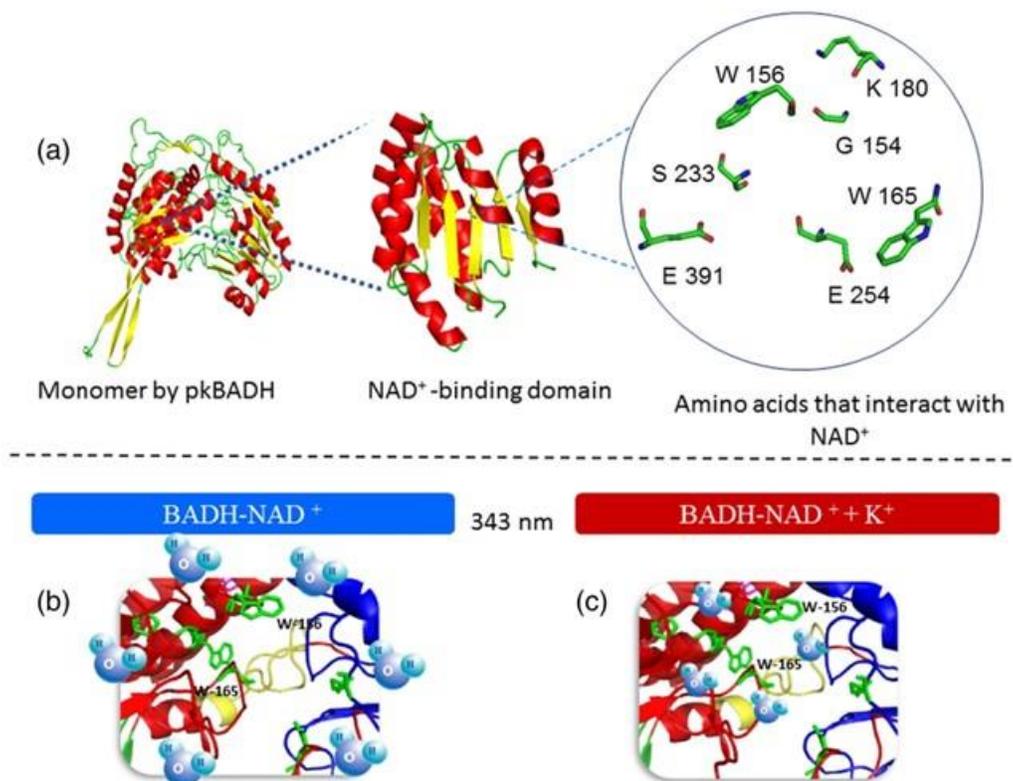


FIGURE 3 Structural model of pkBADH representation of the residues present in the domain of coenzyme binding. (a) Zoom pkBADH coenzyme binding domain; position of tryptophans and water molecules in the coenzyme binding site. (b) Tryptophans less exposed to the solvent. (c) Tryptophans more exposed to the solvent

accessibility to NAD⁺ and the absence of cooperativity. The presence of K⁺ has no effect on the n value and was in accordance with previous studies that demonstrated that K⁺ modified the affinity of the enzyme for the NAD⁺.^[10]

3.3 | Effect of K⁺ on secondary structure content of pkBADH

CD spectra of the pkBADH-NAD⁺ complex in the absence of K⁺ exhibited the characteristics of electronic transitions of negative absorption bands with maxima at ~208 nm ($n \rightarrow \pi^*$) and 222 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$), which are the characteristic bands of the α -helical structure of the pkBADH-NAD⁺ complex (Figure 6a). The CD data obtained from the pkBADH-NAD⁺ complex in the absence of K showed different ellipticity values to the enzyme with NAD⁺ at each concentration of KCl evaluated (Figure 6a).

The spectra of the pkBADH-NAD⁺ complex obtained in the presence of 25 mM of KCl presented an increase in the ellipticity values $[\theta]$ in the region characteristic band of 208–210 nm and 222 nm (Figure 6a). The spectrum of the pkBADH-NAD⁺ complex in the presence of 50 or 100 mM KCl showed an increase of 3 units in the

ellipticity values $[\theta]$ compared with the complex in the absence of K⁺ (Figure 6a). Changes in values of $[\theta]$ indicated that the K⁺-enzyme interaction caused changes in the secondary structure.

The deconvolution data analysis showed a 13% increase in the pkBADH helical structure, a decrease of 7% in β -sheet content and 6% in turns content during the pkBADH-NAD⁺ complex formation (Table 2). The addition of 25 mM KCl to the pkBADH and NAD⁺ mix provoked an additional increase of 3% in the α -helix content and an additional decrease in the β -sheet content of 6% (Table 2). Higher K⁺ concentrations caused small changes in α -helix and β -sheet content during the pkBADH-NAD⁺ complex formation. CD data from the pkBADH-NAD⁺ complex formation in the presence of K⁺ indicated that K⁺ caused changes in the enzyme's secondary structure. These results agreed with previous evidence in which K⁺ alone induced changes in the secondary structure content of the pkBADH.^[10]

3.4 | Effect of K⁺ concentration on pkBADH thermal denaturation

Temperature-induced denaturation transitions were carried out for pkBADH plus NAD⁺ with or without K⁺ with the aim to determine

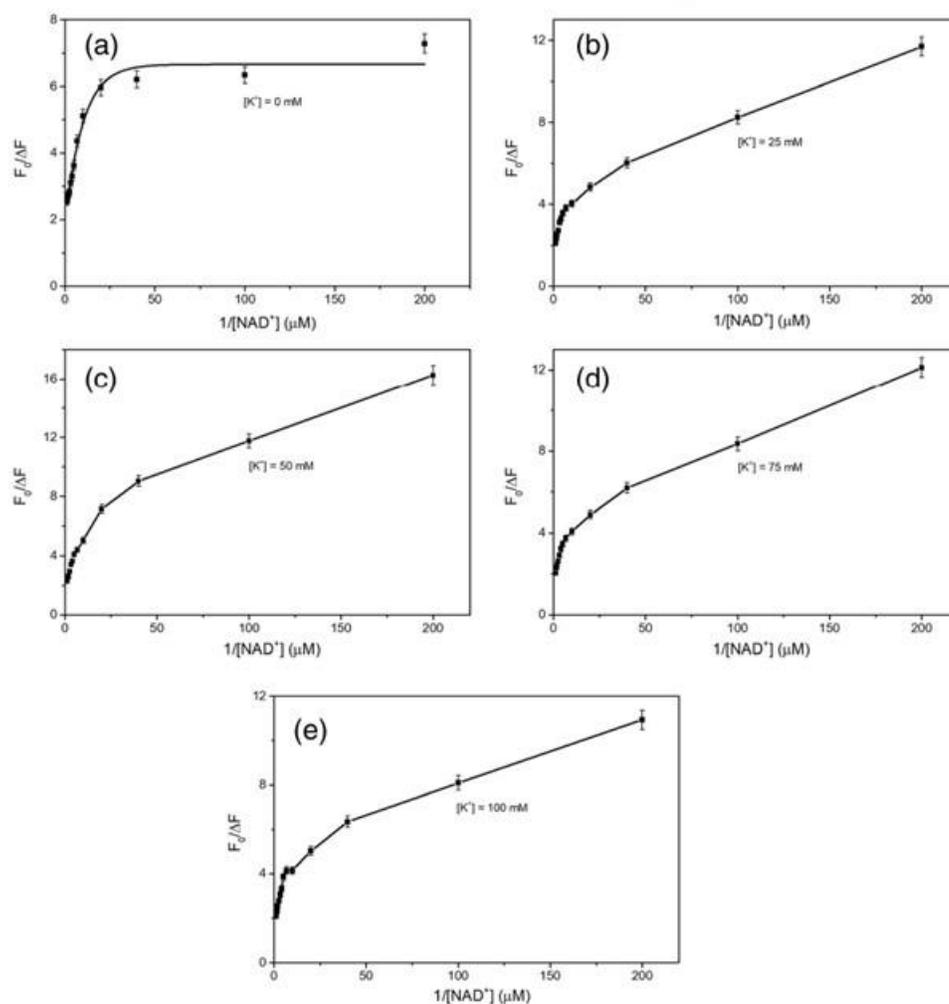


FIGURE 4 Modified Stern–Volmer plots for pkBADH quenching by NAD^+ binding in the absence or presence of K^+ . (a) $[\text{K}^+] = 0 \text{ mM}$, (b) $[\text{K}^+] = 25 \text{ mM}$, (c) $[\text{K}^+] = 50 \text{ mM}$, (d) $[\text{K}^+] = 75 \text{ mM}$, (e) $[\text{K}^+] = 100 \text{ mM}$

TABLE 1 Potassium effect on Stern–Volmer constant association and fraction accessible for the interaction of pkBADH with NAD^+

$[\text{K}^+] \text{ mM}$	0–150 μM $[\text{NAD}^+]$			200–800 μM $[\text{NAD}^+]$		
	$K_s (10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	f_a	R^2	$K_s (10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	f_a	R^2
0	ND	ND		7.6 ± 0.01	0.46	0.993
25	97.7 ± 9.9	0.26	0.982	4.5 ± 0.02	0.58	0.976
50	92.3 ± 9.1	0.20	0.939	3.5 ± 0.01	0.59	0.992
75	92.9 ± 9.5	0.25	0.982	4.3 ± 0.01	0.61	0.982
100	122.8 ± 12	0.24	0.984	3.5 ± 0.01	0.63	0.991

the changes observed in the secondary structure content. Thermal stability of the pkBADH– NAD^+ complex in the presence of K^+ showed a complete loss of the ellipticity signal and highly cooperative thermal transitions in each thermogram in the presence of each K^+ concentration tested (data not shown). In all tested conditions, the thermal denaturation was irreversible.

