

centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.

REGULACIÓN POR CATIONES MONO Y
DIVALENTES DE LA BETAÍNA ALDEHÍDO
DESHIDROGENASA DE RIÑÓN DE CERDO

POR:

HECTOR GUMERCINDO AYALA CASTRO

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

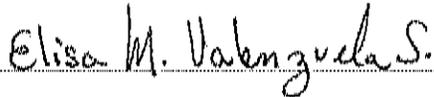
MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA.

FEBREIRO DEL 2004

APROBACIÓN

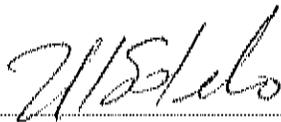
Los miembros del comité designado para revisar la tesis del I.B.Q. Hector Gumerindo Ayala Castro, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto
Director de Tesis



M.C. Ciria Guadalupe Figueroa Soto



Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo



Dr. Humberto Astiazarán García

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por permitirme ingresar al programa y hacer uso de las instalaciones.

Al departamento de Ciencia de los Alimentos por permitirme realizar mis estudios en esta dirección.

A la Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto por permitirme participar este proyecto, su dirección académica y consejos atinados, gracias por brindarme su confianza.

A la M.C. Ciria Guadalupe Figueroa Soto por el apoyo técnico y compartir su experiencia, además de un recorrido cultural, y sobre todo gracias por su paciencia.

A mi comité de tesis integrado por M.C. Ciria Guadalupe Figueroa Soto, Dr. Rogerío R. Sotelo Mundo y el Dr. Humberto Astíazarán García por su apoyo y consejos para enriquecer este trabajo.

Al M.C. Jorge Alberto Márquez Escalante por sus consejos y porque siempre conté con su apoyo.

A la Dra. Rosario Muñoz Clares de la facultad de química de la UNAM por permitirme realizar parte de este trabajo en su laboratorio, así como también a Carlos Mújica por el apoyo técnico.

A Gabriela Ramos por el apoyo en éste trabajo, a Ana María Guzmán y Cuquis por prestarme sus equipos.

Al personal de microbiología por permitirme usar sus instalaciones.

A mis hermanos enzimosos Juan Pablo y Varinia.

A Alexis (el caballo) por su apoyo técnico.

A toda mi generación (con toda se incluyen a todos aunque no ponga nombres).

A Nidia Y Cony por saber escucharme y tolerarme.

Anita, Arita y Yerén ya es hora de comer?

A Rafael Jiménez por compartir su experiencia.

DEDICATORIA

A dios, porque por el estoy aquí.

A mis padres Rosario Héctor Ayala Astorga y Jesús Guadalupe Castro Quintero quienes me han brindado su apoyo incondicional, gracias por depositar su confianza en mí.

A mis hermanas Flor Guadalupe Ayala Castro, Belén Rosario Ayala Castro y mi sobrinito Dinael por estar siempre conmigo.

A toda mi familia porque siempre me han apoyado.

A la Dra. Elisa Valenzuela y la M.C. Ciria Figueroa porque han sido parte importante en estos años.

"Los ideales que han iluminado mi camino y una y otra vez me han infundido valor para enfrentarme a la vida. Han sido la bondad, la belleza y la verdad."

Albert Einstein

INDICE

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xiii
RESUMEN.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
Características Bioquímicas y Cinéticas de la BADH.....	4
Función de la glicina betaína	5
En microorganismos.....	7
En plantas.....	8
En animales	9
Localización de la Betaína Aldehído Deshidrogenasa.....	10
Cationes mono y divalentes en la célula	11
En plantas.....	11
En bacterias	12
En animales	12
Efecto de cationes sobre las Aldehído deshidrogenasas	13
Efecto de cationes monovalentes sobre la BADH	14
Métodos para estudiar cambios en la estabilidad de las proteínas.....	15
Estructura cuaternaria.....	15
Estructura terciaria	15

MATERIALES Y METODOS	18
Purificación de la enzima	18
Ensayo de actividad.....	18
Efecto de cationes mono y divalentes sobre la actividad de la BADH.....	19
Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad.....	19
Efecto de cationes sobre la estabilidad de la enzima	19
Efecto de cationes sobre la estabilidad térmica de la enzima	20
Efecto de cationes sobre la estabilidad de la enzima frente a pH	20
Efecto de cationes sobre la estabilidad de la enzima frente a proteasas	21
Análisis cinético	21
Efecto de cationes sobre la estructura cuaternaria y terciaria de la BADH	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Efecto de cationes mono y divalentes sobre la actividad de la BADH.....	23
Efecto de cationes mono y divalentes sobre la estabilidad de la enzima	26
Efecto de cationes mono y divalentes sobre la estabilidad térmica de la enzima	30
Estabilidad de la enzima frente a pH.....	32
Efecto de cationes monovalentes sobre la estabilidad de la enzima frente a proteasas	36
Efecto de cationes mono y divalentes sobre la estructura terciaria de la enzima	43
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFIA	49

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Efecto de la concentración de KCl sobre la actividad de la BADH de riñón	24
2 Efecto de la concentración de MgCl ₂ (□) y CaCl ₂ (△) sobre la actividad de la BADH de riñón.....	24
3 Cambios en la conformación de la BADH en ausencia de K ⁺ , tetrámero (T), dímero (D) y monómero (M).....	25
4 Cambios en la conformación de la BADH de riñón en presencia de KCl 0.2 M, tetrámero (T).....	26
5 Cinética de inactivación de la BADH de riñón en ausencia de K ⁺	27
6 Cinética de reactivación de la BADH de riñón por cationes monovalentes, K ₂ SO ₄ (◇), Na ₂ SO ₄ (▽).....	28
7 Cinética de reactivación de la BADH de riñón por cationes divalentes, MgCl ₂ (□), CaCl ₂ (△) y MnCl ₂ (▽).....	29
8 Efecto de cationes mono y divalentes sobre la actividad de la BADH de riñón incubada a 55°C. MgCl ₂ (□), NaCl (□), KCl (○), Na ₂ SO ₄ (▽), K ₂ SO ₄ (◇), CaCl ₂ (△).....	32
9 Efecto del pH y composición del buffer sobre la actividad de la BADH de riñón. Hepes pH 8.0 (○), Hepes pH 7.0 (●) y Tris pH 8.0 (□).....	33
10 Efecto del NAD ⁺ sobre la inactivación de la BADH de riñón por pH y tipo de amortiguador. Hepes pH 8.0 (○), Hepes pH 7.0 (●) y Tris (□).....	34

11	Efecto del BA sobre la inactivación por buffer y pH. Hepes pH 8.0 (○), Hepes pH 7.0 (●) y Tris (□).....	35
12	Efecto de la Tripsina (□) y α-Quimotripsina (■) sobre la estabilidad de la BADH de riñón.....	36
13	Efecto de KCL sobre la inactivación de la BADH de riñón por tripsina. BADH en presencia de tripsina y ausencia (□) y en presencia (○) de KCL.	37
14	Protección de la BADH de riñón por NAD ⁺ frente a la inactivación por tripsina. BADH más tripsina en ausencia (□) y en presencia (▽) de NAD ⁺	38
15	Protección de la BADH de riñón por BA ante la inactivación por tripsina. BADH más tripsina en ausencia (□) y en presencia (△) de BA.....	39
16	Efecto de KCL sobre la la inactivación por α-quimotripsina de la BADH de riñón. BADH más α-quimotripsina en ausencia (■) y presencia (○) de KCl 0.2 M.....	40
17	Efecto del NAD ⁺ sobre la inactivación de la BADH de riñón por α- Quimotripsina. BADH más quimotripsina en ausencia (■) y presencia (▽) de NAD ⁺ 1 mM.....	41
18	Efecto de BA frente a la inactivación de la BADH de riñón por α- Quimotripsina. BADH más quimotripsina en ausencia (■) y presencia (▽) de BA 0.5 mM.....	42
19	Espectro de fluorescencia de la BADH de riñón en ausencia de cationes.....	43
20	Espectro de fluorescencia de la BADH de riñón en presencia de KCl 0.2 M	44

21 Espectro de fluorescencia de la BALDH de riñón en presencia de $MgCl_2$ 1 mM.....	45
--	----

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1 Constantes cinéticas de la betaina aldehído deshidrogenasa de diferentes fuentes.....	6
2 Efecto de la temperatura sobre la BADH de riñón.....	31
3 Efecto de cationes y sustratos sobre la estructura terciaria.....	46

RESUMEN

Existen reportes en la literatura que la betaína aldeído deshidrogenasa es activada por potasio y dependiendo de la fuente de donde se obtenga la enzima, esta puede tener un requerimiento estricto o no por potasio para mantener su actividad. A la fecha no se ha determinado el mecanismo por el cual el potasio tiene los efectos antes mencionados sobre la enzima.

En este trabajo se estudió el efecto de cationes mono y divalentes sobre la actividad y/o estabilidad de la BADH de riñón de cerdo. Se encontró que el K^+ no tuvo efecto sobre la actividad, mientras que los cationes divalentes Mg^{++} y Ca^{++} tuvieron un efecto inhibitorio. Mediante cromatografía de exclusión molecular se encontró que la BADH en ausencia de K^+ se desagrega formando dímeros y monómeros. Y en su presencia está mayormente en forma de tetrameros. Lo cual sugiere que el potasio puede tener efectos sobre la estabilidad de la proteína.

Para estudiar los cambios en la estabilidad de la proteína, se inactivó a la enzima mediante la remoción de K^+ , al añadirle cationes mono y divalentes se logró reactivar a la enzima con K^+ , Na^+ y Mg^{++} . Al estudiar el efecto de los cationes sobre la desnaturalización térmica, se encontró que la enzima en presencia de cationes mono y divalentes conserva un 50% de su actividad, excepto con Ca^+ y Mn^{++} .

Se estudió el efecto del tipo de buffer y pH, encontrándose que la enzima es más estable a pH 8 que a pH 7 y que es más estable en amortiguador Hepes que en Tris. El sustrato NAD^+ protege a la enzima de la inactivación por PH, mientras que BA no tiene el mismo efecto.

Se analizó el efecto de potasio sobre la inactivación causada por la actividad proteolítica de tripsina y quimotripsina. En ausencia de potasio, la tripsina tiene un efecto más inhibitorio que la alfa-Quimotripsina con constantes de inactivación de $16.48 M^{-1}min^{-1}$ y $3.78 M^{-1}min^{-1}$ respectivamente. En presencia de $KCl 0.2 M$, se encontró que este catión protege alrededor de un 90% a la BADH contra el efecto inactivador de dichas proteasas.

Se hicieron estudios de fluorescencia para conocer los cambios en la estructura terciaria provocados por los cationes y sustratos. En estos estudios se encontró que el K^+ no cambia la intensidad de la fluorescencia de la enzima, sin embargo afecta la longitud de onda de emisión máxima. El Mg^{++} por su parte no modifica ni provoca dichos cambios. La unión del sustrato NAD^+ en ausencia y en presencia de potasio muestra una intensidad de fluorescencia diferente, efecto

INTRODUCCIÓN

La betaina aldehído deshidrogenasa (BADH EC 1.2.1.8) cataliza el último paso en la vía de síntesis de la glicina betaina, el cual es un osmolito ampliamente distribuido en la naturaleza (Valenzuela-Soto y Muñoz Clares, 1994; Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998; Velasco-García *et al.*, 1999).

La glicina betaina se acumula en la médula renal, para balancear las altas concentraciones de solutos externos y minimizar el gradiente osmótico de la membrana celular. De hecho la médula renal es el único tejido en mamíferos que normalmente experimenta grandes cambios de tonicidad (Handler y Kwon, 1993).

La BADH ha sido purificada a homogeneidad a partir de diferentes plantas, microorganismos y animales tales como: espinaca, amaranto, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas translucens*, *Cylindrocarpon didymium* y riñón de cerdo (Mori *et al.*, 1980; Weretilnyk y Hanson, 1989; Falkenberg y Strom, 1990; Mori *et al.*, 1992; Valenzuela-Soto y Muñoz Clares, 1994; Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998; Velasco-García *et al.*, 1999; Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000).

La BADH esta localizada en la médula renal sitio en el cual las concentraciones de Na^+ y urea son elevadas obligando de esta manera a la enzima a funcionar bajo condiciones de alta fuerza iónica (Handler y Kwon, 1993).

En estudios previos con BADH de diferentes fuentes se ha encontrado que la enzima es regulada por iones K^+ , quedando pendiente la identificación del mecanismo por el cual estos iones pueden regular a la enzima. En plantas de amaranto se observó

que el K^+ incrementó la actividad de la enzima en un 100% a una concentración de 50 mM y 50% a 150 mM. A 400 mM de KCl, la actividad fue 10% más baja que en su ausencia. Bajo condiciones de baja concentraciones de sustrato, el efecto inhibitorio de Na^+ se observó en todas las concentraciones analizadas. La enzima fue totalmente inhibida cuando adicionaron 300 mM de NaCl. El NH_4^+ fue el inhibidor más potente de la BADH de amaranto, la inhibición total se observó a una concentración de 150 mM (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994).

Durante el estrés hídrico muchas células acumulan K^+ . Por lo tanto, la activación de BADH y tolerancia a altas concentraciones de K^+ incluso en bajas concentraciones de sustrato puede tener un significado biológico (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994).

Dicha regulación puede darse a través de cambios en la estabilidad de la enzima y/o a través de un proceso de activación. Es importante identificar cuál de dichos mecanismos es el que ocurre y los cambios que ocurren en su estructura. Por lo que en este trabajo se planteo el objetivo de estudiar el efecto de cationes mono y divalentes sobre la actividad y/o estabilidad de la betaína aldehído deshidrogenasa de riñón de cerdo.

ANTECEDENTES

La betaína aldehído deshidrogenasa (EC:1.2.1.8 BADH:NAD-oxido reductasa) cataliza la reacción de oxidación de la betaína aldehído a glicina betaina de acuerdo a la siguiente ruta.