The first derivative analysis from the pkBADH– NAD^+ complex showed a peak with a $(T_{m})_{app}$ value of 47.2°C , the addition of 25 mM K^+ increased the $(T_{m})_{app}$ to 59.9°C , while the addition of 50 mM or 100 mM K^+ provoked changes in the $(T_{m})_{app}$ to 55.9°C or 54.9°C , respectively (Figure 6b). The binding of NAD^+ to pkBADH caused a lower thermal stability of the enzyme which was reverted by

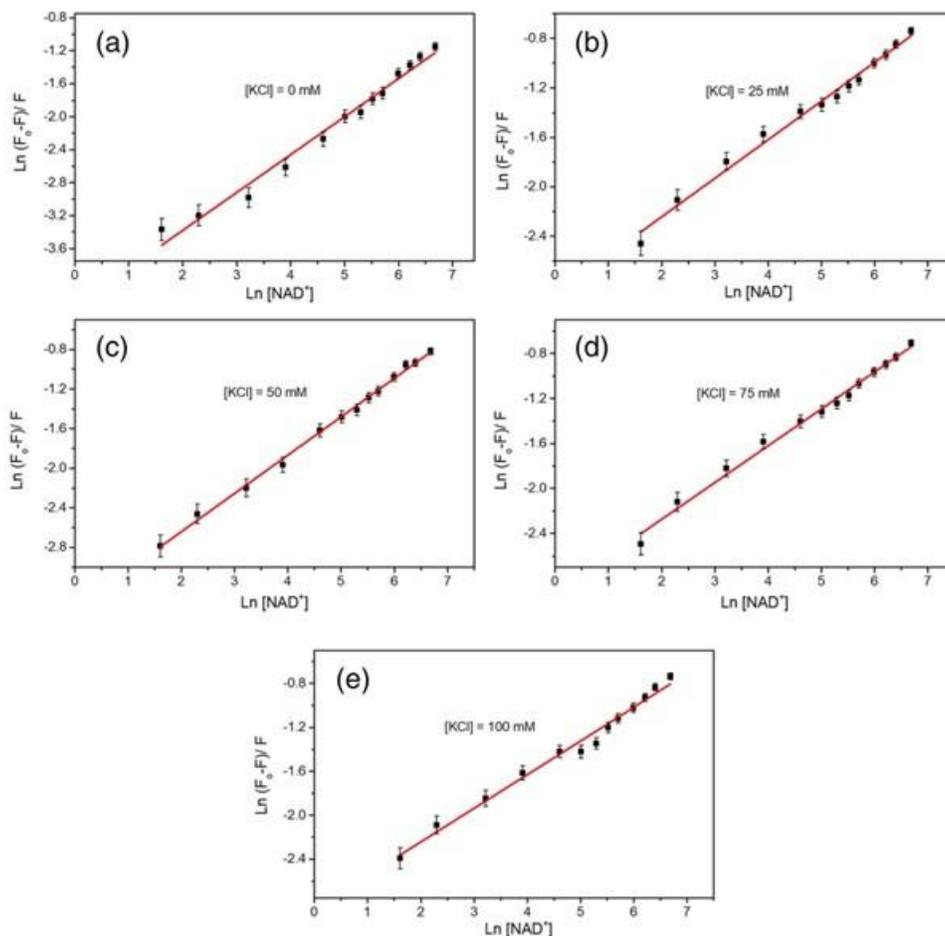


FIGURE 5 Determination of pkBADH dissociation constant to NAD^+ and active site reactivity

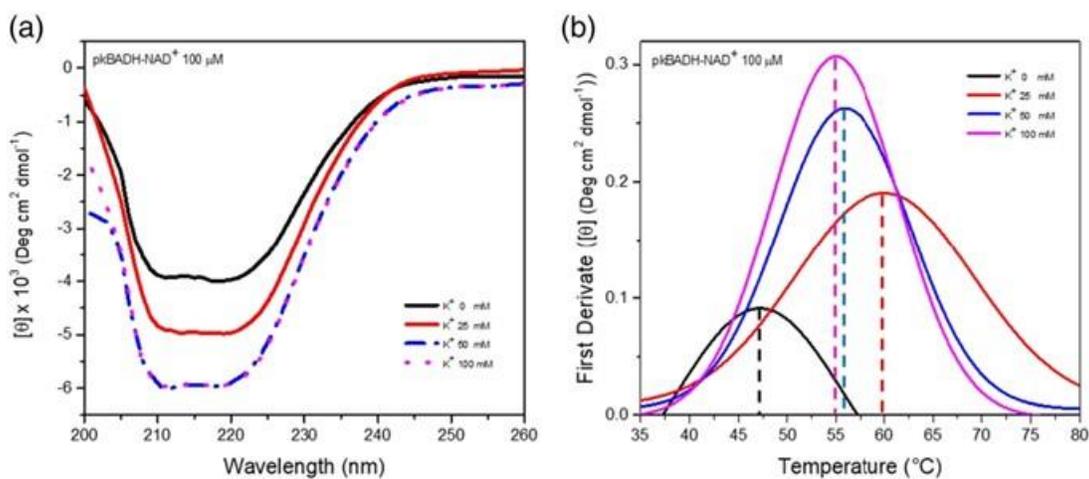


FIGURE 6 Effect of K^+ on the secondary structure content and thermal denaturation during the pkBADH- NAD^+ complex. (a) Far-UV CD spectra pkBADH- NAD^+ complex in absence of K^+ (black line), pkBADH- NAD^+ [K^+] = 25 mM (red line), [K^+] = 50 mM (blue line), [K^+] = 100 mM (magenta line). (b) Heat-induced transitions of pkBADH- NAD^+ complex. pkBADH- NAD^+ in the absence of K^+ (black line), pkBADH- NAD^+ [K^+] = 25 mM (red line), [K^+] = 50 mM (blue line), [K^+] = 100 mM (magenta line)

TABLE 2 Effect of K⁺ on the secondary structure content of pkBADH

Condition	α -helix (%)	β -sheet (%)	Turns (%)	Random coil (%)
pkBADH	41	29	13	17
pkBADH-NAD ⁺	54	22	7	18
pkBADH-NAD ⁺ + K ⁺ 25 mM	57	17	7	20
pkBADH-NAD ⁺ + K ⁺ 50 mM	53	21	8	18
pkBADH-NAD ⁺ + K ⁺ 100 mM	53	19	8	21

CD data obtained from λ 200–260 nm, estimated using deconvolution software CDSSTR (Dichroweb).

the K⁺ presence. These results confirmed previous data that showed that K⁺ stabilized pkBADH against temperature, while the coenzyme made the enzyme less stable against temperature.^[10]

The results indicated that low concentrations of K⁺ (25 mM) had a more significant effect on the pkBADH secondary structure and thermal stability. The K⁺ role seems to be linked to the pkBADH secondary structure surrounding the NAD-binding domain. The catalytic domain has an α/β structure with a Rossmann-type folding formed by six parallel β -sheets,^[12,15,18] and the residues present in this domain are a key element to conformational changes induced by K⁺ or NAD⁺ that favour stability against temperature. Recently, a large conformational change due to binding of NAD⁺ has been described, in which the interdomain linker adopted a new position and folding. A drastic rearrangement of the structure of up to 30 Å is required for access of NAD⁺ to the substrate channel.^[16,19] All these structural rearrangements of pkBADH in the presence of K⁺ clearly showed a system that ranged from changes at secondary and tertiary structure to modify the interaction with the protein with the coenzyme and therefore favour catalysis.

4 | CONCLUSION

The results showed that the presence of K⁺ during NAD⁺ binding to the pkBADH active site caused changes in the polarity of the tryptophan environment located in the active site, and it modified the content of the secondary structure. These changes could be influencing the pkBADH affinity by NAD⁺ promoting the pkBADH-NAD⁺ complex formation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CMB performed the experiments, EMVS, JARR, AALZ conceived the experiments, CMB, EMVS, JARR, AALZ analyzed the data, CMB and EMVS wrote the original draft of manuscript, all authors revised and edited the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

César Muñoz-Bacasehua gratefully acknowledges a scholarship from CONACyT for Ph.D. studies. Authors are grateful to G. Garza-Ramos for providing facilities and constant support to carry out CD spectra.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data available on request from the authors

ORCID

Elisa M. Valenzuela-Soto  <https://orcid.org/0000-0003-4910-1024>

REFERENCES

- [1] R. A. Muñoz-Clares, E. M. Valenzuela-Soto, Betaine aldehyde dehydrogenases: evolution, physiological functions, mechanism, kinetics, regulation, structure, and stability, in *Adv. Protein Phys. Chem.* (Eds: E. García-Hernández, D. A. Fernández-Velasco), Research SignPost, Kerala, India 2008 279.
- [2] A. Julián-Sánchez, H. Riveros-Rosas, L. P. Martínez-Castilla, R. Velasco-García, R. A. Muñoz-Clares, *Enzym Mole Bio Carbonyl Meta* 2007, 13, 64.
- [3] A. M. Guzman-Partida, E. M. Valenzuela-Soto, *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 1998, 119, 485.
- [4] E. M. Valenzuela-Soto, R. Velasco-García, C. Mújica-Jiménez, R. A. Muñoz-Clares, *Chem.-Biol. Interact.* 2003, 143, 139.
- [5] H. Riveros-Rosas, L. González-Segura, A. Julián-Sánchez, Á. G. Daz-Sánchez, R. A. Muñoz-Clares, *Chem.-Biol. Interact.* 2013, 202, 51.
- [6] C. G. Figueroa-Soto, E. M. Valenzuela-Soto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 269, 596.
- [7] E. M. Valenzuela-Soto, R. Muñoz-Clares, *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 23818.
- [8] R. A. Muñoz-Clares, A. G. Díaz-Sánchez, L. González-Segura, C. Montiel, *Arch. Biochem. Biophys.* 2010, 493, 71.
- [9] H. G. Ayala-Castro, C. G. Figueroa-Soto, E. M. Valenzuela-Soto, R. A. Muñoz-Clares, *Arch. Biochem. Biophys.* 2007, 468, 167.
- [10] C. Muñoz-Bacasehua, J. A. Rosas-Rodríguez, A. A. Arvizu-Flores, E. M. Valenzuela-Soto, *J. Bioenerg. Biomembr.* 2020, 52, 61.
- [11] C. Muñoz-Bacasehua, J. A. Rosas-Rodríguez, A. A. Arvizu-Flores, A. Stephens-Camacho, J. G. Soñanez-Organis, C. G. Figueroa-Soto, E. M. Valenzuela-Soto, *J. Mol. Recognit.* 2020, 33, e2869.
- [12] L. González-Segura, E. Rudiño-Piñera, R. A. Muñoz-Clares, E. Horjales, *J. Mol. Biol.* 2009, 385, 542.
- [13] M. F. Delgado-Gaytán, J. A. Rosas-Rodríguez, G. Yepiz-Plascencia, C. G. Figueroa-Soto, E. M. Valenzuela-Soto, *Chem.-Biol. Interact.* 2017, 276, 65.
- [14] N. Sreerama, R. W. Woody, *Anal. Biochem.* 2000, 287, 252.
- [15] K. Johansson, S. Ramaswamy, H. Eklund, M. El-Ahmad, L. Hjelmqvist, H. Jörmvall, *Protein Sci.* 1998, 7, 2106.