El primer paso es catalizado por la colina deshidrogenasa (EC 1.1.99.1 CDH).

La BADH ha sido purificada a homogeneidad a partir de animales, plantas y microorganismos. En plantas se ha purificado a partir de *Spinacia oleracea*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthus palmieri* (Weretilnyk y Hanson, 1989; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2001).

En bacterias se ha purificado a partir de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas translucens*, *Cylindrocarpum didymium* (Mori *et al.*, 1980; Falkenberg y Strom, 1990; Mori *et al.*, 1992; Velasco-García *et al.*, 1999). En animales se ha purificado a partir de hígado humano, riñón de cerdo e hígado de rata, (Chern y Pietruszko, 1995; Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998; Chern y Pietruszko, 1999).

En plantas se ha demostrado que la actividad de la BADH se incrementa en respuesta al estrés hídrico (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994).

Características Bioquímicas y Cínéticas de la BADH

La BADH se puede encontrar como homotetrámero con masas moleculares de 219 a 213 kDa en bacterias y animales mamíferos (Falkenberg y Strom, 1990; Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998; Velasco-García *et al.*, 1999). En plantas esta enzima se encuentra como dímero de 125 kDa (Weretilnyk y Hanson, 1989; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). En todos los organismos las masas moleculares de las subunidades varían entre 63 y 40 kDa (Weretilnyk y Hanson, 1989; Falkenberg y Strom, 1990; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998; Velasco-García *et al.*, 1999).

En base a estudios cristalográficos, se ha reportado que la BADH de hígado de bacalao tiene tres dominios: un dominio de unión de la coenzima, un dominio catalítico y un dominio de oligomerización. El tetrámero está formado por dímeros que interactúan espalda con espalda en el lado opuesto a donde se une la coenzima. Los dos dominios de oligomerización del dímero forman enlaces de hidrógeno con las partes correspondientes del otro dímero (Johansson *et al.*, 1998).

Se ha encontrado que la BADH puede usar diferentes aldehídos como sustrato, por ejemplo acetaldehído, gliceraldehído, benzaldehído, *N,N* - dimetilglicina, sin embargo la enzima presenta una marcada preferencia por betaina aldehído (BA) (Chern y Pietruszko, 1995; Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998). Por ejemplo, para la BADH de microorganismos como *E. coli*, la *K_m* para BA es de 160 μ M (Falkenberg y

Strom, 1990), para *Xanthomonas translucens* es de 190 μM (Mori *et al.*, 1992) y para *Cylindrocarpon didymum* M-1 es 310 μM (Mori *et al.*, 1980) (Tabla 1).

En plantas como *Amaranthus hypochondriacus* L. la K_m para BA es de 56 μM (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993). En animales, se ha reportado para la BA de riñón de cerdo un valor de K_m de 145.5 μM (Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000).

Por otra parte, se ha visto que la BADH puede usar como coenzima NAD^+ o NADP^+ dependiendo de la fuente de la enzima (Tabla 1). En general, todas las BADH estudiadas prefieren al NAD^+ como coenzima, sin embargo algunas como *P. aeruginosa* prefieren utilizar al NADP^+ (Tabla 1) y también se ha encontrado que la enzima tiene más afinidad por la coenzima que por BA.

Al igual que con la especificidad por la coenzima, la BADH sigue diferentes mecanismos cinéticos dependiendo de la fuente de donde proviene. Se ha reportado que la enzima de *E. coli* sigue un mecanismo Ping Pong (Falkenberg *et al.*, 1990). Mientras que en amaranto y en riñón el mecanismo es Iso Bi Bi Ordenado (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993, Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000).

Función de la glicina betaína

Un requerimiento fundamental de la función celular es mantener el control interno con respecto a las condiciones externas de intercambio. Con frecuencia el medio ambiente externo es adverso para la célula, por ello la célula debe contar con estrategias para sobrevivir a dicho ambiente. Una de estas estrategias es la síntesis y acumulación de solutos orgánicos de bajo peso molecular llamados osmolitos o solutos compatibles

(Wyn Jones y Storey, 1981, Yancey *et al.*, 1982; Hoekstra *et al* 2001). Los principales osmolitos que se acumulan en las células son: glicina betaína, prolina, sorbitol, manitol, inositol, glicerol, β -alanina y los disacáridos, sacarosa y trehalosa (Yancey *et al.* 1982; Hoekstra *et al* 2001).

Tabla 1. Constantes cinéticas de la betaína aldehído deshidrogenasa de diferentes fuentes

Fuente	K_m (μM)		
	BA	NAD ⁺	NADP
Microorganismos			
<i>Cylindrocarpon didymum</i> M-1	310	380	
<i>Escherichia coli</i>	160	99	400
<i>Xanthomonas translucens</i>	190	70	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	380	220	89
<i>Arthrobacter Globiformis</i>	36	1075	48
Plantas			
<i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	56.1	39.5	2500
<i>Spinacia olearasa</i>	208, 255	20, 34.5	320
Animales			
Riñón de cerdo	145.5	44.5	
Hígado de humano (Citoplasma)	260	35	
Cerebro	260	4-14	
Hígado de rata			
Citoplasma	123	28	
Mitochondria	118	34	
Corazón de Cangrejo (Mitochondria)	133	22	

La glicina betaína (N,N,N-trimetilglicina) recibe su nombre de la remolacha (*Beta vulgaris*), de la cual se aisló por primera vez. Esta base orgánica, ahora usualmente llamada glicina betaína, posteriormente se encontró que se acumula en la mayoría de las células sometidas a estrés osmótico (Chambers y Lever, 1996).

En microorganismos

Los microorganismos con frecuencia se ven expuestos a estrés salino y responden a este aumento en el potencial osmótico acumulando solutos orgánicos para contrarrestar la pérdida de agua y disminuir la presión de turgencia (Poolman y Glassker, 1998). Uno de los principales osmolitos acumulados por microorganismos bajo condiciones de estrés osmótico es la glicina betaína (Kempf y Bremen, 1998).

Se ha propuesto que la glicina betaína en microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Azospirillum brasilense*, *Brevibacterium linens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus plantarum*, *Vibrio costicola*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, etc. protege a las proteínas de las membranas celulares y a las enzimas del daño por altas concentraciones de sal (Le Rudulier y Bouillard, 1983; Imhoff y Rodríguez-Valera, 1984; Perroud y Le Rudulier, 1985; Riou y Le Rudulier, 1990; Choquet *et al.*, 1991; Casale *et al.*, 1994; Jebbar *et al.*, 1995; Glassker *et al.*, 1996; Vijaranakul *et al.*, 1997; Kempf y Bremen, 1998).

Por otra parte, Meury (1988) reportó que la glicina betaína revierte el efecto del estrés osmótico sobre la replicación del DNA y la división celular en *E. coli*.

En microorganismos, la glicina betaína se obtiene directamente del medio externo o se sintetiza a partir de colina, de acuerdo a la vía de síntesis anteriormente expuesta. En la cianobacteria *Aphanotheca halophytica*, la glicina betaína es sintetizada a través de una serie de transmetilaciones usando glicina o etanolamina como grupo aceptor del metilo (Sibley y Yopp, 1987).

Se han reportado una serie de sistemas de transporte de glicina betaína en diferentes microorganismos, por ejemplo en *E. coli* y *S. typhimurium* se ha reportado el gene *proU* el cual codifica para una proteína de 31 kDa la cual es un sistema de transporte de alta afinidad para glicina betaína (Sutherland *et al.*, 1986, Barron *et al.*, 1987). Se ha propuesto que el gene *proU* esta bajo regulación osmótica (Barron *et al.*, 1987) y que dicha regulación se lleva a cabo a través de efectos aditivos de al menos tres mecanismos separados, representados por elementos *cis* P1R, P2R y NRE (Gowrishankar y Manna, 1996). También se han reportado los genes *proP*, el cual ha sido menos estudiado que *proU* y el gene *putP* (Culham *et al.*, 1994).

En plantas

Algunas plantas sintetizan y acumulan glicina betaína bajo condiciones de estrés hídrico (Wyn Jones *et al.* 1977). A continuación se detallan algunos estudios sobre este fenómeno.

Zhao (1992) en experimentos con alfalfa, demostró que la glicina betaína modifica la temperatura a la cual se observa el daño por congelación, incrementando así la resistencia a la congelación y este efecto se debió a que la glicina betaína protegió a las membranas celulares.

En estudios con tabaco se encontró que la acumulación de glicina betaína en las hojas, se relacionó con un aumento en la recuperación de la foto-inhibición y del estrés salino (Holmström *et al.*, 1996). El aumento en la tolerancia a la foto-inhibición también se encontró en condiciones de baja temperatura (Holmström *et al.*, 1996).

La protección de la estructura y función de la membrana por glicina betaína fue demostrada bajo tratamientos químicos y térmicos en células de remolacha (Zhao *et al*, 1992). En ambos casos, la glicina betaína disminuyó perceptiblemente la salida de betaecianina. Parece probable que el mecanismo de protección de la membrana en las dos circunstancias es similar, aunque hasta ahora es desconocido. Se ha propuesto que la glicina betaína tiene la habilidad para ofrecer protección significativa a las membranas y otros componentes macromoleculares de la célula (Paleg *et al*, 1984) en plantas intactas así como en tejidos (Zhao *et al*, 1992).

Atsmon *et al*, (1986) en estudios con trigo, encontraron que la acumulación de glicina betaína en concentraciones altas y bajas en la planta no presenta diferencias genéticas. Sin embargo, sí encontraron diferencias para los niveles de glicina betaína en su totalidad. También, estos autores encontraron que los niveles de glicina betaína son controlados por genes osmorreguladores los cuales tienen efectos pleiotrópicos, cuyos alelos confieren varios niveles de potencial osmótico. En este caso, las diferencias en glicina betaína actuarían como un marcador para diferencias genéticas en potencial osmótico.

En animales

La glicina betaína se ha encontrado en hígado y en riñón de mamíferos. En el hígado, la glicina betaína funciona como un eficiente donador de grupos metilo para la síntesis de colina y creatina (Du Vigneaud *et al*, 1944), así como también para la regeneración de moléculas de metionina (Muntz, 1949; Davies *et al*, 1992).

En el riñón, la glicina betaina juega un importante papel en el balance de la presión osmótica debido a las altas concentraciones de NaCl, esta acumulación se presenta en el fluido tubular e intersticial como parte del mecanismo concentrador de orina (Bagnasco *et al.* 1986, Gullans *et al.* 1988, García-Perez y Burg 1991; Nakanishi *et al.*, 1993). De hecho el riñón es el único tejido de los mamíferos que normalmente experimenta grandes cambios de tonicidad (Handler y Kwon, 1993).

Moeckel y Lien (1997) encontraron que la glicina betaina sintetizada en el riñón, es acumulada en la médula renal y éste proceso depende del estado de deshidratación *in vivo*. La antidiuresis incrementa la síntesis de glicina betaina en la corteza y su acumulación en la médula. Por otra parte, se ha visto que la acumulación de glicina betaina se ve disminuida si hay inhibición de su síntesis, si ésta se transporta a nivel tubular, así como durante la diuresis (Beck *et al.*, 1998). Estos resultados indican que la síntesis de glicina betaina renal juega un papel importante en la osmorregulación en la médula del riñón.

Localización de la Betaina Aldehído Deshidrogenasa

A la fecha se han reportado diferentes tejidos y compartimentos subcelulares que sintetizan y acumulan glicina betaina. En plantas de espinaca la enzima esta localizada en las hojas, mayoritariamente en los cloroplastos y esta presente en mucha menor cantidad en el citoplasma (Weigel *et al.*, 1986). Por otro lado, Nakamura y col. (1997) demostraron la localización de la BADH en los peroxisomas de las hojas de plantas de arroz.

En mamíferos, se ha reportado que la BADH esta presente en hígado, cerebro, glándula adrenal, páncreas, músculo esquelético, músculo cardíaco y riñón (Chern y Pietruszko, 1995; Pietruszko *et al.*, 1996; Izaguirre *et al.*, 1997; Guzman-Partida y Valenzuela-Soto, 1998). En riñón de cerdo la BADH está localizada en la corteza y en la médula (Figuroa-Soto *et al.*, 1999). En la médula interna, la BADH está localizada específicamente en las células que rodean los túbulos (Figuroa-Soto *et al.*, 1999). Chern y Pietruszko (1999) demostraron que la BADH de hígado de rata está localizada en la matriz mitocondrial.

Cationes mono y divalentes en la célula

En plantas

Muchas células acumulan Na^+ y K^+ como primera respuesta a la falta de agua, lo cual implica que muchas enzimas y entre ellas la BADH, deben ser activas en un medio de alta fuerza iónica (Yeo, 1998). Se ha reportado que las plantas pueden acumular hasta 0.3 M de potasio en el cloroplasto (Hanson y Hitz, 1982), sin embargo el sodio tiene que ser excluido de los organelos ya que es inhibidor de un gran número de enzimas (Hanson y Hitz, 1982).

Por su parte el calcio y el magnesio generalmente no se acumulan en altas concentraciones en las células vegetales ya que son parte de estructural de proteínas y enzimas (Voet, 1995). La concentración de calcio en éstas células se encuentra en el intervalo de 0.1 a 10 mM (Trewavas, 1999). Generalmente el calcio se encuentra unido

a proteínas y la concentración de calcio libre en el citoplasma es de 10 a 200 nM (Trewavas, 1999). El magnesio se encuentra en la célula en concentraciones que varían entre 0,1 y 50 mM (Schröppel-Meier y Kaiser, 1988).

En bacterias

Las bacterias en ocasiones pueden verse sometidas a medios ambientes salinos principalmente a NaCl (Yancey *et al.*, 1989). Al igual que las células vegetales las bacterias manejan bajas concentraciones de calcio y magnesio por las mismas razones que las células vegetales (Voet, 1995). En cambio pueden acumular altas concentraciones de potasio, por ejemplo *Klebsiella aerogenes* acumula 625 mM de éste ión bajo condiciones de 1 M de NaCl en el medio de cultivo (Yancey *et al.*, 1989). Sin embargo no acumulan altas concentraciones de sodio debido a la toxicidad del Na⁺ sobre las enzimas (Voet, 1995).

En animales

Las células que rodean los túbulos proximales en el riñón pueden estar expuestas a concentraciones de sodio de hasta 1 M (orina concentrada) (Guyton, 1981). Por su parte el NH₄⁺ se encuentra en la orina del hombre a concentraciones relativamente altas (aproximadamente 0.04 M) si se compara con la sangre, ya que se sintetiza en las células epiteliales de los túbulos renales como parte del sistema amortiguador que transporta el exceso de iones H⁺ (Strand, 1983). Se sabe que al haber un incremento en las concentraciones intracelulares de sodio se estimula a la ATPasa Na⁺-K⁺, para eliminar

Na^+ y reemplazarlo por K^+ el efecto neto es entonces la ganancia temporal de K^+ (Higgins *et al.* 1987; Beck *et al.*, 1988).

Por su parte el NH_4^+ no se almacena intracelularmente debido a su alta toxicidad, ya que se combina enzimáticamente con glutamato para producir glutamina y finalmente urea (Voet, 1995). En cuanto al Mg^{++} es reabsorbido por todas las porciones de los túmulos renales y conductos colectores (Guyton, 1981). Sin embargo intracelularmente el Mg^{++} nunca alcanza concentraciones mayores de 0.058 M (Guyton, 1981).

Efecto de cationes sobre las Aldehído deshidrogenasas

Varias enzimas requieren cationes para su máxima actividad ya que afectan las constantes cinéticas de la reacción y/o tienen un papel en la estabilización de la conformación activa de la enzima (McQuenney y Markham, 1995; Ahmad *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1997). K^+ y NH_4^+ son los mejores activadores o estabilizadores para muchas enzimas, mientras que Na^+ y Li^+ no tienen ese efecto o inhiben a las enzimas (McQuenney y Markham, 1995; Ahmad *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1997).

Entre las aldehído deshidrogenasas, sólo la enzima mitocondrial de *Sacharomices cerevtsiae* requiere de K^+ para su actividad (Dickinson, 1987). Mientras que la aldehído deshidrogenasa citoplasmática de ésta levadura requiere de Mg^{++} para su actividad y estabilidad (Dickinson, 1996; Dickinson, 2003).

Efecto de cationes monovalentes sobre la BADH

Se ha propuesto que la BADH de *E. coli*, la de hojas de amaranto, de *Bacillus subtilis*, de riñón de cerdo y la de cangrejo son activadas en algún grado por K^+ (Falkenberg y Strom, 1990; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Dragolovich y Pierce, 1994; Boch *et al.*, 1997; Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998). Por otro lado, recientemente se encontró que la BADH de *P. aeruginosa* tiene un requerimiento estricto por iones K^+ para el mantenimiento de su conformación activa, quedando pendiente la identificación del mecanismo por el cual estos iones pueden regular a la enzima (Valenzuela-Soto *et al.*, 2003).

En plantas de amaranto se observó que el K^+ a baja concentración (50 mM) aumentó 100% la actividad de la BADH, mientras que 150 mM aumentó la actividad un 150% a concentraciones subsaturantes de sustrato. Altas concentraciones de KCl (0.4 M) no afectaron de manera importante la actividad de la enzima. (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994)

En estudios con NaCl, bajo condiciones de concentraciones de sustrato subsaturantes, se observó un efecto inhibitorio de Na^+ en todas las concentraciones analizadas. La enzima fue totalmente inhibida cuando se adicionaron 300 mM de NaCl. Por otra parte, el NH_4^+ fue el inhibidor más potente de la BADH de amaranto, la inhibición total se observó a una concentración de 150 mM (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994).

El ión K^+ es necesario para estabilizar a la BADH de *P. aeruginosa* en amortiguador Tris (Velasco-García *et al.*, 1999). En *Vibrio costicola* no se encontró un

efecto inhibitorio para la BAIH por KCl, NaCl ó NH₄Cl a concentraciones menores de 1.0 M. Arriba de 1.0 M el KCl tampoco se encontró un efecto inhibitorio, mientras que el NaCl y NH₄Cl inhiben a la enzima menos del 50% (Choquet *et al.*, 1991).

La BAIH de riñón de cerdo tiene tolerancia a Na⁺ y K⁺ desplegando cerca del 50% o más de la actividad máxima a 0.4 M de estos cationes a concentraciones saturantes o subsaturantes de sustratos. El NH₄Cl a concentraciones saturantes de sustratos, inhibe más del 60 % de la actividad de la enzima teniendo un efecto similar el Mg²⁺ (Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998). Esto sugiere que la modulación iónica de la actividad enzimática puede ser el mecanismo que regula la síntesis de glicina betaina en respuesta a estrés osmótico (Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998).

Métodos para estudiar cambios en la estabilidad de las proteínas

Estructura cuaternaria

Un método muy común es someter a la proteína a cromatografía de exclusión molecular para estudiar la forma nativa de la proteína o determinar si esta cambia a otra conformación (Mathews, 1995). Permite diferenciar entre tetrámeros, dímeros o diferentes estados de agregación y correlacionarlos con la actividad de la enzima (Dickinson, 2003)

Estructura terciaria

Existen métodos que nos permiten estudiar los cambios de estructura terciaria que se producen en respuesta a cambios del entorno de las proteínas. Varios de estos

métodos pueden agruparse en la categoría de técnicas espectroscópicas. A continuación se describe uno de éstos métodos.

Fluorescencia. Fenómeno por el cual una sustancia que absorbe luz de una determinada longitud de onda, emite luz de menor energía a longitud de onda mayor que la de excitación. En las proteínas los aminoácidos tirosina y triptófano son los grupos fluoróforos más importantes. El entorno de estos residuos modifica tanto la intensidad de su fluorescencia como el máximo de emisión, esta técnica puede utilizarse para el seguimiento de los cambios de conformación de la proteína (Mathews, 1995; Militello et al. 2003).

Además, la excitación de la fluorescencia por luz polarizada planar proporciona un modo de estudiar la dinámica de la estructura proteica. Si los residuos excitados pueden moverse o rotar de modo apreciable antes de que se reemita la luz fluorescente, la fluorescencia se despolarizará en alguna medida permitiendo relacionarla con la conformación de la proteína (Mathews, 1995).

Absorbancia en ultravioleta. Cuando las proteínas se desnaturalizan por efecto de pH o temperatura extrema, la absorbancia de los residuos aromáticos tirosina y triptofano, a 280 nm cambia debido a cambios en el medio ambiente que rodea a estos aminoácidos (Yanari y Bovey, 1960; Voet, 1995). El cambio en la absorbancia esta directamente relacionado con una mayor o menor exposición de estos aminoácidos debido a cambios en la estructura terciaria y/o secundaria (Voet, 1995).

Dado que la betaína aldehído deshidrogenasa juega un importante papel en la respuesta metabólica a estrés y en vista de que algunas BADH's son es reguladas o

requieren cationes para su actividad, es relevante estudiar la regulación de la BADH de riñón por cationes mono y divalentes, presentes en la células renales.

Para lo cual se propuso la siguiente hipótesis: los cationes mono y di-valentes tienen efecto sobre la estabilidad y/o la actividad de la Betaína Aldehído Deshidrogenasa de riñón de cerdo. Para probar esta hipótesis se propuso como objetivo general demostrar el efecto de cationes mono y di-valentes sobre la estabilidad y/o la actividad de la Betaína Aldehído Deshidrogenasa de riñón de cerdo.

MATERIALES Y METODOS

Purificación de la enzima

Para la purificación de la BADH de riñón de cerdo se siguió la metodología propuesta por Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto (1998). El cual consta de dos pasos cromatográficos, intercambio iónico y afinidad. Este esquema permite obtener la enzima con 329 veces de purificación con un rendimiento de 11% y una actividad específica de 6.95 U/mg proteína. Una vez purificada la enzima se le agregó glicerol y KCl (0.2 M), para almacenarse a -20°C.

Ensayo de actividad

La actividad de la BADH se determinó espectrofotométricamente midiendo la reducción del NAD^+ a través del incremento en la extinción a 340 nm, usando un espectrofotometro Ultrospec 4000 (Pharmacia, Uppsala, Suecia). El ensayo estándar contiene 0.1 M buffer Hepes-NaOH pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM betaína aldehído (BA) y 1 mM NAD^+ en un volumen final de 0.4 mL. La reacción se inicia agregando la enzima. Cada determinación se hizo por duplicado. Las velocidades de las reacciones fueron lineales en un tiempo de ensayo de 3 minutos. La actividad se expresó como μmoles de NADH formados por minuto por miligramo de proteína (U/mg proteína). Para realizar cada experimento, se eliminó el K^+ del buffer en que se encuentra la enzima a través de diálisis.

Efecto de cationes mono y divalentes sobre la actividad de la BADI

Se determinó la actividad de la enzima en ausencia y presencia de concentraciones variables de KCl, NaCl y NH₄Cl (0-200 mM) a concentraciones saturantes del sustrato BA (0.5 mM) y de la coenzima NAD⁺ (1 mM).

Se midió la actividad de la enzima en ausencia y presencia de concentraciones variables de MgCl₂, CaCl₂ y MnCl₂ (0-200 mM) a concentraciones saturantes del sustrato BA (0.5 mM) y de la coenzima NAD⁺ (1 mM).

Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad

Se midió la actividad de la enzima añadiendo en la celda concentraciones de enzima de 0.18, 0.35, 0.7 1.4, 2.8, 5.6, 11.2 µg totales.

Efecto de cationes sobre la estabilidad de la enzima

Todos los ensayos sobre la estabilidad de la enzima se hicieron con enzima dializada en ausencia de potasio.

Para estudiar el efecto de cationes sobre la estabilidad, a la enzima se le añadió de forma separada uno de los siguientes compuestos KCl, NaCl y NH₄Cl, MgCl₂, CaCl₂ y MnCl₂ todos a una fuerza iónica de 0.2. Se determinó la actividad de la enzima a diferentes tiempos (0-90 min), utilizando concentraciones saturantes de sustratos (BA 0.5 mM y NAD⁺ 1 mM).

Efecto de cationes sobre la estabilidad térmica de la enzima

Se prepararon 5 muestras con 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enzima, cada una se incubó por 15 min a 30, 45, 50, 55 ó 60°C. Al finalizar el tiempo de incubación se determinó la actividad remanente.

Posteriormente se estudió el efecto de cationes sobre la pérdida de actividad a la temperatura de 50°C. En este ensayo se prepararon 6 muestras con 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enzima, a cada una se le añadió uno de los siguientes compuestos KCl, NaCl, K_2SO_4 , MgCl_2 , CaCl_2 , MnCl_2 todos a una fuerza iónica de 0.2. Se incubaron las 6 muestras a 55°C y se tomaron alícuotas a los 0, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos y se determinó la actividad.

Efecto de cationes sobre la estabilidad de la enzima frente a pH

Se prepararon 3 muestras conteniendo 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BADH y enseguida se le añadió a cada muestra uno de los siguientes buffers: Hepes-NaOH 10 mM pH 7.0, Hepes-NaOH 10 mM pH 8.0, y buffer Tris pH 10 mM, 8.0 todos conteniendo 1 mM EDTA y 10 mM β -mercaptoetanol. Cada muestra se incubó por 4 horas a temperatura ambiente. Se tomó una alícuota a los 0, 1, 2, 15, 30, 60, 90, 120 y 240 minutos, y se determinó la actividad enzimática.

Para estudiar el efecto de los sustratos de la enzima (NAD^+ y BA), se añadió a la mezcla de incubación descrita en el párrafo anterior, 1 mM de NAD^+ y 0.5 mM de BA cada uno por separado y se incubó por 4 horas, se tomó una alícuota a los 0, 1, 2, 15, 30, 60, 90, 120 y 240 minutos, y se determinó la actividad enzimática.

Efecto de cationes sobre la estabilidad de la enzima frente a proteasas

Se prepararon dos muestras conteniendo cada una de ellas 130 µg/mL de BADH, a una se le añadió 25 µg de tripsina y a la otra 25 µg de α-quimotripsina ambas en un volumen final de 160 µL. Ambas mezclas se incubaron a temperatura ambiente y se tomaron alícuotas a 0, 5, 10, 20 y 40 minutos, enseguida se determinó la actividad de la BADH.

Para determinar el efecto del K⁺, sobre la inactivación por proteasas, el ensayo anterior se repitió añadiendo a la mezcla de incubación 0.2 M de KCl. Para estudiar el efecto de los sustratos sobre la inactivación por proteasas, se prepararon cuatro muestras conteniendo 130 µg/mL de BADH, a dos de ellas se les añadió 25 µg de tripsina y a las otras dos 25 µg de α-quimotripsina. Posteriormente, se tomó una muestra conteniendo tripsina y otra conteniendo α-quimotripsina y se les añadió NAD⁺ 1 mM (concentración final). Al par restante se les añadió BA 0.5 mM. Se tomaron alícuotas de cada una de las mezclas a los 0, 5, 10, 20 y 40 minutos y se determinó la actividad enzimática.

Análisis cinético

Los datos se analizaron mediante un programa de regresión no lineal (GraFit 4.0 y Origin 4.1).