- [16] R. Končítiková, A. Vigouroux, M. Kopečná, M. Šebela, S. Moréra, D. Kopečný, *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, BSR20190558. <https://doi.org/10.1042/BSR20190558>
- [17] G. Garza-Ramos, C. Mújica-Jiménez, R. A. Muñoz-Clares, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54899.
- [18] A. S. Halavaty, R. L. Rich, C. Chen, J. C. Joo, G. Minasov, I. Dubrovskaya, J. R. Winsor, D. G. Myszka, M. Duban, L. Shuvalova, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2015**, *71*, 1159.
- [19] J. W. Wyatt, D. A. Korasick, I. A. Qureshi, A. C. Campbell, K. S. Gates, J. J. Tanner, *Arch. Biochem. Biophys.* **2020**, *691*, 108477.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: C. Muñoz-Bacasehua, J. A. Rosas-Rodríguez, A. A. López-Zavala, E. M. Valenzuela-Soto, *Luminescence* **2021**, *1*. <https://doi.org/10.1002/bio.4115>

4. INTERACTION STUDIES OF THE PKBADH-NAD⁺-K⁺ COMPLEX REVEALS A NEW POSSIBLE MECHANISM BETWEEN POTASSIUM AND GLUTAMIC 254 OF PORCINE KIDNEY BETAINE ALDEHYDE DEHYDROGENASE RECOMBINANT

César Muñoz-Bacasehua^a, Hisila Santacruz Ortega^b, Elisa M. Valenzuela-Soto^{a*}

^a Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Apartado Postal 1735, Hermosillo 83304, Sonora, México.

^b División de Ingeniería, Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales Universidad de Sonora, Hermosillo 83000, Sonora, México.

*Corresponding Author: Elisa M. Valenzuela-Soto, elisa@ciad.mx

Tel : +52 (662) 289-2400, Fax: +52 (662) 280-0381

Artículo enviado a Biochemical Biophysical Research Communications

Biochemical and Biophysical Research Communications
**BADH-NAD⁺-K⁺ complex interaction studies reveal a new possible mechanism
between potassium and glutamic 254 at the coenzyme binding site**
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Short communication/Research article
Keywords:	Betaine aldehyde dehydrogenase; cysteine reactivity; monovalent cations; Glycine betaine; NAD ⁺ binding.
Corresponding Author:	Elisa M. Valenzuela-Soto, Ph.D. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC Hermosillo, MEXICO
First Author:	Elisa M. Valenzuela-Soto, Ph.D.
Order of Authors:	Elisa M. Valenzuela-Soto, Ph.D. César Muñoz-Bacasehua, MS Hisila Santacruz-Ortega, PhD

Highlights

Highlights

- Glutamate environment is less electronegative with a lower electron density in pK_{BADH}-K⁺ complex
- Potassium and COOH from glutamic acid interaction stabilize charges in active site environment
- Charge's stabilization facilitates the coenzyme binding to the enzyme.
- Glutamate and cysteine structure is more rigid when pK_{BADH}-NAD⁺-K⁺ complex is formed

**BADH-NAD⁺-K⁺ complex interaction studies reveal a new possible mechanism
between potassium and glutamic 254 at the coenzyme binding site**

César Muñoz-Bacasehua^a, Hisila Santacruz Ortega^b, Elisa M. Valenzuela-Soto^{a*}

^a Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Apartado Postal 1735, Hermosillo 83304, Sonora, México.

^b División de Ingeniería, Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales Universidad de Sonora, Hermosillo 83000, Sonora, México.

*Corresponding Author:

Elisa M. Valenzuela-Soto

elisa@ciad.mx

Phone: +52 (662) 289-2400

Fax: +52 (662) 280-0381

Abstract

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH EC 1.2.1.8) catalyzes the irreversible oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine using NAD^+ as a coenzyme. Incubation of porcine kidney BADH (pkBADH) with NAD^+ decreases the catalytic cysteine (C288) reactivity. Potassium ion increases the pkBADH affinity by the coenzyme. This work aimed to analyze pkBADH and NAD^+ interaction in the presence and absence of K^+ using ^1H NMR to identify the amino acids that interact with NAD^+ and/or K^+ to understand the regulation process of pkBADH- NAD^+ complex formation mediated by the K^+ ion and their impact on the substrate binding and catalysis. Nuclear magnetic resonance spectra of pkBADH were obtained in the presence and absence of NAD^+ and K^+ . The results show a chemical shift of the signals corresponding to the catalytic glutamic that participates in the transfer of H^+ in the reaction of the pkBADH- NAD^+ - K^+ complex formation. Furthermore, there is a widening of the signal that belongs to the catalytic cysteine indicating higher rigidity or less grade of rotation of the structure, which is consistent with the possible conformations of C288 in the catalytic process; in addition, there is evidence of changes in the chemical environment that surrounds NAD^+ .

Key words: Betaine aldehyde dehydrogenase; cysteine reactivity; monovalent cations; Glycine betaine; NAD^+ binding.

1. Introduction

The osmolyte and osmoprotectant glycine betaine (GB) is synthesized by betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, EC 1.2.1.8 betaine aldehyde: NAD⁺ oxidoreductase) mainly in kidney and liver [1]. GB acts as an osmolyte during the formation of concentrated urine in kidney [2,3]. GB increases the intracellular osmotic potential to cope with high sodium concentrations and protect macromolecules from the high urea concentrations [2,3]. BADH plays an essential role in other metabolic pathways in mammals, e.g., in polyamines catabolism, synthesis of the neurotransmitter γ -aminobutyric acid, and carnitine biosynthesis [4-6]. BADH belongs to the aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily [7,8] and the ALDH9 family [9].

The porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase (pkBADH) is a homo-tetramer of 232 kDa formed by dimers pairs; and its tetrameric conformation has ionic strength dependency given by monovalent cations [10]. Potassium is required for some ALDHs and BADHs to maintain their conformation and/or their activity [10,11]. This characteristic appears to be related to the environmental conditions of the organisms that synthesize and accumulate GB [12]. K⁺-dependent enzymes in the absence of potassium show changes in their subunits association, spectroscopic characteristics, and increased thermostability in their presence [13-15]. González-Segura et al. (2013) [16] described potential potassium binding sites in ALDH; and in BADHs the potential K⁺ binding sites were identified by molecular modeling [17,18]. Three potential K⁺ binding sites are identified in pkBADH; one of them is located in the coenzyme binding site, where K⁺ interacts with N-98, F-32, and F-184 [17,18].

The active site of pkBADH is formed by the catalytic amino acids C288, G285, N157, and E254 and by the decapeptide VTLELGKSP involved in the binding of NAD⁺ [19].

Incubation of pkBADH with its coenzyme decreases the C288 reactivity [20]. Additionally, the affinity of PkBADH for NAD^+ is modified by potassium ions, because K^+ interacts with the enzyme causing changes in the secondary structure content [21]. Končítiková et al. (2019) found in human ALDH9A1 that the coenzyme domain (residues 232-256) and the inter-domain linker (residues 449–470) do not adopt the typical fold so far observed in all known ALDHs structures [22]. That highly conserved region has an essential role in stabilizing the coenzyme binding site, and it interacts with the bound substrate; the authors found that a switch corresponding to a rearrangement up to 30 Å must occur in the NAD^+ binding domain [22].

This work aimed to analyze the interaction of pkBADH and NAD^+ in the presence and absence of K^+ using ^1H NMR to identify the amino acids that interact with NAD^+ and/or K^+ to establish the regulation process of pkBADH- NAD^+ complex formation mediated by the K^+ ion and their impact on the substrate binding and catalytic function.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), potassium chloride (KCl) and HEPES were obtained from Sigma-Aldrich. All other chemicals used in this study were analytical grade.

2.2 ^1H NMR studies of pkBADH complex with NAD^+ and K^+

^1H NMR spectra were acquired at room temperature on a Bruker Avance 400 nuclear magnetic resonance spectrometer operating at 400 MHz (Billerica, MA, USA). ^1H NMR spectra were obtained for pkBADH alone, pkBADH complexed with potassium and pkBADH complexed with NAD^+ and K^+ . Three sets of ^1H NMR spectra were recorded; for

the first set, 1 mg of lyophilized protein in 0.5 ml of DMSO-d6 for pkBADH in the absence of ligands was used, a second set for the NMR spectra of the pkBADH complexed with potassium, 1 mg of lyophilized protein was used plus 50 mM of KCl in 0.5 ml of DMSO-d6 was used. Finally, 1 mg of lyophilized protein plus 50 mM of KCl plus 5 mM of NAD⁺ for the set of NMR spectra of the pkBADH complexed with NAD⁺ and K⁺ was used. Tetramethylsilane (TMS) was used as internal reference and the spectra were acquired at a scanning spectral window of 20 ppm, and 100 scans per sample were used.

2.3 Over-expression and purification of pkBADH

Over-expression and purification of the pkBADH were carried out according to Muñoz-Bacasehua [19]. Briefly, *Escherichia coli* ER2566 cells were transformed with the recombinant plasmid pkBADH-pTXB1 and cells were grown in 1 L of LB broth containing 50 µg/mL of ampicillin. Expression of the protein was induced by adding 0.4 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) to the culture medium followed by an incubation of 4 h at 37°C. The bacterial pellet was collected, sonicated and centrifuged at 7012 × *g* for 8 min at 4°C to remove insoluble proteins and the supernatant containing the recombinant pkBADH purified by chitin affinity chromatography as previously reported.

2.4 In silico molecular modeling analysis of the amino acids of the coenzyme binding site

The pkBADH structural model was obtained using Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0 software (Phyre2). The structure model of the pkBADH was made using the crystallographic structure of the BADH with the highest identity value found in the RCSB protein data bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). The structure models from *Gadus morhua* (*GmBADH*) (PDB entry 1BPW), *Pseudomonas aeruginosa* (*PaBADH*) (PDB entry 2WME) and ALDH9A1 from human (*HsALDH9A1*) (PDB entry

6QAP,6VR6,6VWF) showed an identity of 72%, 56%, and 95%, respectively with the pkBADH. The 3D structure of ALDH9A1 was used for the pkBADH structure model to identify its possible secondary structure. The obtained models were analyzed with the PyMOL 1.1 molecular visualization software (DeLano Scientific LLC).

3. Results and discussion

3.1 ^1H NMR studies of pkBADH complex with NAD^+ and K^+

The NAD^+ spectra showed the characteristic signals of the OH^- and NH^+ groups in the nucleotide and ribose (Fig. S1). PkBADH spectra in the absence of ligands showed the signals corresponding to cysteine (C), lysine (K), glycine (G), and glutamic acid (E) (Fig. 1A). The pkBADH- K^+ complex formation causes changes in the ^1H NMR signals indicating that the glutamic acid environment is less electronegative with a lower electron density, having a chemical shift to a low field (Fig. 1B). The glutamic acid interaction with the cation could occur with the COOH group, forming glutamate (COO-K^+) stabilizing charges from the environment. Furthermore, one of the signals corresponding to cysteine undergoes a broadening, suggesting more rigidity of the structure or less rotation of the alpha carbons in this part of the structure (Fig. 1B).

The pkBADH- NAD^+ - K^+ complex ^1H NMR signals are different in relation to those corresponding to the nucleotide. The pkBADH- NAD^+ - K^+ spectra exhibited signals migration toward the high field, in addition, there is a decrease in the intensity of the adenine signals indicating that there is a change in its environment polarity, changing to a more hydrophobic environment consistent with the cavity of NAD^+ -binding site pointing out the formation of the pkBADH- NAD^+ complex (Fig. 1C). Again, the more pronounced shift that occurs at low field and a broadening of the signals corresponding to glutamic acid and cysteine signals,

suggests changes in the rigidity of the structure or conformational changes in this part of the structure.

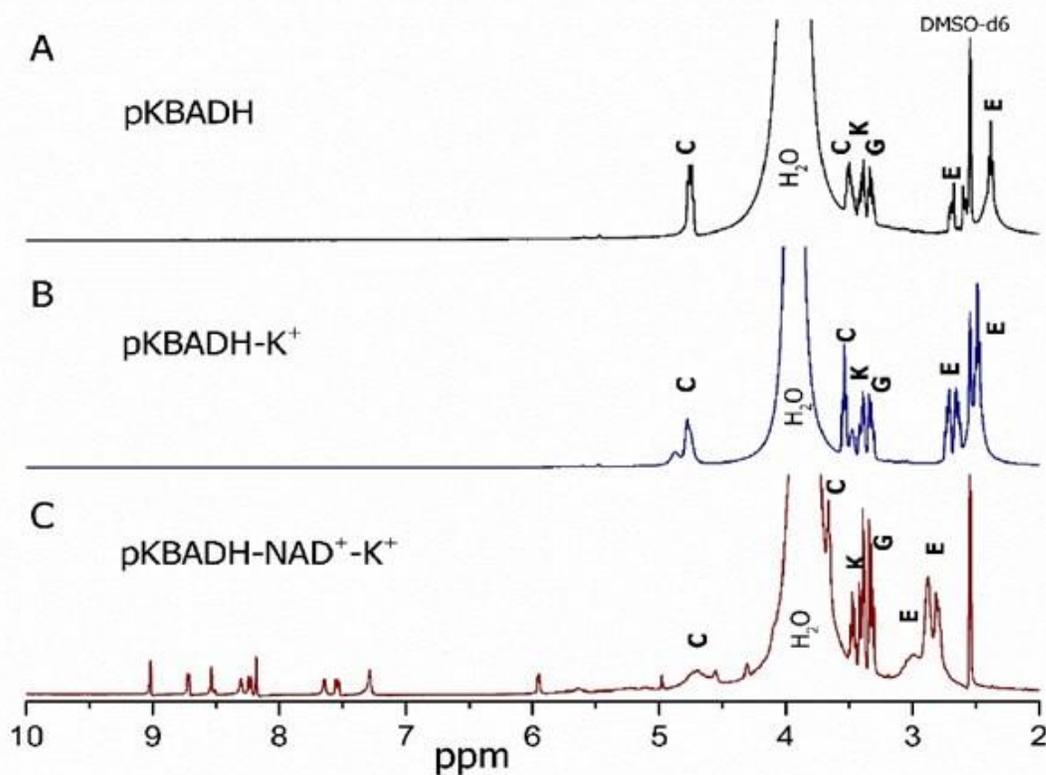


Figure 1. ¹H NMR spectra of pkBADH (A); pkBADH + K⁺ (B); pkBADH+NAD⁺ + K⁺ (C).

Figure 2 shows the spectra scale (from Fig. 1) modified to show the signal displacements of the catalytic cysteine, lysine, glycine, and glutamic acid in the pkBADH with respect to the enzyme in the presence of potassium alone and in the presence of potassium and NAD⁺. The pkBADH conserved residues are the catalytic cysteine (C288) and the catalytic glutamic acid (E254) that participate in the polarization of the carbonyl group of the betaine aldehyde (and stabilizes the intermediates of the reaction). Also, asparagine 157 (N157) and glycine 285 (G285) are conserved in all ALDH9 and pkBADH.

In addition, the residues corresponding to the coenzyme-binding domain, such as lysine (K180), glycine (G232 and G256), glutamic acid (E254 and E391), and phenylalanine (F393), are also strictly conserved.

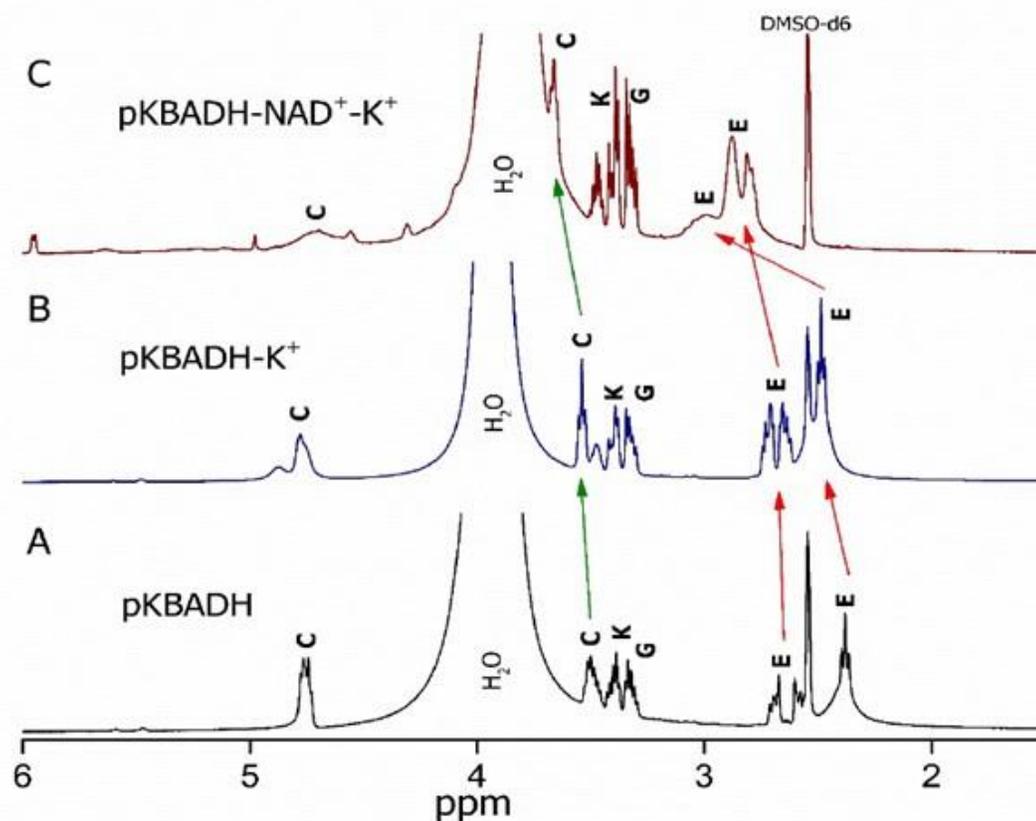


Figure 2. Analysis of ^1H NMR spectra of pkBADH and its interaction with potassium and NAD^+ . ^1H NMR spectra of pkBADH in absence of NAD^+ and K^+ (black line), ^1H NMR spectra pkBADH + K^+ (blue line), ^1H NMR spectra pkBADH + NAD^+ + K^+ (brown line).

The changes in the chemical shifts of the signals corresponding to glutamic acid would be consistent with the intermediate conformations that this residue can adopt during the catalytic process. In other ALDHs, the catalytic glutamic acid (E268) shows three stable conformations: inside, intermediate, and outside. The inside conformation is sterically

incompatible with the bound oxidized cofactor. It has been proposed that in this conformation, E268 can activate catalytic cysteine (C302) through a nucleophilic attack since the carboxyl group is close to the thiol [23]. The intermediate conformation is sterically compatible with the oxidized cofactor, and it is proposed to be suitable for the activation of the hydrolytic water molecule. In the outside conformation, E268 releases the proton previously taken up either from the C302 or from the water molecule through a mechanism involving proton release from glutamic acid (E476) and lysine (K178) [23].

On the other hand, the broadening of the spectra signals corresponding to pkBADH C288 is explained by the two possible conformations of C288: "resting" and "attack" found in other ALDHs. The first corresponds to a position in which the cysteine is far from the carbonyl carbon of the aldehyde; while in the "attack" conformation the cysteine is close to the carbonyl carbon, which is the correct position for the nucleophilic attack [17,24,25].