La actividad de la enzima se analizó mediante la Ecuación de Michaelis-Menten,

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

La inactivación mediante la ecuación: $E_t/E_0 = e^{-kt}$

La reactivación usando la ecuación:

$$E_t/E_0 = E_i/E_0 + (1 - E_i/E_0) e^{-kt}$$

Efecto de cationes sobre la estructura cuaternaria y terciaria de la BADH

Para estudiar la estructura cuaternaria se utilizó cromatografía de exclusión molecular, con una columna Superdex 200 HR (Pharmacia, Uppsala Suecia) asociada a un HPLC (Pharmacia, Uppsala, Suecia). La velocidad del flujo fue de 0.5 mL/ min. La columna se equilibró con buffer A, enseguida se le inyectó 60 µg de BADH dializada y se eluyó con buffer A sin y con KCl 0.2 M. La columna fue previamente equilibrada con los siguientes estándares: piruvato cinasa (228 kDa), BADH PAO, tetrámero (21.8 kDa), BADH amaranto (114 kDa), BADH PAO, monómero (85 kDa) y transferasa humana (54.5 kDa).

Para determinar los cambios en la estructura terciaria se utilizó un fluorómetro Shimadzu (Tokio, Japón). Se utilizó una longitud de onda de excitación de 296 nm y un rango de emisión entre 250 y 400 nm. Se colectó el espectro de emisión de la BADH en presencia de NAD⁺ 1 mM, BA 0.5 mM, KCl 0.2 M y MgCl₂ 0.1 y 1.0 mM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de cationes mono y divalentes sobre la actividad de la BADH

En trabajos previos se describió que el potasio tenía un efecto activador sobre la BADH de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994) y que la enzima de riñón mantenía su actividad a concentraciones altas de potasio y sodio (Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998). Por lo que en este trabajo se decidió analizar el efecto de la concentración de KCl (0-0.2 M), CaCl₂ y de MgCl₂ (0-0.1 M) sobre la actividad de la BADH de riñón.

Para estudiar el efecto del K⁺ sobre la actividad de la BADH se añadió a la mezcla de ensayo KCl como se describe en materiales y métodos. Se encontró que el K⁺ no afecta significativamente la actividad de la enzima (Fig. 1).

Este resultado concuerda con resultados previos encontrados para esta enzima (Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998).

Por su parte los cationes divalentes Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺ mostraron un efecto inhibitor a las concentraciones estudiadas (Fig. 2). Sin embargo la BADH conservó más del 50% de la actividad a concentraciones fisiológicas de ambos cationes. El efecto del Mg⁺⁺ coincide con resultados previos sobre la BADH de riñón (Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998).

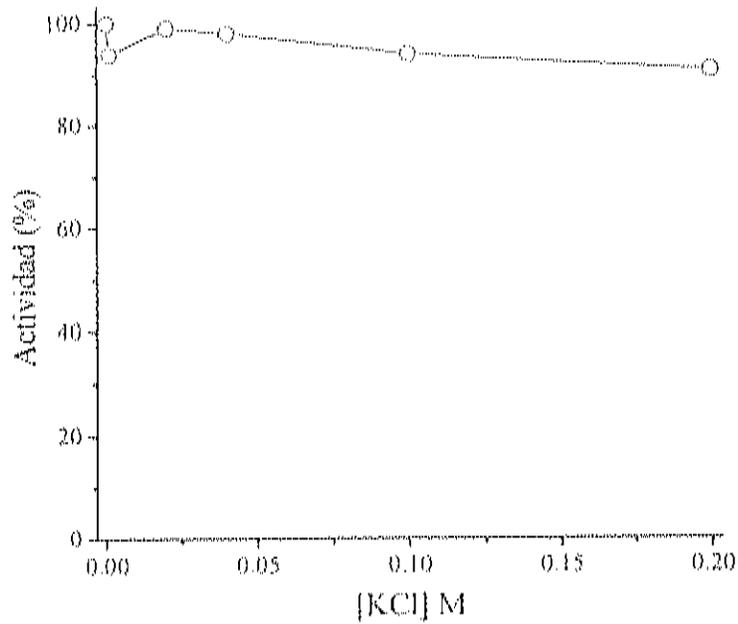


Figura 1. Efecto de la concentración de KCl sobre la actividad de la BADH de riñón.

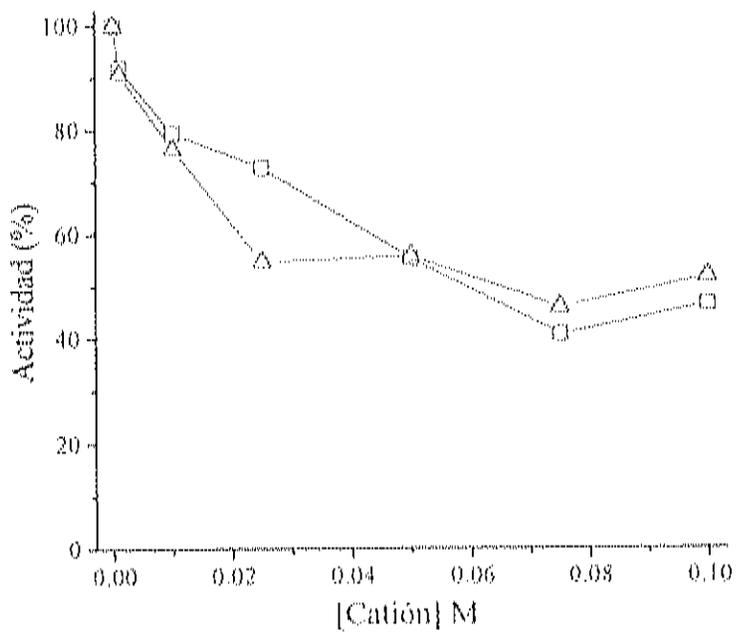


Figura 2. Efecto de la concentración de MgCl₂ (□) y CaCl₂ (Δ) sobre la actividad de la BADH de riñón.

Dado que la actividad de la BADH de riñón y amaranto se conserva por largo tiempo en presencia de potasio, se estudió la conformación de la proteína en ausencia y presencia de potasio. Se encontró que la enzima en ausencia de potasio se desagrega en forma de dímeros principalmente (Fig. 3). La forma activa es tetramérica, por lo que dichas formas no son activas.

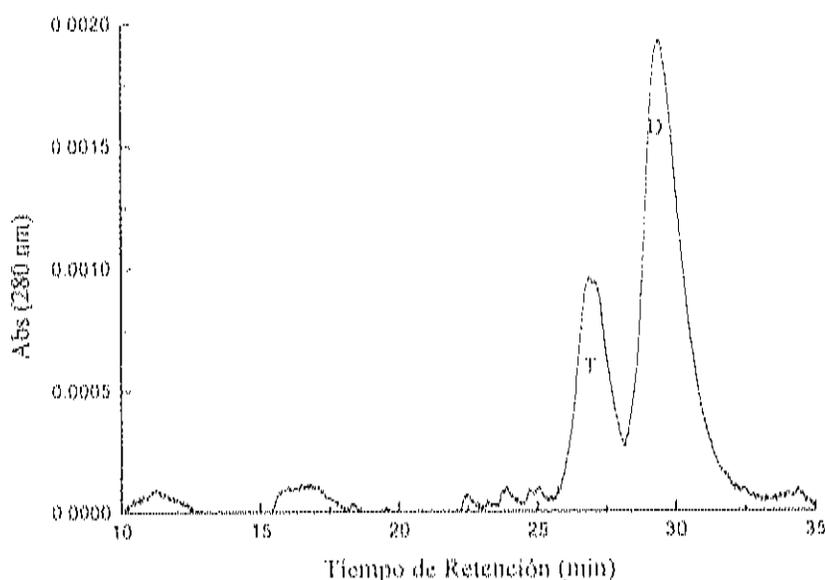


Figura 3. Cambios en la conformación de la BADH en ausencia de K^+ , tetrámero (T), dímero (D) y monómero (M).

El cromatograma de la BADH en presencia de K^+ mostró que la enzima está principalmente en forma de tetrámero (Fig. 4), la cual, como se menciona anteriormente, es la forma activa de la BADH de riñón.

Estos resultados, son similares a los de la betaína aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa* la cual requiere de manera estricta de ión K^+ para mantener su estabilidad (Valenzuela-Soto *et al.*, 2003). Por lo anterior, se decidió estudiar el efecto

de éste catión y de otros cationes mono y divalentes que pudieran sustituir al potasio sobre la estabilidad de la BADH de riñón.

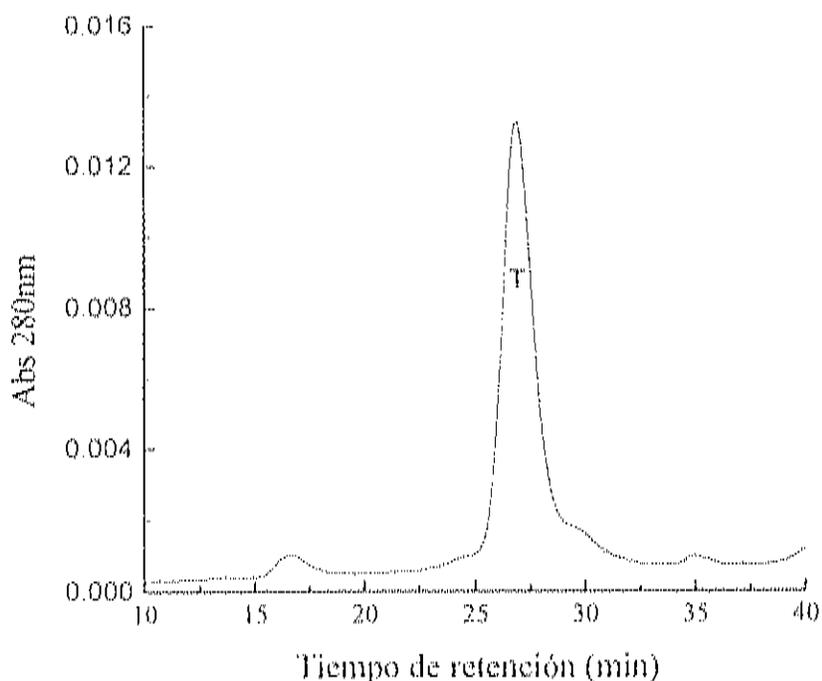


Figura 4. Cambios en la conformación de la BADH de riñón en presencia de KCl 0.2 M, tetramero (T).

Efecto de cationes mono y divalentes sobre la estabilidad de la enzima

Para estudiar el efecto del K^+ sobre la estabilidad de la BADH se eliminó este ión de la enzima. Encontrándose que la actividad de la enzima disminuyó con respecto al tiempo, siguiendo una cinética de inactivación de decaimiento exponencial sencillo, con una constante de velocidad de primer orden de $0.024 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ (Fig. 5). Este resultado y el hecho de que el potasio no afecte la actividad (fig 1) sugieren que la BADH requiere del ión K^+ para mantener la estabilidad.

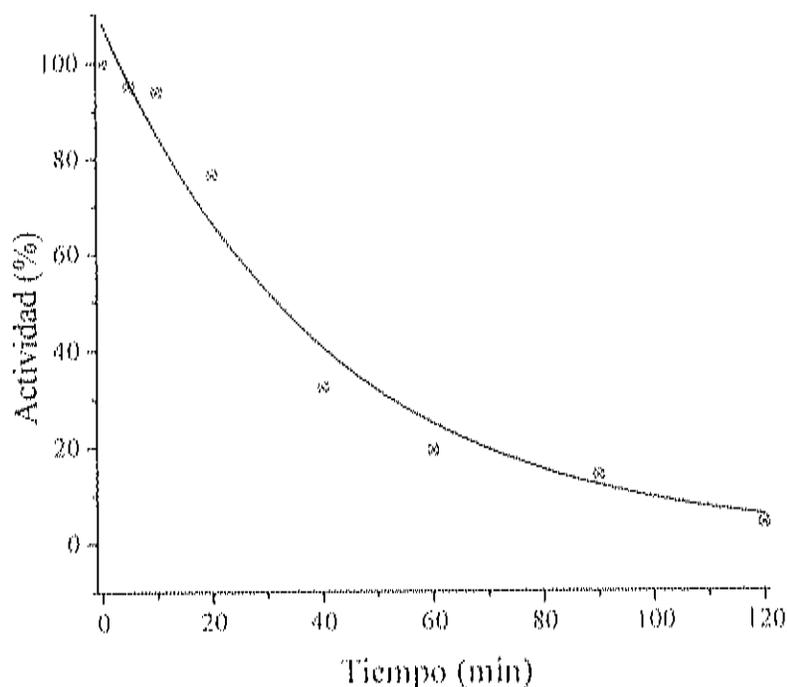


Figura 5. Cinética de inactivación de la BADI de riñón en ausencia de K^+ .

Dado que la ausencia de iones K^+ provoca pérdida de la actividad, se buscó reactivar a la enzima mediante adición de cationes monovalentes, para ello se utilizó K_2SO_4 fuerza iónica de 0.2 (la misma que se obtiene con KCl 0.2 M). Se encontró que tanto el K_2SO_4 como el Na_2SO_4 reactivaron a la enzima (Fig. 6). Al analizar la cinética de reactivación se encontró que ésta fue de primer orden con una constante de velocidad de $0.029 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ para el K^+ y de $0.031 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ para el Na^+ .

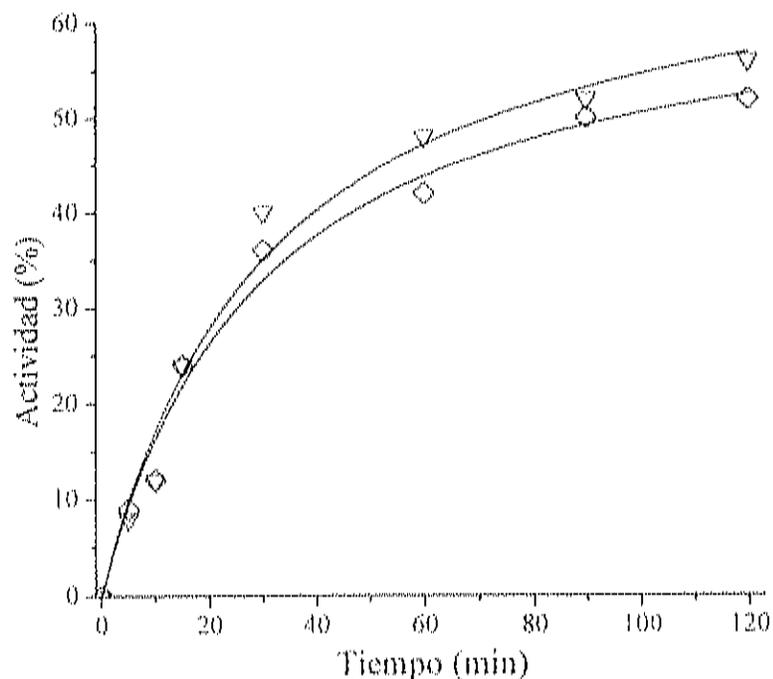


Figura 6. Cinética de reactivación de la BADH de riñón por cationes monovalentes.
 K_2SO_4 (\diamond), Na_2SO_4 (∇).