3.2 In silico molecular modeling analysis amino acids of the coenzyme binding site

The structural analysis of the binding site to NAD^+ in the pkBADH and possible monovalent cations binding site proposed to BADHs reveals that potassium can interact with E254 contributing to the stabilization of charges in the binding site to the coenzyme. That stabilization helps to maintain the arrangement of the NAD^+ binding site to facilitate NAD^+ positioning on the site. This interaction and stabilization charges would explain the data found in previous pkBADH studies, which demonstrated that affinity constants of the first NAD^+ binding site increased in a potassium-dependent manner [21]. Moreover, in the absence of potassium, we found no evidence of the formation of pkBADH- NAD^+ complex [21]. We propose that the interaction of K^+ with the catalytic E254 is occurring in two steps. First, the entry of potassium in the NAD^+ binding site would stabilize the charges causing

small changes in the microenvironment of the site and therefore, this would facilitate NAD^+ access. In a second step, the NAD^+ would displace the K^+ from the E254, as shown in figure 3.

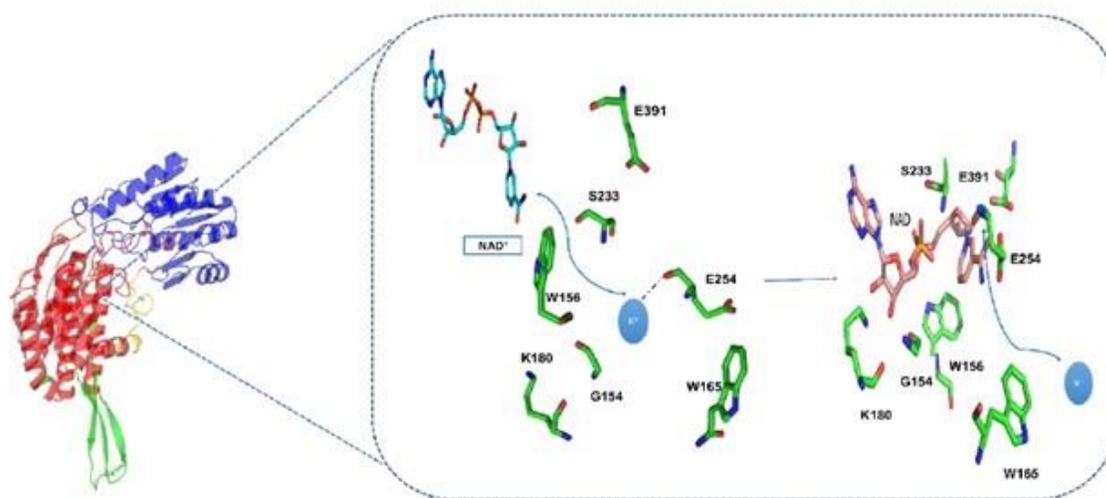


Figure 3. Structural model of pkBADH: theoretical model of the interaction of potassium with glutamic acid (E254) in the coenzyme binding site.

In addition, K^+ can interact with other glutamic acids; for example, those in the internal cavity formed by the four subunits of the enzyme, as found in the crystal structure of *Pa*BADH, where the residues involved in coordinating to the K^+ are E124, E126 and E450, corresponding to the human ALDH2 residues [16]. The glutamic acid residues are close to each other, causing a negative electrostatic potential and thus, K^+ binding could neutralize the negative potential to avoid repulsion and steric shocks between glutamic acid residues.

All the results in this work agree with those previously reported by our workgroup. In addition, we found that potassium facilitates the formation of the pkBADH- NAD^+

complex, and that the binding of K^+ to pKBADH causes small changes in the secondary and tertiary structure [26]. In silico structural modeling shows changes in the coenzyme binding site residues orientation in the presence and absence of NAD^+ (Fig. 4). The alignment of structures of the NAD^+ binding site allowed us to identify differences in the position of E254. The alignment indicates that the side chains of the amino acids of the NAD^+ binding site have conformational flexibility, which could be a mechanism for regulating pKBADH activity and other ALDHs in general, when they interact with monovalent cations, such as the K^+ .

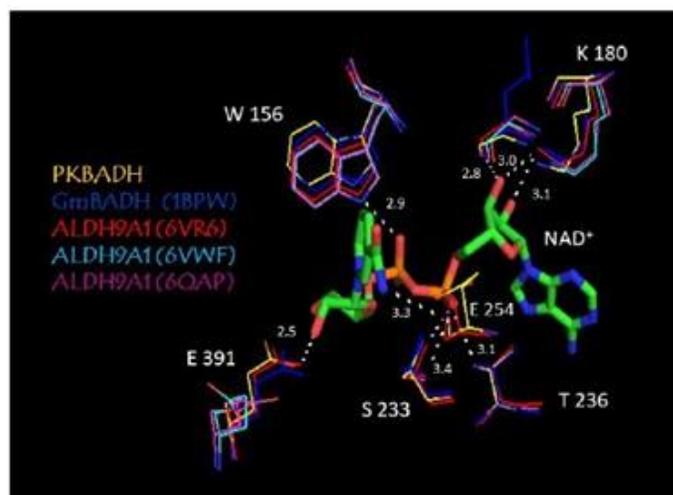


Figure 4. Alignment of structures of ALDH9s amino acids of the coenzyme binding site: pKBADH (yellow), GmBADH (1BPW) (blue), HsALDH9A1 complexed with NAD^+ (red), HsALDH9A1 complexed with NAD^+ (light green), HsALDH9A1 (pink).

The results obtained in this work lay the foundations for a possible mechanism for regulating the activity of pKBADH and its physiological implications in the hypertonic environment in the renal medulla cells. This possible mechanism would be activated by the large variations in potassium and sodium concentrations, would modify the secondary

structure of pkBADH through its binding in specific cavities in the pkBADH; regulating in this manner GB synthesis.

4. Conclusion

The K^+ interaction with the pkBADH causes changes in the catalytic glutamic acid environment, which is less electronegative with a lower electron density, having a chemical shift to a low field. Furthermore, the changes in cysteine signals suggest more rigidity of the structure or less rotation of the alpha carbons in the active site structure. The results indicated that the interaction of potassium with the catalytic glutamic acid would stabilize the charges of the NAD^+ binding site. Altogether the data show evidence of a system in which K^+ binding causes changes in the ordering and/or flexibility of the residues involved in forming the pkBADH- NAD^+ complex, which would regulate enzymatic catalysis.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgments

CMB gratefully acknowledges a scholarship from CONACyT for graduate studies.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Credit author statement

CMB and HSO performed the experiments, EMVS and CMB conceived the experiments, CMB and HSO analyzed the data, EMVS and CMB wrote the manuscript with comments of all authors.

References

- [1] G. Izaguirre, A. Kikonyogo, R. Pietruszko, Tissue distribution of human aldehyde dehydrogenase E3 (ALDH9): Comparison of enzyme activity with E3 protein and mRNA distribution, *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 118 (1997) 59–64. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00022-9](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00022-9).
- [2] W. Neuhofer, F.X. Beck, Survival in hostile environments: strategies of renal medullary cells, *Physiology*. 21 (2006) 171–180. <https://doi.org/10.1152/physiol.00003.2006>.
- [3] M.B. Burg, J.D. Ferraris, Intracellular organic osmolytes: Function and regulation, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 7309–7313. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700042200>.
- [4] W. Jelski, L. Chrostek, M. Szmikowski, Human aldehyde dehydrogenase (ALDH), *Postpy Hig. i Med. Doświadczalnej*. 55 (2001) 339–348.
- [5] S.W. Lin, J.C. Chen, L.C. Hsu, C.L. Hsieh, A. Yoshida, Human γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9): cDNA sequence, genomic organization, polymorphism, chromosomal localization, and tissue expression, *Genomics*. 34 (1996) 376–380. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0300>.
- [6] F.M. Vaz, S.W. Fouchier, R. Ofnan, M. Sommer, R.J.A. Wanders, Molecular and biochemical characterization of rat γ - trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 7390–7394. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.10.7390>.
- [7] M.K. Chern, R. Pietruszko, Human aldehyde dehydrogenase e3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213 (1995) 561–568. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2168>.

- [8] V. Vasiliou, D.W. Nebert, Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family, *Hum. Genomics*. 2 (2005) 138–143. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-2-2-138>.
- [9] A. Julián-Sánchez, H. Riveros-Rosas, L.P. Martínez-Castilla, R. Velasco-García, R.A. Muñoz-Clares, Phylogenetic and structural relationships of the betaine aldehyde dehydrogenases. In: Weiner H, Plapp B, Lindhal R, Maser E (eds), *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, West Lafayette, Purdue University Press. (2007): 64-76.
- [10] E.M. Valenzuela-Soto, R. Velasco-García, C. Mújica-Jiménez, Ll. Gaviria-González, R.A. Muñoz-Clares, Monovalent cations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidney and amaranth leaves, *Chem. Biol. Interact.* 143–144 (2003) 139–148. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00198-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00198-9).
- [11] R. Velasco-García, M.A. Villalobos, M.A. Ramírez-Romero, C. Mújica-Jiménez, G. Iturriaga, R.A. Muñoz-Clares, Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: Cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt, *Arch. Microbiol.* 185 (2006) 14–22. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0054-8>.
- [12] R.A. Muñoz-Clares, E.M. Valenzuela-Soto Betaine aldehyde dehydrogenases: evolution, physiological functions, mechanism, kinetics, regulation, structure, and stability. In: García-Hernández E, Fernández-Velasco A, eds. *Advances in Protein Physical Chemistry*. Kerala: Transworld Research Network. (2008):279-302.
- [13] E.M. Valenzuela-Soto, H. Ayala-Castro, R.A. Muñoz-Clares, E. Maser, B.Plapp, R. Lindahl and H.Weiner, Effects of monovalent and divalent cations on the thermostability of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. In: Weiner H, Plapp B, Lindhal R, Maser E (eds), *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 12, Purdue University Press, West Lafayette, (2005) 104-109.
- [14] G. Garza-Ramos, E. Carrillo-Nava, M. Costas, C. Mújica-Jiménez, Thermal Stability of Betaine Aldehyde Dehydrogenase. In: Weiner H, Plapp B, Lindhal R, Maser E (eds) *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 13, Purdue University Press, West Lafayette, (2007) 64-76.