El hecho de que tanto el K^+ como el Na^+ tengan un efecto reactivador sobre la enzima, aunado a resultados previos en los cuales tanto el NaCl (0.2 M) como el NH_4Cl (0.2 M) reactivaron a la BADH bajo las mismas condiciones (Valenzuela-Soto *et al.*, 2003), sugiere de forma preliminar que la BADH requiere de fuerza iónica más que de uno de los cationes en particular para mantener su estabilidad. Esto correlaciona bien con la función *in vivo* de la enzima, ya que el riñón maneja una alta fuerza iónica provocada por las concentraciones de urea, KCl y NaCl que se encuentran presentes

durante la diuresis (deprivación de agua), que es el momento en el cual se requiere que la BADH lleve a cabo la síntesis del osmolito glicina betaína (Beck, 1988).

Para probar que efectivamente existe un efecto de fuerza iónica, se estudiaron los cationes divalentes Mg^{++} , Ca^{++} , Mn^{++} empleando la misma fuerza iónica utilizada con los cationes monovalentes (0.2). Se encontró que sólo el Mg^{++} reactivó a la enzima (Fig. 7). Este resultado no coincide con la sugerencia de que la BADH de riñón requiere fuerza iónica para mantener su estabilidad, ya que ni el Ca^{++} , ni el Mn^{++} fueron capaces de reactivar a la enzima. Por lo que se propone que debe existir un efecto más específico de algunos de los cationes sobre la estabilidad de la BADH.

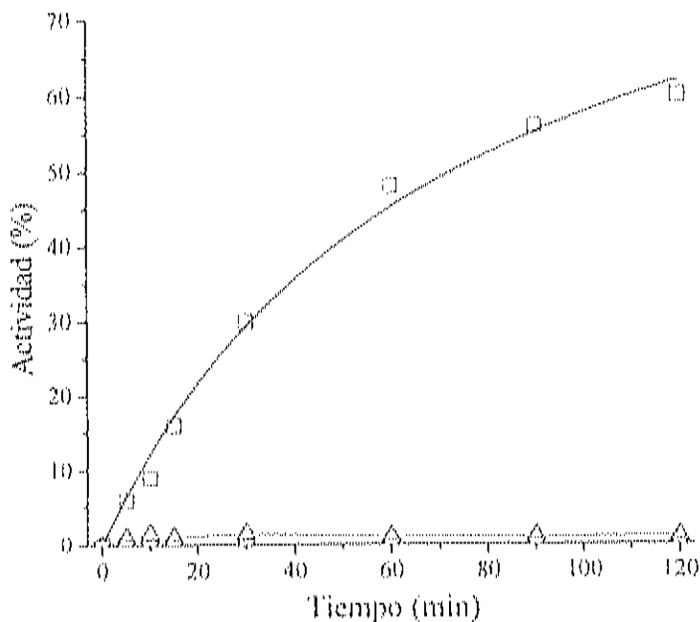


Figura 7. Cinética de reactivación de la BADH de riñón por cationes divalentes.

$MgCl_2$ (□), $CaCl_2$ (△) y $MnCl_2$ (▽).

La temperatura y el pH tienen grandes efectos sobre la estabilidad de las proteínas, temperaturas por arriba de los 50°C, y pH's extremos desnaturalizan a muchas

proteínas. Se sabe que algunos cationes protegen a las proteínas de desnaturalización térmica, de acuerdo a la serie de Hofmeister (Voet, 1995). Por lo que se estudió si la presencia de cationes mono y divalentes protegían la estabilidad de la enzima frente a la temperatura, pH y proteasas.

Efecto de cationes mono y divalentes sobre la estabilidad térmica de la enzima

En este estudio se determinó el efecto de la incubación por 15 min a la BADH dializada, a diferentes temperaturas en el intervalo de 30 a 60°C en ausencia y presencia de cationes mono y divalentes. Los resultados muestran que la BADH incubada a 30°C (temperatura normal del ensayo) en ausencia de iones, exhibe la misma actividad que la enzima control, mientras que a 45°C conserva el 62%, a 50°C conserva el 22% y a 55°C mantiene únicamente el 4% de su actividad, finalmente si la enzima se incubaba a 60°C pierde totalmente su actividad (Tabla 2).

Estos resultados sugieren que el 62% de las moléculas de la enzima conservan su estructura cuaternaria a temperaturas de alrededor de los 45°C, sin embargo a temperaturas de 50°C y superiores, la mayoría de los tetrameros ha perdido su conformación. Dado que la BADH se está purificando a partir de un tejido de mamífero, es de esperarse que la enzima por arriba de los 40°C inicie su desagregación.

Tabla 2. Efecto de la temperatura sobre la BADH de riñón

T (°C)	Actividad (%)
30	100
45	62
50	22
55	4
60	0

Al estudiar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la BADH en presencia de cationes mono y divalentes, se encontró que la enzima conserva más del 50% de la actividad a 55°C en presencia de K^+ , Na^+ y Mg^{++} usados como cloruro y sulfato excepto con K_2SO_4 , durante los primeros 15 minutos de incubación (Fig. 8). La enzima en presencia de Ca^{++} pierde rápidamente la actividad a 55°C (Fig. 8). Por otra parte, la enzima en presencia de Mn^{++} perdió completamente la actividad desde el primer minuto de incubación.

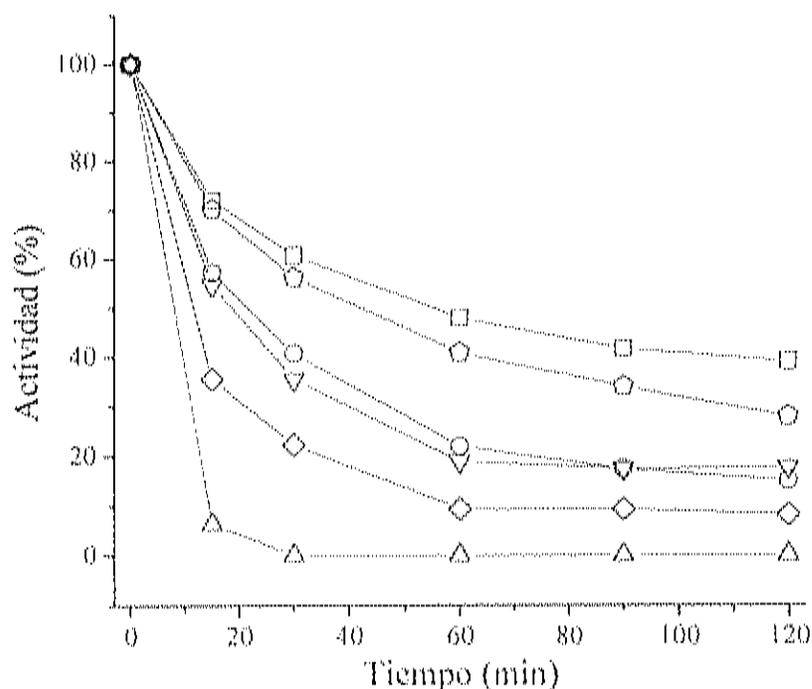


Figura 8. Efecto de cationes mono y divalentes sobre la actividad de la BAADH de riñón incubada a 55°C. MgCl₂ (□), NaCl (○), KCl (◇), Na₂SO₄ (▽), K₂SO₄ (◊), CaCl₂ (△).

Estabilidad de la enzima frente a pH

Para éste estudio la enzima se incubó a pH 7 y 8, usando dos amortiguadores Hepes-NaOH y Tris. Los resultados muestran que la enzima a pH 7 tiene una menor actividad que a pH 8.0 cuando se emplea el mismo amortiguador, Hepes-NaOH. Al estudiar el efecto de Hepes y Tris a pH 8.0, se encontró que la enzima fue menos activa en presencia de Tris que en Hepes (Fig. 9). Lo cual demuestra que tanto el pH como la composición del buffer están influyendo en la falta de estabilidad de la enzima.

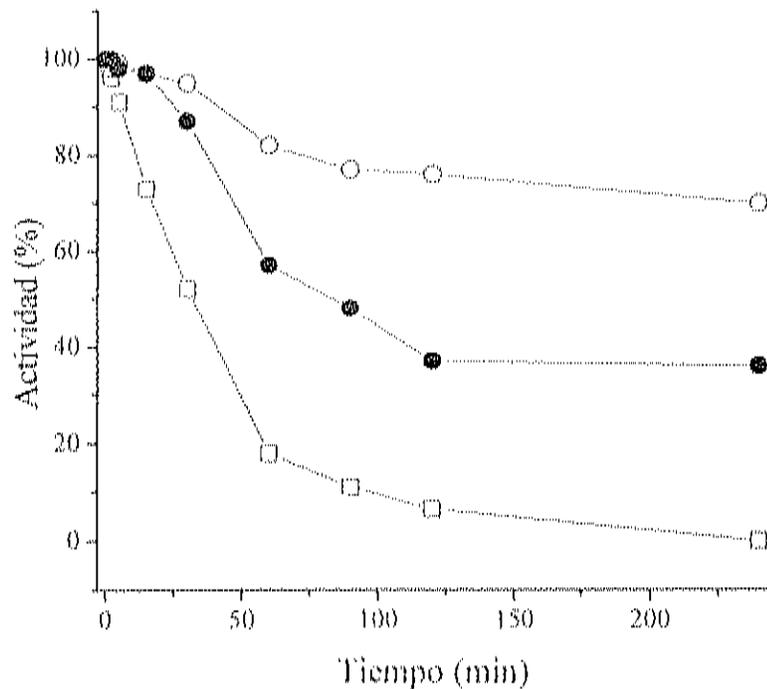


Figura 9. Efecto del pH y composición del buffer sobre la actividad de la BADH de riñón. Hepes pH 8.0 (○), Hepes pH 7.0 (●) y Tris pH 8.0 (□).

Se analizó el efecto de los sustratos NAD^+ (1 mM) y betaína aldehído (0.5 mM) sobre la inactivación por pH. Se observó que la coenzima protegió a la BADH un 100% durante los primeros 30 minutos contra la inactivación provocada por los diferentes buffer y pH (Fig. 10). Dos horas después, la enzima conserva el 100% de la actividad a pH 8.0 en presencia de NAD^+ , sin embargo a pH 7.0 la enzima pierde el 30% de su actividad en presencia de NAD^+ .

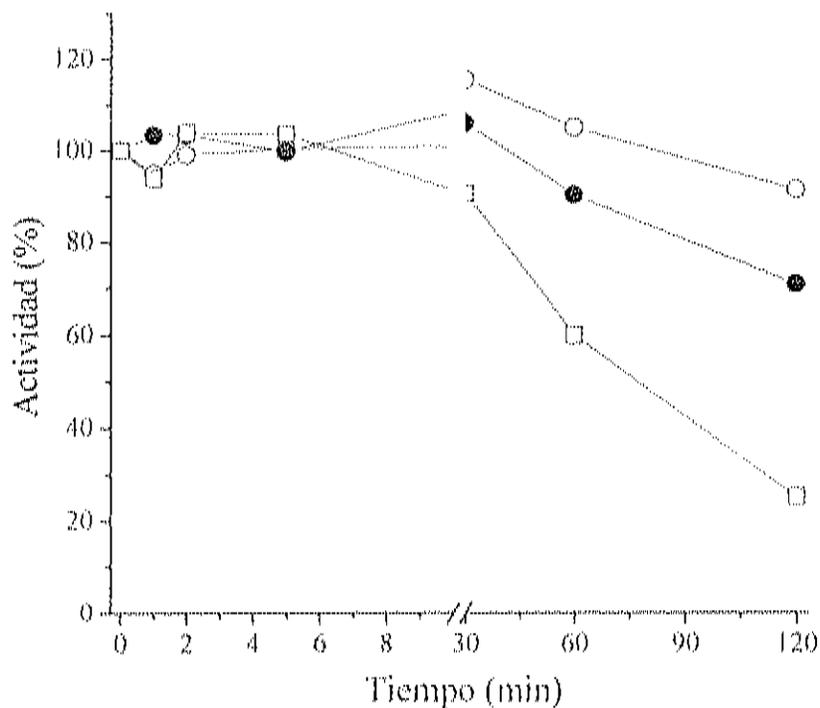


Figura 10. Efecto del NAD^+ sobre la inactivación de la BADH de riñón por pH y tipo de amortiguador, Hepes pH 8.0 (○), Hepes pH 7.0 (●) y Tris (□).

Los resultados indican que la coenzima está protegiendo el sitio activo de la enzima y con ello se mantiene la conformación. Estos resultados correlacionan con el mecanismo cinético de la BADH de riñón, en el cual la enzima une primero a la coenzima siguiendo un mecanismo Iso Bi Bi Ordenado (Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000).

Al estudiar el efecto del sustrato aldehído, se encontró que BA no tiene el mismo efecto protector (Fig. 11), lo cual se debe al mecanismo cinético de la BADH, en el cual BA se une a la enzima después de la coenzima (Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000). Por tanto, para que BA se una al sitio activo el NAD^+ tiene que estar unido, por lo

que no es capaz de proteger a la enzima en el mismo grado que el NAD⁺. Esto se puede comprobar mediante estudios de fluorescencia.