- [15] G. Garza-Ramos, C. Mújica-Jiménez, R.A. Muñoz-Clares, 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 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054899>.
- [16] L. González-Segura, H. Riveros-Rosas, Á.G. Díaz-Sánchez, A. Julián-Sánchez, R.A. Muñoz-Clares, Potential monovalent cation-binding sites in aldehyde dehydrogenases, Chem. Biol. Interact. 202 (2013) 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.12.007>.
- [17] L. González-Segura, E. Rudiño-Piñera, R.A. Muñoz-Clares, E. Horjales, The Crystal Structure of A Ternary Complex of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* Provides New Insight into the Reaction Mechanism and Shows A Novel Binding Mode of the 2'-Phosphate of NADP⁺ and A Novel Cation Binding Site, J. Mol. Biol. 385 (2009) 542–557. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.082>.
- [18] M.F. Delgado-Gaytán, J.A. Rosas-Rodríguez, G. Yepiz-Plascencia, C.G. Figueroa-Soto, E.M. Valenzuela-Soto, Cloning and molecular characterization of the betaine aldehyde dehydrogenase involved in the biosynthesis of glycine betaine in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), Chem. Biol. Interact. 276 (2017) 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.02.006>.
- [19] C. Muñoz-Bacasehua, J.A. Rosas-Rodríguez, A.A. Arvizu-Flores, A. Stephens-Camacho, J.G. Soñanez-Organis, C.G. Figueroa-Soto, E.M. Valenzuela-Soto, Heterogeneity of active sites in recombinant betaine aldehyde dehydrogenase is modulated by potassium, J. Mol. Recognit. 33 (2020a) e2869. <https://doi.org/10.1002/jmr.2869>.
- [20] H.G. Ayala-Castro, E.M. Valenzuela-Soto, C.G. Figueroa-Soto, R.A. Muñoz-Clares, Complex, unusual conformational changes in kidney betaine aldehyde dehydrogenase suggested by chemical modification with disulfiram, Arch. Biochem. Biophys. 468 (2007) 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.09.022>.
- [21] C. Muñoz-Bacasehua, J.A. Rosas-Rodríguez, A.A. Arvizu-Flores, E.M. Valenzuela-Soto, Role of potassium levels in pkBADH heterogeneity of NAD⁺ binding site, J. Bioenerg. Biomembr. 52 (2020b) 61–70. <https://doi.org/10.1007/s10863-020-09827-7>.

- [22] R. Končítiková, A. Vigouroux, M. Kopečná, M. Šebela, S. Moréra, D. Kopečný, Kinetic and structural analysis of human ALDH9A1, *Biosci. Rep.* 39 (2019). <https://doi.org/10.1042/BSR20190558>.
- [23] A. Gruez, V. Roig-Zamboni, S. Grisel, A. Salomoni, C. Valencia, V. Campanacci, M. Tegoni, C. Cambillau, Crystal structure and kinetics identify *Escherichia coli* YdcW gene product as a medium-chain aldehyde dehydrogenase, *J. Mol. Biol.* 343 (2004) 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.030>.
- [24] R.A. Muñoz-Clares, L. González-Segura, Á.G. Díaz-Sánchez, Crystallographic evidence for active-site dynamics in the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. Implications for the deacylation step of the catalyzed reaction, *Chem. Biol. Interact.* 191 (2011) 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.12.024>.
- [25] C.G. Steinmetz, P. Xie, H. Weiner, T.D. Hurley, Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: The genetic component of ethanol aversion, *Structure.* 5 (1997) 701–711. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00224-4).
- [26] C. Muñoz-Bacasehua, J.A. Rosas-Rodríguez, A.A. Lopez-Zavala, E.M.Valenzuela-Soto, Spectroscopic analysis of coenzyme binding to betaine aldehyde dehydrogenase dependent of potassium. *Luminescence.* (2021) (accepted) <https://doi.org/10.1002/bio.4115>

5. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE PKBADH EN CÉLULAS RENALES

Como parte de los objetivos particulares de este trabajo se *proponen las implicaciones fisiológicas de la regulación de la pkBADH por K⁺ a nivel estructural* y a continuación se describen los posibles mecanismos de regulación y su posible implicación fisiológica.

La pkBADH es un homotetrámero de 232 kDa, que está formado por cuatro subunidades de 54 kDa cada una (Valenzuela-Soto et al., 2003). La regulación de la actividad de pkBADH puede estar ocurriendo a nivel de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria. Las variaciones en las concentraciones de iones, principalmente Na⁺ y K⁺, que se encuentran en la médula renal debido al mecanismo de formación de orina, son los posibles candidatos para participar en la regulación de la actividad de pkBADH debido a sus características similares de carga y radio atómico.

Los procesos que mantienen las concentraciones de Na⁺ y K⁺ intracelular son el transporte activo primario, donde la bomba de sodio-potasio-ATPasa (Na⁺/K⁺-ATPasa) desplaza tres átomos de Na⁺ del interior de la célula hacia el exterior y al mismo tiempo mueve dos de K⁺ en sentido contrario. Este sistema junto con los canales de potasio ROMK (rectifying outer medulla potassium), generan carga positiva en la luz tubular, lo que posteriormente favorece la reabsorción paracelular de otros cationes como calcio y magnesio en las células de la médula renal (Guyton y Hall, 2006; Hall, 2011; Blanco-Santos, 2019).

La pkBADH en el citoplasma de las células renales se encuentra en su conformación tetramérica que es su forma activa, la unión de los iones potasio al sitio de unión a K⁺ ubicado en la cavidad central de la proteína, mantendría la conformación activa de pkBADH. El ion K⁺ al formar interacciones electrostáticas con tres de las subunidades conservaría la estructura cuaternaria, evitando la disociación a dímeros (inactiva) que es la forma más estable de la proteína evitando la disminución en la síntesis de glicina betaína (GB). Nuestros resultados muestran que solo 10 mM de K⁺, aumenta la afinidad del sitio de unión a NAD⁺, aumentando la eficiencia catalítica de pkBADH y regulando la síntesis de GB. La unión de K⁺ a pkBADH específicamente en el sitio de unión a NAD⁺, el K⁺ interacciona con el grupo COO⁻ del ácido glutámico 254 formando glutamato COO-K⁺, esta interacción estabilizaría las cargas del sitio de unión a la coenzima facilitando la interacción con el NAD⁺, y aumentando la rigidez de la cisteína catalítica para que adquiriera la conformación adecuada para unir a BA, regulando la eficiencia catalítica de pkBADH.

Un aumento en la eficiencia catalítica de pkBADH incrementaría la síntesis de GB en las células renales, impidiendo aumentos en la osmolaridad y generación de estrés osmótico y estrés oxidativo. En nuestros resultados encontramos que la pkBADH presenta cambios en la estructura secundaria principalmente en el contenido helicoidal de pkBADH y en la estructura desordenada, con pequeños cambios en la estructura de láminas- β . Los cambios encontrados están relacionados principalmente con cambios en la orientación de los grupos R de los aminoácidos que están ubicados en el sitio de unión a la coenzima. Estos movimientos o cambios en la orientación de los aminoácidos, son causa de la interacción de los iones potasio en cavidades o sitios de unión a K^+ ubicados en la región intra-subunidad e inter-subunidad de pkBADH que de alguna forma ayudan a mantener el correcto plegamiento del sitio de unión a la coenzima, aumentando o disminuyendo la afinidad con la que pkBADH une al NAD^+ regulando la eficiencia catalítica de pkBADH. Una baja eficiencia catalítica de pkBADH en las células renales ocasionaría disminución en las concentraciones de GB y por ende aumento en la osmolaridad provocando estrés osmótico.

El estrés osmótico en las células de la médula renal produce una reducción del volumen celular, reordenamiento del citoesqueleto; estrés oxidativo que provoca aumento en las especies reactivas de oxígeno ocasionando daños al ADN dando como resultado restricciones transcripcionales y traduccionales, otro efecto es el arresto del ciclo celular que puede conducir a la apoptosis celular (Valenzuela-Soto y Rosas Rodríguez, 2021).

Es en este sentido la correcta regulación de la actividad de pkBADH en las células renales es muy importante ya que la síntesis y acumulación de GB es crucial para hacer frente a las altas concentraciones de urea y NaCl que se manejan durante la reabsorción de agua en el proceso de formación de orina concentrada para conservar los fluidos corporales. Además, en las células de la médula renal, GB juega un papel como osmolito y osmoprotector protegiendo a las proteínas de las alteraciones causadas por la urea y el NaCl (Neuhofer W., y Beck F., 2006; Burg M.B., y Ferraris.,2008). Además, GB regula la expresión de algunos factores de transcripción, principalmente aquellos involucrados en el metabolismo de los lípidos y las respuestas inflamatorias como $NF\kappa B$, SREBP y $PPAR\alpha$ (Figuroa-Soto y Valenzuela Soto, 2018). El estado energético celular también es beneficiado por la síntesis de GB ya que al participar como donador de grupos metilos ayuda a mantener el funcionamiento y el proteoma mitocondrial, además ayuda a mantener el potencial de membrana mitocondrial permitiendo la síntesis adecuada de ATP (Jung-Kim, 2018).

La regulación de la actividad de BADH en un contexto fisiológico, no solo se puede generalizar a la actividad enzimática, sino también a mecanismos de regulación transcripcional, ya que en otros estudios se ha demostrado que el estrés osmótico induce la expresión de ALDH9A1 que es prácticamente BADH (Izaguirre et al., 1997). Adicionalmente en un estudio realizado por Henrion et al. (2015) se encontró una asociación de riesgo para el desarrollo de cáncer renal en el intrón 4 del gen ALDH9A1, además hay datos importantes que demuestran que la ALDH9A1 regula la expresión de proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Sowa et al., 2009). Adicionalmente, la actividad de BADH se puede ver afectada por algunas enfermedades como la hipertensión, diabetes mellitus, lupus eritematoso sistémico o como consecuencia de un infarto de miocardio: La nefropatía hipertensiva y la diabetes generan estrés hiperosmótico, estos casos representan condiciones de déficit de agua, crisis energética con un bajo nivel de coenzimas y cofactores en el organismo. Bajo las condiciones anteriormente descritas, la energía y la síntesis de ATP se redistribuye para que las células ejerzan las funciones esenciales para mantener la vida del organismo, esto ocasiona un cese en la síntesis de proteínas incluida la BADH. Una disminución en la concentración de pkBADH provocaría la disminución en la síntesis de GB, que adicional a la pérdida de agua por ósmosis y de K⁺ intracelular, causaría la disociación a dímeros de la pkBADH afectando seriamente la osmorregulación y la osmoprotección celular.

6. CONCLUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el K^+ modifica la conformación de la proteína a nivel de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, principalmente en el contenido helicoidal de pKBADH y en la estructura desordenada, con pequeños cambios en la estructura de láminas- β . Los cambios en estructura terciaria principalmente fueron evidentes en la región del sitio de unión a la coenzima con cambios en la exposición y el estado de solvatación de los residuos presentes en esta zona de la proteína. La unión de iones potasio a los sitios intra e inter-subunidad modifican la afinidad con la que pKBADH une NAD^+ mediante un sistema de compensación de energías, que se traduce en pequeños movimientos modificando la flexibilidad o el grado de rigidez de los aminoácidos del sitio de unión a NAD^+ y de los sitios de unión a K^+ , modificando el microambiente que rodea el sitio activo.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda ampliar este estudio mediante el uso de herramientas que permitan determinar parámetros termodinámicos de plegamiento en presencia de ligandos, realizar estudios de simulación mediante dinámica molecular para determinar fuerzas de interacción y transiciones temporales inducidas por ligandos. Además, la utilización de técnicas de sondas espectroscópicas resueltas por tiempo permitiría determinar cambios en la conformación de la cadena proteica a nivel atómico, determinar cambios en la orientación y empaquetamiento de la estructura y evaluar estados de solvatación de la proteína. Adicionalmente se recomienda ampliamente continuar con los experimentos de cristalización para obtener las estructuras cristalinas de pKBADH y así refinar las estructuras a partir de restricciones experimentales.

8. BIBLIOGRAFIA

- Ahvazi B., Coulombe R., Delarge M., Vedadi M., Zhang L., Meighen E. y Vrieling A. 2000. Crystal structure of the NADP⁺ dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity. *Biochemical Journal*, 349(3):853-861.
- Alnouti Y., y Klaassen C.D. 2007. Tissue distribution, ontogeny, and regulation of aldehyde dehydrogenase (Aldh) enzymes mRNA by prototypical microsomal enzyme inducers in mice. *Toxicological sciences*, 101(1):51-64.
- Ambroziak W. y Pietruszko R. 1991. Human aldehyde dehydrogenase. Activity with aldehyde metabolites of monoamines, diamines, and polyamines. *Journal of Biological Chemistry*, 266(20):13011-13018.
- Balsera Diéguez M. (2004). Análisis estructural de la proteína extrínseca psbq del fotosistema ii de plantas superiores. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Facultad de Ciencias Químicas Tesis Doctoral Universidad de Salamanca
- Beck F., Dörge A., y Thurau K. 1988. Cellular osmoregulation in renal medulla. *Kidney and Blood Pressure Research*, 11(3-5):174-186.
- Black S. 1951. Yeast aldehyde dehydrogenase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 34(1):86-97.
- Blanco Santos, A. 2019. Homeostasis del potasio. *Nefrología*, 1(01):10-20.
- 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. *Archives of microbiology*, 168(4):282-289.
- Braun T., Bober E., Singh S., Agarwal D.P. y Goedde H.W. 1987. Evidence for a signal peptide at the amino-terminal end of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *FEBS letters*, 215(2):233-236.
- Brocker C., Cantore M., Failli P. y Vasiliou V. 2011. Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) attenuates reactive aldehyde and oxidative stress induced cytotoxicity. *Chemico-biological interactions*, 191(1):269-277.
- Brown R.S. 1986. Extrarenal potassium homeostasis. *Kidney international*, 30(1):116-127.
- Brigotti M., Petronini P., Carnicelli D., Alfieri R., Bonelli M., Borghetti A., y Wheeler K. 2003. Effects of osmolarity, ions and compatible osmolytes on cell-free protein synthesis. *Biochemical Journal*, 369(2): 369-374.
- Burg M.B., y Ferraris J.D. 2008. Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *Journal of Biological Chemistry* 283(12):7309-7313.
- Burg M.B., Kwon E.D., y Peters E.M. 1996. Glycerophosphocoline and betaine counteract the effect of urea on pyruvate kinase. *Kidney International Supplement* (57):100-104.
- Burg M.B., Ferraris J.D., y Dmitrieva N.I. 2007. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiological reviews*, 87(4):1441-1474.

- Cobessi D., Tête-Favier F., Marchal S., Branlant G. y Aubry A. 2000. Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Journal of molecular biology*, 300(1):141-152.
- Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, S., Azza, S., Branlant, G., y Aubry, A. 1999. Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Journal of molecular biology*, 290(1), 161-173.
- Chambliss K.L. y Gibson K.M. 1992. Succinic semialdehyde dehydrogenase from mammalian brain: subunit analysis using polyclonal antiserum. *International journal of biochemistry*, 24(9):1493-1499.
- Chen Y., Mehta G. y Vasiliou V. 2009. Antioxidant defenses in the ocular surface. *The ocular surface*, 7(4):176-185.
- Chern M.K. y Pietruszko R. 1995. Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochemical and biophysical research communications*, 213(2):561-568.
- Chern M.K. y Pietruszko R. 1999. Evidence for mitochondrial localization of betaine aldehyde dehydrogenase in rat liver: purification, characterization, and comparison with human cytoplasmic E3 isozyme. *Biochemistry and Cell Biology*, 77(3):179-187.
- Delgado-Gaytán M.F., Rosas-Rodríguez J.A., Yepiz-Plascencia G., Figueroa-Soto C.G. y Valenzuela-Soto E.M. 2017. Cloning and molecular characterization of the betaine aldehyde dehydrogenase involved in the biosynthesis of glycine betaine in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemico-biological interactions*. 276: 65–74.
- 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 Physiology*, 158(4):1570-1582.
- Díaz-Sánchez, Á. G., González-Segura, L., Rudiño-Piñera, E., Lira-Rocha, A., Torres-Larios, A., & Muñoz-Clares, R. A. 2011. Novel NADPH–cysteine covalent adduct found in the active site of an aldehyde dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 439(3), 443-455.
- Dragolovich J. y Pierce S.K. 1994. Characterization of partially purified betaine aldehyde dehydrogenase from horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) cardiac mitochondria. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 270(5):417-425.
- Estey T., Cantore M., Weston P.A., Carpenter J.F., Petrash J.M. y Vasiliou V. 2007. Mechanisms involved in the protection of UV-induced protein inactivation by the corneal crystallin ALDH3A1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(7):4382-4392.
- Falkenberg P. y Strøm A.R. 1990. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichiacoli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1034(3):253-259.
- Figueroa-Soto C.G. y Valenzuela-Soto E.M. 2000. Kinetic study of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochemical and biophysical research communications*, 269(2):596-603.
- Fujiwara T., Hori K., Ozaki K., Yokota Y., Mitsuya S., Ichianagi T., Hattori T. y Takabe T. 2008. Enzymatic characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases

in barley. *Physiologia plantarum*, 134(1):22-30.

- 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.
- Gallazzini M., y Burg M. 2009. What's new about osmotic regulation of glycerophosphocholine. *Physiology*, 24(4):245-249.
- González-Segura L., Riveros-Rosas H., Díaz-Sánchez Á.G., Julián-Sánchez A. y Muñoz-Clares R.A. 2013. Potential monovalent cation-binding sites in aldehyde dehydrogenases. *Chemico-biological interactions*, 202(1):41-50.
- González-Segura, L., Velasco-García, R., Rudiño-Piñera, E., Mújica-Jiménez, C., & 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(12), 1056-1064.
- González-Segura L., Rudiño-Piñera E., Muñoz-Clares R.A. y Horjales E. 2009. The crystal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* provides new insight into the reaction mechanism and shows a novel binding mode of the 2'-phosphate of NADP⁺ and a novel cation binding site. *Journal of molecular biology*, 385(2):542-557.
- Grün F., Hirose Y., Kawauchi S., Ogura T. y Umesono K. 2000. Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development. *Journal of Biological Chemistry*, 275(52):41210-41218.
- Gruetz A., Roig-Zamboni V., Grisel S., Salomoni A., Valencia 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. *Journal of molecular biology*, 343(1):29-41.
- Guyton A.C., y Hall J.E. 2006. *Tratado de fisiología médica* Elsevier Brasil.
- Guzman-Partida A.M. y Valenzuela-Soto E.M. 1998. Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 119(3):485-491.
- Halavaty A.S., Rich R.L., Chen C., Joo J.C., Minasov G., Dubrovskaya I., Winsor J.R., Myszkowski D.G., Duban M. y Shuvalova L. 2015. Structural and functional analysis of betaine aldehyde dehydrogenase from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71(5):1159-1175.
- Hall J.E. 2011. Guyton y Hall. *Tratado de fisiología médica*. 12 ed. Elsevier Health Sciences.
- Handler J.S., y Kwon H.M. 1993. Regulation of renal cell organic osmolyte transport by tonicity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 265(6):1449-1455.
- Henrion, M. Y., Purdie, M. P., Scelo, G., Broderick, P., Frampton, M., Ritchie, A., & Houlston, R. S. 2015. Common variation at 1q24. 1 (ALDH9A1) is a potential risk factor for renal cancer. *PLoS one*, 10(3), e0122589.
- Hess D.A., Wirthlin L., Craft T.P., Herrbrich P.E., Hohm S.A., Lahey R., Eades W.C., Creer M.H. y Nolte J.A. 2006. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood*, 107(5):2162-2169.