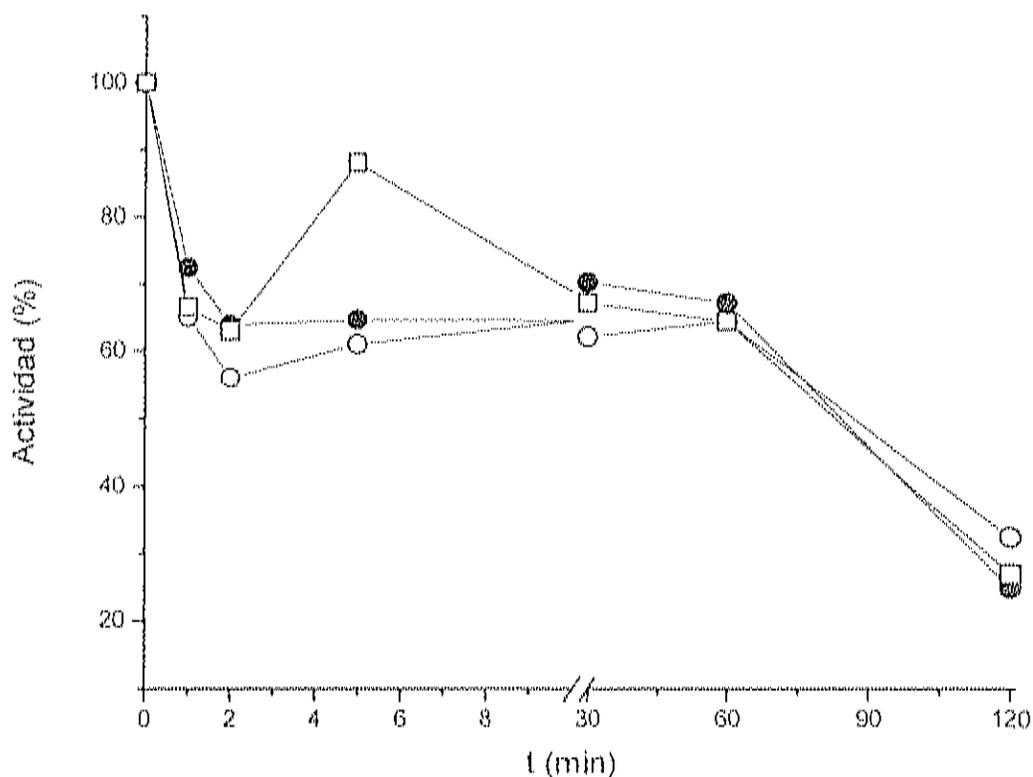


Figura 11. Efecto del BA sobre la inactivación por buffer y pH. Hepes pH 8.0 (○), Hepes pH 7.0 (●) y Tris (□).

En conjunto los datos de las figuras 9 y 10 confirman el mecanismo cinético de la BADH encontrado en un trabajo previo a éste (Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000).

Efecto de cationes monovalentes sobre la estabilidad de la enzima frente a proteasas

Para estudiar el efecto de proteasas sobre la actividad de la BADH se utilizó Tripsina (hidroliza residuos de lisina y arginina) y α -Quimotripsina (hidroliza residuos aromáticos) (Bohinsky, 1987). Al incubar a la enzima en presencia de dichas proteasas, se encontró que la BADH fue más susceptible a inactivación por tripsina mostrando una cinética de inactivación exponencial de dos fases, con una constante de inactivación de $16.48 \pm 1.09 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ (Fig. 12). Mientras que al incubar con con α -Quimotripsina la inactivación fue menor con una constante de inactivación de $3.78 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ (Fig. 12).

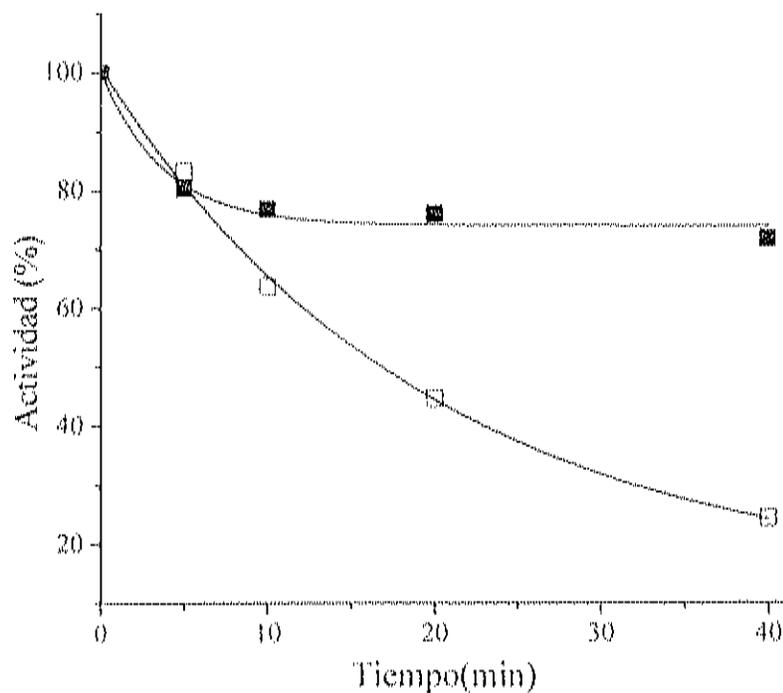


Figura 12. Efecto de la Tripsina (□) y α -Quimotripsina (■) sobre la estabilidad de la BADH de riñón.

El efecto inactivador de la tripsina muestra que hay mayoritariamente aminoácidos con carga positiva (lisina, arginina) expuestos. Al contrario de los aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina, triptofano) que son específicos para la α -Quimotripsina los cuales probablemente están posicionados principalmente en la parte interna de la proteína.

Dado el efecto inactivador de la tripsina sobre la BADH se repitió el ensayo en presencia de KCl 0.2 M para ver si protege contra la inactivación por tripsina. Se encontró que el K^+ protegió alrededor del 90% de la actividad de la enzima (Fig. 13).

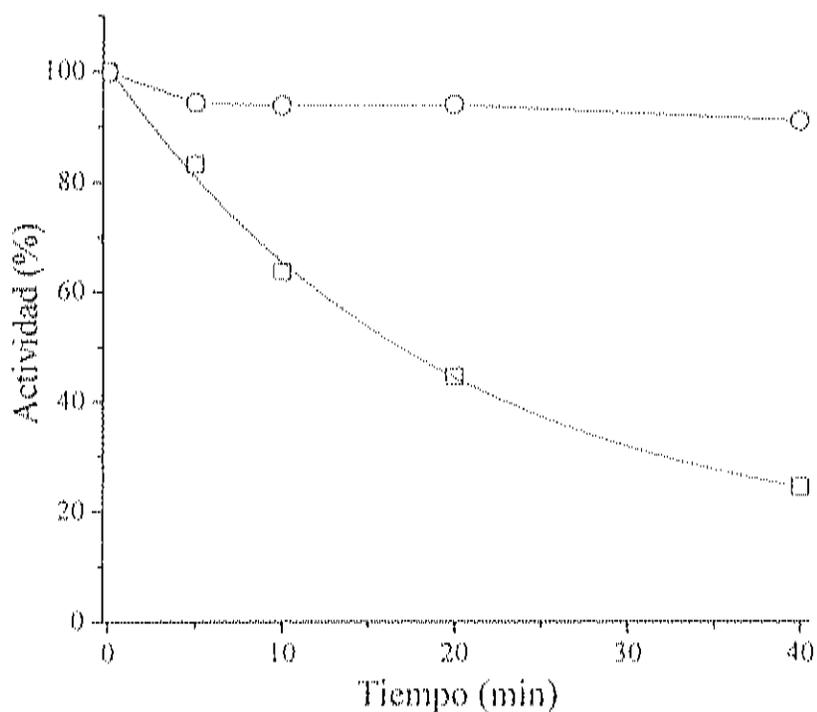


Figura 13. Efecto de KCl sobre la inactivación de la BADH de riñón por tripsina. BADH en presencia de tripsina y ausencia (□) y en presencia (○) de KCl.

Posteriormente se estudió el efecto de los sustratos sobre esta inactivación. Al incubar la enzima con NAD^+ 1 mM se observó que se mantiene alrededor del 80% de la actividad mantiene alrededor del 80% de la actividad de la enzima. Al calcular la constante de inactivación se encontró que disminuye de 16.48 a $6.36 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ (Fig. 14). A la fecha no se ha estudiado a los aminoácidos presentes en el sitio activo de la BADH de riñón, sin embargo se sabe que la BADH de amaranto tiene una lisina esencial para la actividad (Valenzuela-Soto, 1994), por lo que podemos suponer que el efecto de la tripsina puede deberse en parte a que este hidrolizando una lisina del sitio activo, adicional a otros residuos de lisina y arginina más expuestos en la proteína.

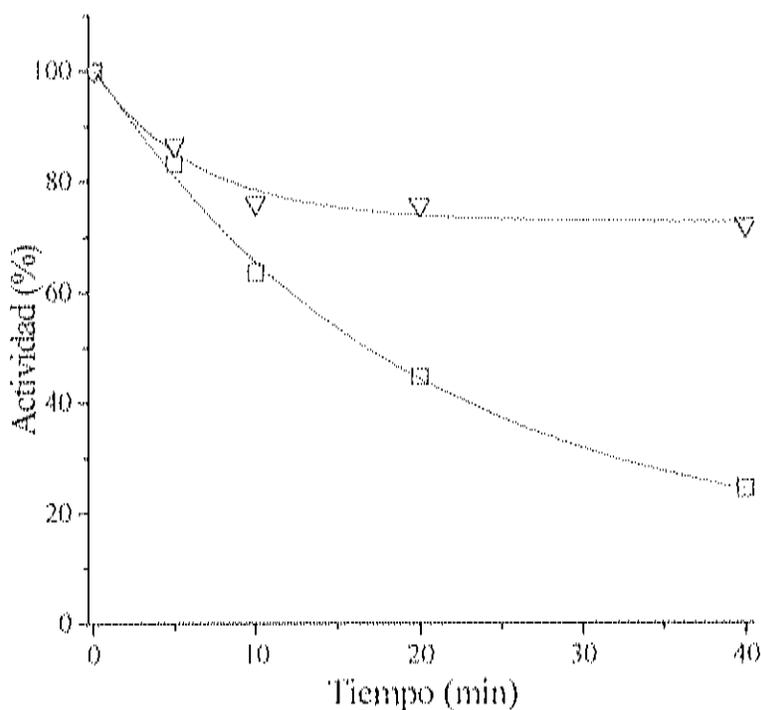


Fig. 14. Protección de la BADH de riñón por NAD^+ frente a la inactivación por tripsina. BADH más tripsina en ausencia (\square) y en presencia (∇) de NAD^+ .

Al incubar a la enzima en presencia del sustrato BA (0.5 mM) se observó también un efecto protector contra la inactivación por tripsina, se encontró una disminución en la constante de inactivación de 16.48 a 9.72 $M^{-1}min^{-1}$ en ausencia y presencia de BA (respectivamente) (Fig. 15).

Sin embargo BA protegió sólo un 70% de la actividad de la BADH a diferencia del NAD^+ el cual protegió más del 70%.

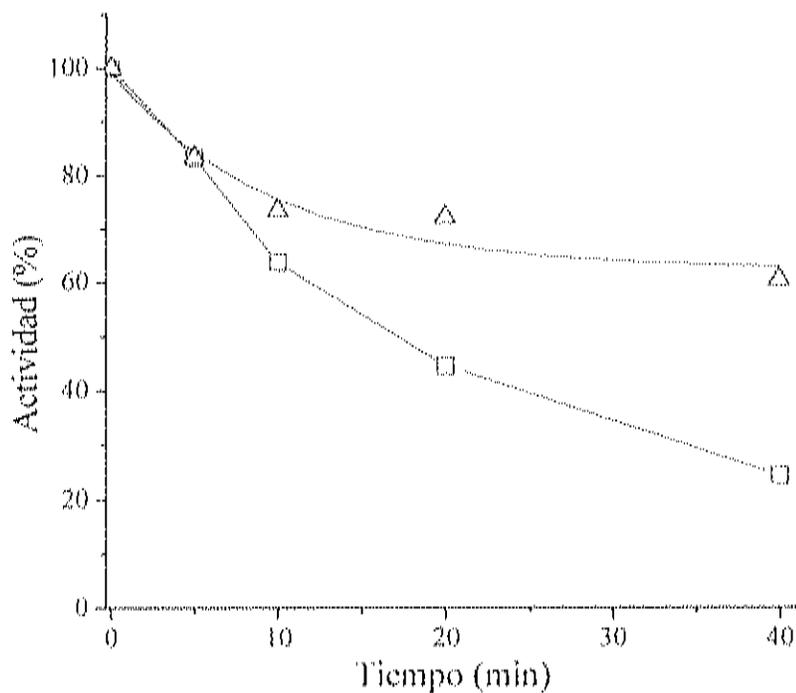


Figura 15. Protección de la BADH de riñón por BA ante la inactivación por tripsina. BADH más tripsina en ausencia (□) y en presencia (△) de BA.

Dado el efecto inactivador de la α -quimotripsina sobre la actividad de la BADH, se incubó a la enzima en presencia de dicha proteasa y KCl (0.2 M). La figura 15 muestra que el K⁺ protegió el 100% de la actividad de la BADH (Fig. 16). Dado que como se mostró anteriormente, el potasio mantiene la estructura cuaternaria de la proteína y al hecho de que los aminoácidos aromáticos tienden a mantenerse en el interior de la proteína, es posible que esto evite el acceso de la quimotripsina a los aminoácidos aromáticos, impidiendo así la inactivación de la BADH.

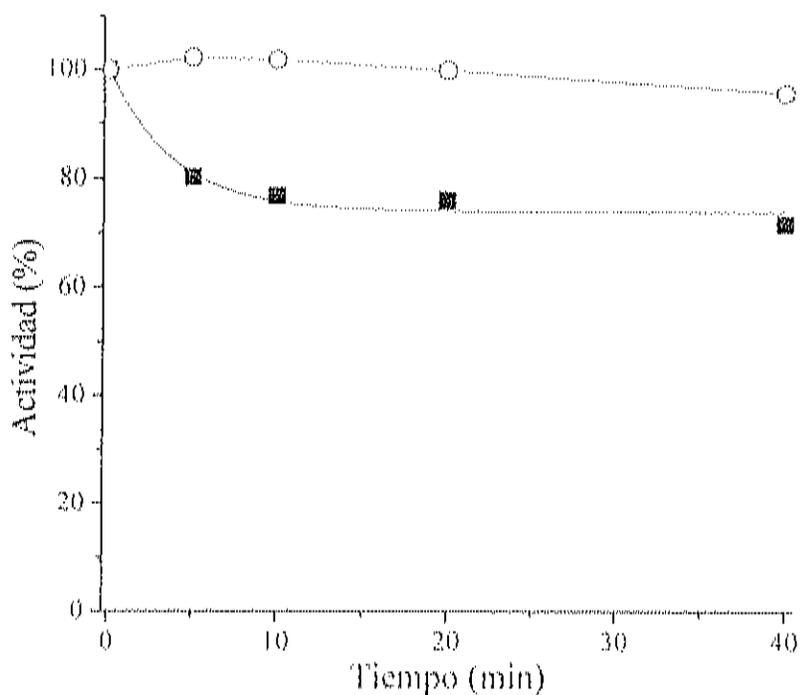


Figura 16. Efecto de KCl sobre la la inactivación por α -quimotripsina de la BADH de riñón. BADH más α -quimotripsina en ausencia (■) y presencia (○) de KCl 0.2 M.

También se analizó la inactivación por quimotripsina en presencia de los sustratos NAD^+ y BA (1 mM y 0.5 mM). En presencia de NAD^+ la BADH conservó aproximadamente el 80% de la actividad con una constante de $6.05 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, mientras que la constante en ausencia de NAD^+ fue de $3.78 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Fig. 17). Sin embargo, aparentemente la presencia de la coenzima expone más los aminoácidos aromáticos, sustratos específicos de esta proteasa, potenciando así el efecto inactivador.

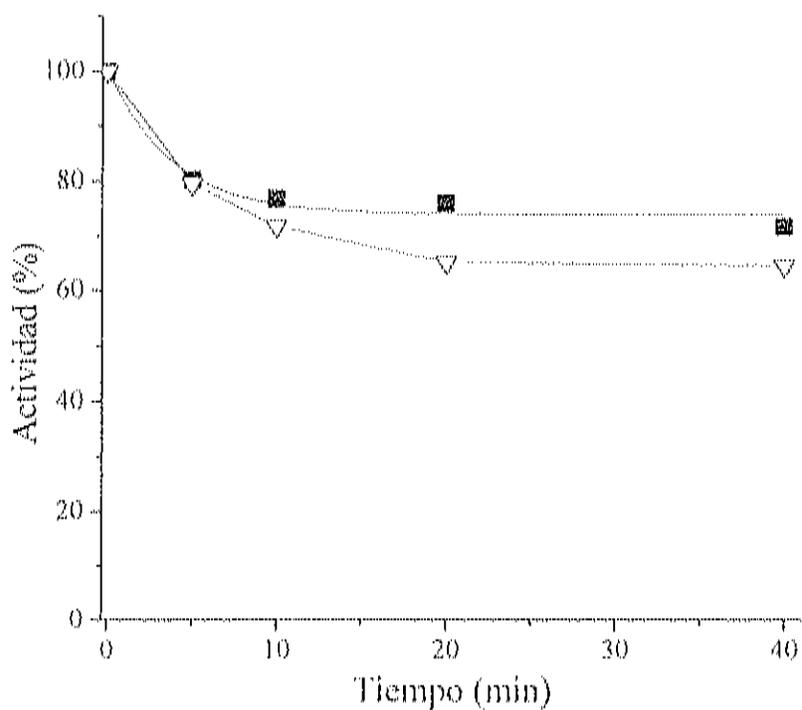


Figura 17. Efecto del NAD^+ sobre la inactivación de la BADH de riñón por α -Quimotripsina. BADH más quimotripsina en ausencia (■) y presencia (▽) de NAD^+ 1 mM.

A la fecha no se han reportado aminoácidos aromáticos en el sitio activo de la betaína aldehído deshidrogenasa de riñón de cerdo, sin embargo la BADH de hígado de bacalao tiene un triptofano (Trp165) en el sitio de unión de la coenzima (Joharsson *et al.*, 1998) y una fenilalanina estrictamente conservada en casi todas las ALDHs (Phe 402) cercana a dicho sitio. La presencia de estos aminoácidos en la BADH de riñón de cerdo explicaría en parte estos resultados. Una vez realizada la hidrólisis, es posible que se den cambios conformacionales adicionales en la proteína y esto modifique el sitio activo de la BADH, impidiendo así la eficiencia de la catálisis.

Al estudiar el efecto del sustrato aldehído, se encontró que la presencia de BA tiene un efecto muy similar al del NAD⁺ (Fig. 18).

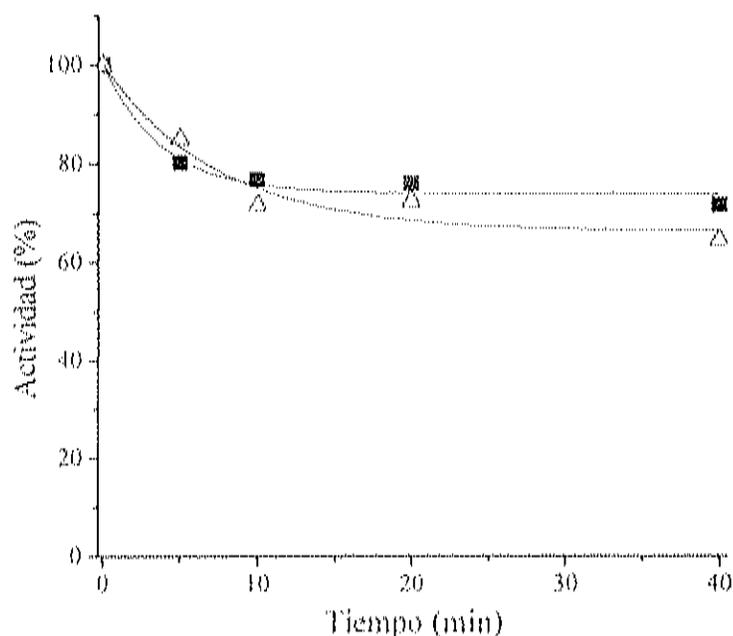


Figura 18. Efecto de BA frente a la inactivación de la BADH de riñón por α -quimotripsina. BADH más quimotripsina en ausencia (■) y presencia (▽) de BA 0.5 mM.

Efecto de cationes mono y divalentes sobre la estructura terciaria de la enzima

Como hemos podido ver en los resultados anteriores, los cationes al igual que los sustratos tienen un efecto sobre la estabilidad de la enzima. Dicho efecto se ve reflejado en cambios en la estructura terciaria. Para aproximarnos a los cambios que ocurren a nivel de estructura terciaria se hicieron estudios de fluorescencia.

El primer análisis de fluorescencia se hizo en ausencia de cationes (Fig. 19). La BADH en ausencia de cationes y sustratos mostró una emisión máxima con una longitud de onda de 333.6 nm. Al añadir NAD⁺ la emisión disminuyó con una longitud de emisión de 332 nm. Mientras que al añadirle a la enzima BA la intensidad de fluorescencia no cambió (dato no mostrado).

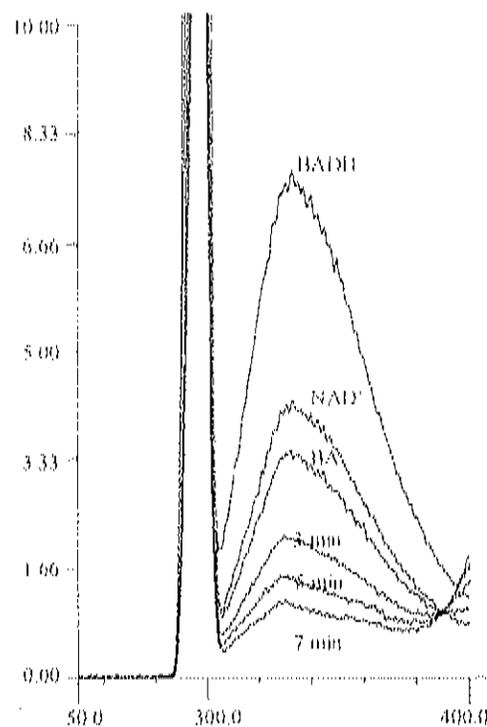


Figura 19 Espectro de fluorescencia de la BADH de riñón en ausencia de cationes.

El primer análisis de fluorescencia se hizo para ver el efecto del K^+ sobre la estructura terciaria (Fig. 20). Primero se midió la emisión de fluorescencia de la enzima en ausencia de cationes y sustratos, dando una emisión máxima de fluorescencia con un máximo a 333.6 nm. En seguida se agregó KCl (0.2 M) y la emisión de fluorescencia fue similar a 332 nm. Después de añadir NAD^+ , la emisión de fluorescencia se redujo aproximadamente a la mitad con una longitud de onda máxima a 332 nm. Por último se agregó BA donde cambió de nuevo la emisión de fluorescencia a 3.29 con una lambda de 332 nm (Tabla 3).

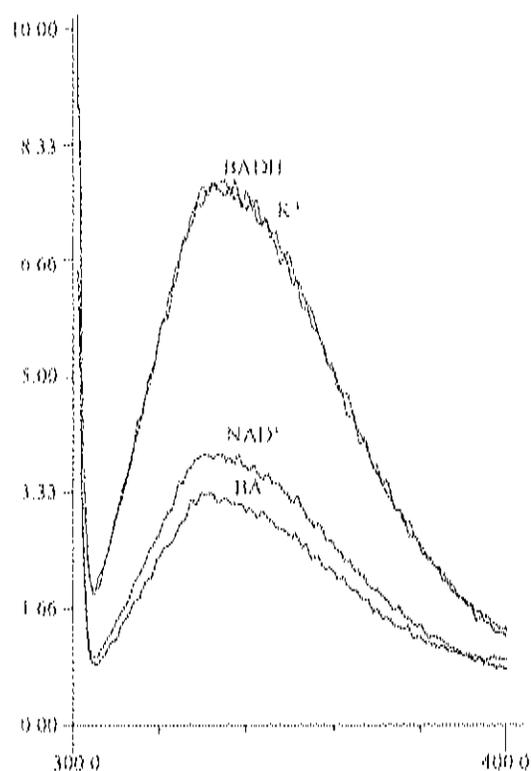


Figura 20. Espectro de fluorescencia de la BADH de riñón en presencia de KCl 0.2 M.

En seguida se estudió el efecto del Mg^{++} sobre la estructura terciaria, mediante los cambios de emisión de fluorescencia (Fig 21). Se determinó la emisión de fluorescencia de la enzima en ausencia de cationes y sustratos. La máxima emisión de fluorescencia se obtuvo una longitud de onda 332 nm. Después se agregó $MgCl_2$ (1.0 mM) y la emisión de fluorescencia fue similar con una longitud de onda de 332 nm. Al añadirle NAD^+ se observó una emisión de fluorescencia menor a la misma longitud de onda que la anterior (Tabla 3).

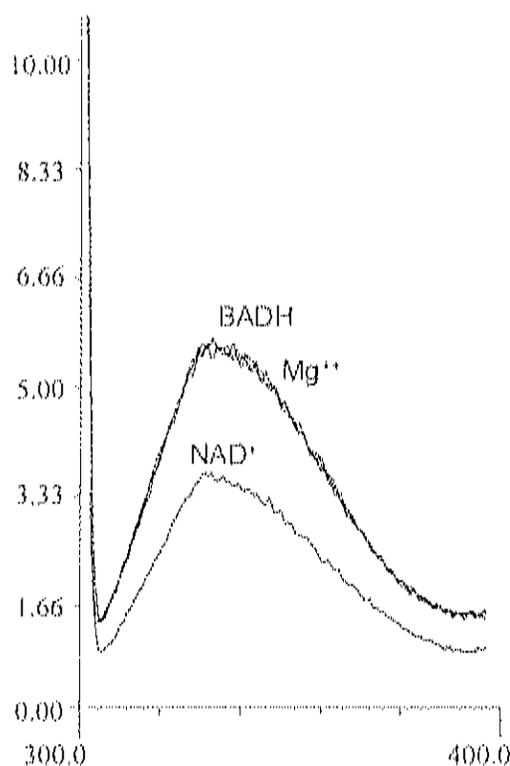


Figura 21. Espectro de fluorescencia de la BADH de riñón en presencia de $MgCl_2$ 1 mM

En el siguiente experimento se estudió el efecto de los sustratos en los cambios de la estructura terciaria (Fig. 19). Nuevamente se midió la emisión de fluorescencia a la enzima en ausencia de cationes y sustratos encontrándose una emisión máxima a 333.6 nm. Al agregarle el NAD⁺ la emisión disminuyó con una longitud de onda máxima de 332 nm. En seguida se añadió BA arrojando como resultado una emisión máxima fue menor a una longitud de onda 331 nm. Se dejó proceder la reacción por 5 minutos y se volvió a determinar la emisión de fluorescencia, encontrándose que la emisión máxima disminuyó con una longitud de onda de 329.6 nm (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de cationes y sustratos sobre la estructura terciaria

	Lambda máxima (nm)	Intensidad de fluorescencia
BADH	333.6	7.58
NAD ⁺	332	4.09
BA	331	3.5
BADH	333.6	7.74
K ⁺	332	7.68
NAD ⁺	332	3.90
BA	332	3.29
BADH	332	5.66
Mg ⁺⁺	332	5.6
NAD ⁺	332	3.64

Los resultados muestran que el K^+ y el Mg^{++} provocan cambios muy pequeños en la intensidad de fluorescencia. Sin embargo el K^+ cambio la longitud de onda de emisión de fluorescencia máxima de los aminoácidos aromáticos de la enzima, lo que no ocurrió con el Mg^{++} . Por su parte la coenzima NAD⁺ provoca una disminución en la intensidad de fluorescencia, lo cual refleja que su unión modifica la posición de los aminoácidos aromáticos de la BADH, reflejando probablemente cambios conformacionales asociados a catálisis.