- Hurley, T. D., Perez-Miller, S., & Breen, H. 2001. Order and disorder in mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Chemico-biological interactions*, 130, 3-14.
- Izaguirre, G., Kikonyogo, A., & Pietruszko, R. 1997. Tissue distribution of human aldehyde dehydrogenase E3 (ALDH9): Comparison of enzyme activity with E3 protein and mRNA distribution. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 118(1), 59–64. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00022-9](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00022-9)
- Johansson K., Ramaswamy S., Eklund H., El-Ahmad M., Hjelmqvist L. y Jörnvall H. 1998. Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein science*, 7(10):2106-2117.
- Julián-Sánchez A., Riveros-Rosas H., Martínez-Castilla L., Velasco-García R. y Muñoz-Clares R. 2007. Phylogenetic and structural relationships of the betaine aldehyde dehydrogenases. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, 13:64-76.
- Klein J.R. y Handler P. 1942. Effect of diphosphopyridine nucleotide on the rate of oxidation of betaine aldehyde. *Journal of Biological Chemistry*, 144(2):537-539.
- Koppaka V., Thompson D.C., Chen Y., Ellermann M., Nicolaou K.C., Juvonen R.O., Petersen D., Deitrich R.A., Hurley T.D. y Vasiliou V. 2012. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacological reviews*, 64(3):520-539.
- Koeppen, M. 2018. Disturbances of the Potassium Homeostasis. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie: AINS*, 53(7-08), 504-514.
- Krupenko S.A. y Oleinik N.V. 2002. 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase, one of the major folate enzymes, is down-regulated in tumor tissues and possesses suppressor effects on cancer cells. *Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research*, 13(5):227-236.
- Kurys G., Ambroziak W. y Pietruszko R. 1989. Human aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of a third isozyme with low Km for gamma-aminobutyraldehyde. *Journal of Biological Chemistry*, 264(8):4715-4721.
- kültz D., y Chakravarty D. 2001. Hyperosmolality in the form of elevated NaCl but not urea causes *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4):1999-2004.
- Lamb A.L. y Newcomer M.E. 1999. The structure of retinal dehydrogenase type II at 2.7 Å resolution: Implications for retinal specificity. *Biochemistry*, 38(19):6003-6011.
- Lindahl R. 1992. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 27(4-5):283-335.
- Lin S.W., Chen J.C., Hsu L.C., Hsieh C.L. y Yoshida A. 1996. Human γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9): cDNA sequence, genomic organization, polymorphism, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*, 34:376-380.
- Liu Z.-J., Sun Y.-J., Rose J., Chung Y.-J., Hsiao C.-D., Chang W.-R., Kuo I., Perozich J., Lindahl R. y Hempel J. 1997. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nature Structural & Molecular Biology*, 4(4):317-326.
- Livingstone J.R., Maruo T., Yoshida I., Tarui Y., Hirooka K., Yamamoto Y., Tsutui N. y Hirasawa E. 2003. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*.

Journal of plant research, 116(2):133-140.

- Marchitti S.A., Brocker C., Stagos D. y Vasiliou V. 2008. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. Expert opinion on drug metabolism & toxicology, 4(6):697-720.
- Moore S.A., Baker H.M., Blythe T.J., Kitson K.E., Kitson T.M. y Baker E.N. 1998. Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. Structure, 6(12):1541-1551.
- Mori N., Kawakami B., Hyakutome K., Tani Y. y Yamada H. 1980. Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpon didymum* M-1. Agricultural and Biological Chemistry, 44(12):3015-3016.
- Mori N., Yoshida N. y Kitamoto Y. 1992. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. Journal of fermentation and bioengineering, 73(5):352-356.
- Muñoz-Bacasehua C. (2017). Efecto de los ligandos de la betaína aldehído deshidrogenasa de cerdo en la conformación del sitio activo. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Son. Tesis de Maestría
- Muñoz-Clares R.A., González-Segura L., Mújica-Jiménez C. y Contreras-Díaz L. 2003. Ligand-induced conformational changes of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves affecting the reactivity of the catalytic thiol. Chemico-biological interactions, 143:129-137.
- Muñoz-Clares R. y Valenzuela-Soto E. 2008. Betaine aldehyde dehydrogenases: evolution, physiological functions, mechanism, kinetics, regulation, structure, and stability. Adv. Protein Phys. Chem., Kerala, India, Res. Sign Post:279-302.
- Muñoz-Clares R.A., Díaz Sanchez Á.G. y Carmina M. 2009. Como convertir a un inhibidor competitivo en incompetitivo: El caso de las Betainas Aldehído Deshidrogenasas Mensaje Bioquímico 33.
- Muñoz-Clares R.A., Díaz-Sánchez Á.G., González-Segura L. y Montiel C. 2010. Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: Mechanistic and regulatory implications. Archives of biochemistry and biophysics, 493(1):71-81.
- Muñoz-Clares R.A., González-Segura L. y Díaz-Sánchez Á.G. 2011. Crystallographic evidence for active-site dynamics in the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. Implications for the deacylation step of the catalyzed reaction. Chemico-biological interactions, 191(1):137-146.
- Muñoz-Clares, R. A., González-Segura, L., Murillo-Melo, D. S., Riveros-Rosas, H. (2017). Mechanisms of protection against irreversible oxidation of the catalytic cysteine of ALDH enzymes: Possible role of vicinal cysteines. Chemico-biological interactions, 276, 52-64.
- Nakamura T., Yokota S., Muramoto Y., Tsutsui K., Oguri Y., Fukui K. y Takabe T. 1997. Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. The Plant Journal, 11(5):1115-1120.
- Nagarajan S., Taskent-Sezgin H., Parul D., Carrico I., Raleigh D.P. y Dyer R.B. 2011. Differential ordering of the protein backbone and side chains during protein folding revealed by site-specific recombinant infrared probes. Journal of the American Chemical Society,

133(50):20335-20340.

- Nagasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y., & Qgata, K. 1976. Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *pseudomonas aeruginosa* a-16. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40(9), 1743–1749.
- Neuhof W., y Beck F. 2006. Survival in hostile environment. Strategies of renal medullary cells. *Physiology*, 21(3):171-180.
- Oishi H. y Ebina M. 2005. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *Journal of plant physiology*, 162(10):1077-1086.
- Pappa A., Chen C., Koutalos Y., Townsend A.J. y Vasiliou V. 2003. Aldh3a1 protects human corneal epithelial cells from ultraviolet-and 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(9):1178-1189.
- Perez-Miller S.J. y Hurley T.D. 2003. Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry*, 42(23):7100-7109.
- Perrino L.A. y Pierce S.K. 2000. Betaine aldehyde dehydrogenase kinetics partially account for oyster population differences in glycine betaine synthesis. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 286(3):238-249.
- Pietruszko R. y Chern M.-K. 2001. Betaine aldehyde dehydrogenase from rat liver mitochondrial matrix. *Chemico-biological interactions*, 130:193-199.
- Reichard J.F., Vasiliou V. y Petersen D.R. 2000. Characterization of 4-hydroxy-2-nonenal metabolism in stellate cell lines derived from normal and cirrhotic rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1487(2):222-232.
- Rice K.L., Izon D.J., Ford J., Boodhoo A., Kees U.R. y Greene W.K. 2008. Overexpression of stem cell associated ALDH1A1, a target of the leukemogenic transcription factor TLX1/HOX11, inhibits lymphopoiesis and promotes myelopoiesis in murine hematopoietic progenitors. *Leukemia research*, 32(6):873-883.
- Riveros-Rosas, H., González-Segura, L., Julián-Sánchez, A., Díaz-Sánchez, Á. G., & Muñoz-Clares, R. A. 2013. Structural determinants of substrate specificity in aldehyde dehydrogenases. *Chemico-biological interactions*, 202(1-3), 51-61.
- Rosas-Rodríguez J.A. 2010. Cambios en la estabilidad estructural y el estado redox de BADH renal frente a estrés oxidativo. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Son. : 48. Tesis de Doctorado
- Sophos N.A. y Vasiliou V. 2003. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chemico-biological interactions*, 143:5-22.
- Steinmetz C.G., Xie P., Weiner H. y Hurley T.D. 1997. Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure*, 5(5):701-711.
- 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. *Journal of molecular biology*, 396(4):870-882.
- Valenzuela-Soto E., Ayala-Castro H., Muñoz-Clares R., Maser E., Plapp B., Lindahl R. y Weiner H. 2005. Effects of monovalent and divalent cations on the thermostability of porcine kidney

betaine aldehyde dehydrogenase. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, 12:104-109.

Valenzuela-Soto E.M. y Muñoz-Clares R. 1993. Betaine-aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an Iso Ordered Bi Bi steady state mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 268(32):23818-23823.

Valenzuela-Soto E.M. y Muñoz-Clares R.A. 1994. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *Journal of plant physiology*, 143(2):145-152.

Valenzuela-Soto E.M., Velasco-García R., Mújica-Jiménez C. y Muñoz-Clares R.A. 2003. Monovalent cations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidney and amaranth leaves. *Chemico-biological interactions*, 143:139-148.

Vasiliou V., Bairoch A., Tipton K.F. y Nebert D.W. 1999. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics and Genomics*, 9(4):421-434.

Vasiliou V., Pappa A. y Estey T. 2004. Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drug metabolism reviews*, 36(2):279-299.

Vasiliou V., Pappa A. y Petersen D.R. 2000. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chemico-biological interactions*, 129(1):1-19.

Vaz F.M., Fouchier S.W., Ofman R., Sommer M. y Wanders R.J. 2000. Molecular and biochemical characterization of rat γ -trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(10):7390-7394.

Velasco-García R., González-Segura L. y Muñoz-Clares R.A. 2000. Steady-state kinetic mechanism of the NADP^+ and NAD^+ dependent reactions catalysed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Journal*, 352(3):675-683.

Von Tigerstrom R.G. y Razzell W. 1968. Aldehyde Dehydrogenase I. Purification and properties of the enzyme from *pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 243(10):2691-2702.

Wei B., Ni L., Hurley T.D. y Weiner H. 2000. Cooperativity in nicotinamide adenine dinucleotide binding induced by mutations of arginine 475 located at the subunit interface in the human liver mitochondrial class 2 aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry*, 39(18):5295-5302.

Weiner, H., Wei, B., & Zhou, J. 2001. Subunit communication in tetrameric class 2 human liver aldehyde dehydrogenase as the basis for half-of-the-site reactivity and the dominance of the oriental subunit in a heterotetramer. *Chemico-biological interactions*, 130, 47-56.

Weretilnyk E.A. y Hanson A.D. 1990. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(7):2745-2749.