Estos resultados sugieren que el K^+ podría estar causando cambios en la estructura terciaria de la enzima, los cuales pudieran estar facilitando la unión de la coenzima en presencia de éste catión. Este es el primer estudio de la BADH donde se analizan los cambios en la estructura terciaria en relación con cationes.

La unión de BA al complejo BADH-NAD⁺ induce un cambio adicional a la intensidad de la emisión de fluorescencia. Todo esto correlaciona con el mecanismo cinético de la enzima (Iso Bi Bi Ordenado) donde la coenzima es el primer sustrato que se une a la enzima y su unión permite la unión de BA (Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000).

CONCLUSIONES

A partir de todos los datos obtenidos en este trabajo, se concluye que:

1. El K^+ no tiene efecto sobre la actividad de la BADH de riñón de cerdo.
2. El K^+ tiene efecto sobre la estabilidad de la BADH de riñón de cerdo, ya que este catión: mantiene su conformación activa (tetramero), protege de la inactivación térmica, del efecto del pH y tipo de amortiguador y contra la actividad proteolítica de tripsina y α -quimotripsina.
3. El Na^+ no puede sustituir al K^+ en el mantenimiento de la estabilidad de la enzima.
4. Entre los cationes divalentes probados solo el Mg^{++} mostró efectos similares a los del K^+ .

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad N., Wyn Jones G., Jeschke W.D. (1995) Effect of Exogenous Glycinebetaine on Na⁺ Transport in Barley Roots, *J. Exp. Botany* **191**:913-921.
- Atsmon D.B., Busch M.G., Evans L.T. (1986) Effects of Enviromental Conditions on Expression of the 'Gigas' Characters in Wheat. *Aust. J. Plant.* **13**:365-375.
- Bagnasco S, Balaban R, Fales HM, Yung Y-M, Burg, (1986) Predominant osmotically active solutes in rat and rabbit renal medullas, *J. Biol. Chem.* **261**: 5872-5877.
- Barron, A., Jung, J. U., and Villarejo, M., (1987) Purification and characterization of a glycine betaine binding protein from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **626**:11 841
- Beck Franz X.; Dörg Adolf; Thrurau Klaus. (1988) Cellular osmoregulation in renal medulla. *Renal Physiol. Biochem.* **3**:174-186.
- Beck F-X, Burger-Kentischer A., Müller E. (1998) Cellular response to osmotic stress in the renal medulla. *Plügers Arch. - Eur. J. Physiol.*, **436**: 814-827.
- Boch J., Nau-Wagner G., Kneip S., Bremer E. (1997) Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an anzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch. Microbiol.* **168**: 282-289.
- Bohinski R.C. (1987) Modern concepts in biochemistry. 2da. Edicion Addison-Wesley. Boston, pp 109.
- Casale C.H., Lisa T.A., Lucchesi G.I., Domenech, C.E. (1994) The production of labeled betaine by incubation of osmolyte-free *Pseudomonas aeruginosa* with

- radioactive choline. *Curr. microbiol.*, **29**, 295.
- Chambers S.T., Lever M.M. (1996) Betaines and urinary tract infections. *Nephron*, **74**:1-10.
- Chern M.K., Pietruszko R. (1995) Human Aldehyde Dehydrogenase E3 Isoenzyme is a Betaine Aldehyde Dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **213**:561-568.
- Chern M.K., Pietruszko R. (1999) Evidence for mitochondrial localization of betaine aldehyde dehydrogenase in rat liver: purification, characterization, and comparison with human cytoplasmic E3 isozyme. *Biochem. Cell Biol.* **77**:179-187.
- Choquet C.G., Ahonkhai I., Klein M., Kushner D.J. (1991) Formation and role of glycine betaine in the moderate halophile *Vibrio costicola*. *Arch. Microbiol.* **155**:153-158.
- Culham D.E., Emmerson K.S., Lasby B., Mamclak D., Steer B.A., Gyles C.L., Villarejo M., Wood J.M. (1994) Genes encoding osmoregulatory proline/glycine betaine transporters and the proline catabolic system are present and expressed in diverse clinical *Escherichia coli* isolates. *Can. J. Microbiol.* **40**:397- 402.
- Davies S.E.C., Wool D.A., Chalmers R.A., Rafter J.E.M., Iles R.A. (1992) Proton nmr studies of betaine excretion in the human neonate: consequences for choline and methyl group supply. *J. Nutr. Biochem.* **3**:523-530.
- Dickinson F.M., Hywood G.W. (1987) The role of the metal ion in the mechanism of the K⁺ activated aldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **247**:377-384.

- Dickinson F.M. (1996) The purification and some properties of the Mg²⁺ activated cytosolic aldehyde dehydrogenase of *Sacharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **315**:393-399.
- Dickinson F.M. (2003) Conformational changes and activation of yeast aldehyde dehydrogenase by various agents. *Chem-Biol. Interactions* **143-144**:169-174.
- Dragalovich J., Pierce S.K. (1994) Characterization of partially purified betaine aldehyde dehydrogenase from horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) cardiac mitochondria. *J. Exp. Zoology* **270**: 417-425.
- Du Vigneaud V., Simmonds S., Chandler J.P., Cohn M. (1944) A further investigation of the role of betaine in transmethylation reactions *in vivo* *J. Biol. Chem.* **165**:639-648.
- Falkenberg P., Strom A.R., (1990) Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde deshydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1034**:253-259.
- Figueroa-Soto C.G., Lopez-Cervantes G., Valenzuela-Soto E.M. (1999) Immunolocalization of Betaine Aldehyde Dehydrogenase in Porcine Kidney. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **258**:732-736.
- Figueroa-Soto C.G., Valenzuela-Soto E.M. (2000) Kinetic Study of Porcine Kidney Betaine Aldehyde Dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res Comm.* **269**:596-603.
- Figueroa-Soto C.G., Valenzuela-Soto E.M. (2001). Purification of a Heterodimeric Betaine Aldehyde Dehydrogenase from Wild Amaranth Plants Subjected to Water Déficit. *Biochem. Biophys. Res Comm.* **285**:1052-1058.

- García-Perez A., Burg M.B. (1991) Renal medullary organic osmolytes. *Immunological Reviews*, **71**: 1081-1115.
- Glassker E. Konings W.N., Poolman B. (1996) Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmotic stress and hyper- and hypo-osmotic shock. *J. Biol. Chem.* **271**:10060-10065.
- Gowrishankar J., Manna D. (1996) How is osmotic regulation of transcription of the *Escherichia coli proU* operon achieved?. *Genetics* **97**:363-378.
- Gullans S.R., Blumenfeld J.D., Balschi J.A., Kaleta M., Brenner R.M., Heilig C.W., Hebert S.C. (1988) Accumulation of major organic osmolytes in rat renal inner medulla in dehydration. *Am. J. Physiol.* **255**: F626-F634.
- Guzmán-Partida A.M., Valenzuela-Soto E.M. (1998) Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* **119**:485-491.
- Guyton A.C. (1981) Medical Physiology. Sexta edición. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Handler J.S., Kwon H.M. (1993) Regulation of renal cell organic osmolyte transport by tonicity. *Am. J. Physiol.* **265**:C1449-C1455.
- Hanson A. D., Hitz W. D. (1982) Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **33**:163-203.
- Higgins C.F., Cairney J., Stirling D.A., Sutherland L., Booth I.R. (1987) Osmotic regulation of gene expression: ion strength as an intracellular signal? *TIBS* **12**:339-344.

- Hoekstra F.A., Golovina E.A., Buitink J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance, *Trends Plant. Sci.* **6**:431-438.
- Holmström K-O., Mäntylä E., Wellin B., Mandal A., Palva E.T. (1996) Drought tolerance in tobacco, *Nature*. **379**: 683-684.
- Imhoff J.F., Rodriguez-Valera F. (1984) Betaine is the main compatible solute of the halophilic eubacteria, *J. Bacteriol.* **160**:478-478.
- 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., *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **118**: 59-64.
- Jebbar M., Gouesbet G., Hindi-Kabbab S., Bernard T. (1995) Osmotic adaptation in *Brevibacterium linens*: differential effect of proline and glycine betaine on cytoplasmic osmolyte pool. *Arch. Microbiol.* **163**:380–386.
- Johansson K., El-Ahmad M., Ramaswamy S., Hjelmqvist L., Jörnvall H., Eklund H., (1998) Structure of Betaine Aldehyde Dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Science* **7**:2106-2117.
- Kempf B., Bremer E., (1998) Stress responses by *Bacillus subtilis* to high osmolarity environments: uptake and synthesis of osmoprotectants. *J. Biosci.* **23**:447 –455.
- Le Rudulier D., Bouillard L., (1983) Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the *Enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:152- 159.
- Mathews Van Hold (1995) Biochemistry, Second Edition. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc, pp. 165-201.

- McQueney M.S., Markham G.D. (1995) Investigation of monovalent cation activation of S-adenosylmethionine synthetase using mutagenesis and uranyl inhibition. *J. Biol. Chem.* **270**:18277-18284.
- Meury J. (1988) Glycine betaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **49**:232-239.
- Militello V., Vetri V., Leone M. (2003) Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin. *Biophys. Chem.* **105**:133-141.
- Moeckel GW, Lien YHH, (1997) Distribution of de novo synthesized betaine in rat kidney: role of renal synthesis on medullary betaine accumulation. *Am. J. Physiol.* F94-F99.
- Mori N, Kawakami B, Hyakutome K, Tani Y, Yamada H, (1980) Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpum didyman* M-1. *Agric. Biol. Chem.* **44**:3015-3016.
- Mori N, Yoshida N, Kitamoto Y, (1992) Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. *J. Ferment. Bioeng.* **73**:352-356.
- Muntz J.A. (1949) The inability of choline to transfer a methyl group directly to homocysteine for methionine formation. *J. Biol. Chem.* **182**: 489-499.
- Nakamura T, Yokota S, Muramoto Y, Fukui K, Takabe T, (1997) Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant J.* **11**:1115-1120.

- Nakanishi T., Uyama O., Nakahama H., Takamitsu Y., Sugita M. (1993) Determinants of Relative Amounts of Medullary Organic Osmolytes: Effects of NaCl and Urea Differ. *Am. J. Physiol.* **264**:F472-F479.
- Paleg L.G., Stewart G.R., Bradbeer J.W. (1984) Proline and glycine betaine influence protein solvation. *Plant Physiol.* **75**:974-978.
- Perroud B y D. Le Rudulier. (1985) Glycine betaine transport in *Escherichia coli*: osmotic modulation. *J. Bacteriol.* **161**:383-401.
- Pietruszko R., Kikonyogo A., Cherm M.-K., Izaguirre G. (1996) Human aldehyde dehydrogenase E3. **In**: Enzymology and molecular biology of carbon metabolism (Weiner *et al.* Eds.), Plenum Press., New York, pp. 243.
- Poolman B., Glaasker E. (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**:397-407.
- Riou N., Le Rudulier D. (1990) Osmoregulation in *Azospirillum brasilense*: glycine betaine transport enhances growth and nitrogen fixation under salt stress. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1455-1461.
- Schröpel-Meier G., Kaiser M.M. (1988) Ion homeostasis in chloroplasts under salinity and mineral deficiency. *Plant Physiol.* **87**:822-827.
- Sibley M.H., Yopp J.H. (1987) Regulation of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the halophilic cyanobacterium *Aphanethece halophytica*: a possible role in glycine betaine biosynthesis. *Arch. Microbiol.* **149**:43-46.

- Nakanishi T., Uyama O., Nakahama H., Takamitsu Y., Sugita M. (1993) Determinants of Relative Amounts of Medullary Organic Osmolytes: Effects of NaCl and Urea Differ. *Am. J. Physiol.* **264**:F472-F479.
- Paleg I.G., Stewart G.R., Bradbeer J.W. (1984) Proline and glycine betaine influence protein solvation. *Plant Physiol.* **75**:974-978.
- Perroud B y D. Le Redulier. (1985) Glycine betaine transport in *Escherichia coli*: osmotic modulation. *J. Bacteriol.* **161**:383-401.
- Pietruszko R., Kikonyogo A., Chern M.-K., Izaguirre G. (1996) Human aldehyde dehydrogenase E3. **In**: Enzymology and molecular biology of carbon metabolism (Weiner *et al.* Eds.), Plenum Press., New York, pp. 243.
- Poolman B., Glaasker E. (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**:397-407.
- Riou N., Le Rudulier D. (1990) Osmoregulation in *Azospirillum brasilense*: glycine betaine transport enhances growth and nitrogen fixation under salt stress. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1455-1461.
- Schröpel-Meier G., Kaiser M.M. (1988) Ion homeostasis in chloroplasts under salinity and mineral deficiency. *Plant Physiol.* **87**:822-827.
- Sibley M.H., Yopp J.H. (1987) Regulation of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the halophilic cyanobacterium *Aphanethece halophytica*: a possible role in glycine betaine biosynthesis. *Arch. Microbiol.* **149**:43-46.