



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Generación de la aldehído deshidrogenasa humana
clase 2 variante asiática (H2E487K) y su análisis
cinético.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:
DIANA CECILIA VILLALOBOS LÓPEZ**

**DIRECTOR DE TESIS
DRA. BELEM YOVAL SÁNCHEZ**



CD. MX.

AÑO 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dr. J. Eleazar Martínez Barajas
VOCAL: Profesor: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
SECRETARIO: Profesor: Dra. Belem Yoval Sánchez.
1er. SUPLENTE: Profesor: Oscar Humberto Pérez Díaz
2° SUPLENTE: Profesor: Genaro Jiménez Reyes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”.

**FINANCIAMIENTO OTORGADO POR CONACYT PROYECTO NO.:257943
CON EL NOMBRE MITIGACIÓN DE PROCESOS NEURODEGENERATIVOS A
TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE DIFERENTES ISOFORMAS DE ALDEHÍDO
DESHIDROGENASAS (ALDHS).**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Belem Yoval Sánchez

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. José Salud Rodríguez Zavala

SUSTENTANTE:

Diana Cecilia Villalobos López

Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
2.1 Generalidades de las enzimas.....	3
2.2 Cinética enzimática.....	5
2.3 Función, nomenclatura y estructura de las aldehído deshidrogenasas.....	7
2.4 Mecanismo de reacción de las aldehído deshidrogenasas.....	10
2.5 ALDH1A1.....	12
2.6 ALDH2.....	12
2.7 ALDH3A1.....	13
2.8 Aldehídos tóxicos.....	14
2.9 Polimorfismo ALDH2*2.....	15
2.10 Piperlonguminina y Alda-1.....	16
3. Hipótesis.....	17
4. Objetivo general.....	17
5. Objetivos particulares.....	17
6. Materiales y métodos.....	18
6.1 Obtención de la mutante H2E487K y amplificación de los genes.....	18
6.1.1 Reactivos para obtener los fragmentos por PCR.....	18
6.1.2 Reactivos para obtener el traslape.....	19
6.1.3 Condiciones de PCR.....	19
6.2 Electroforesis en gel de agarosa (DNA).....	19
6.3 Extracción de DNA a partir de geles de agarosa.....	20

6.4 Ligación al vector de sobreexpresión.....	20
6.4.1 Condiciones de la ligación.....	21
6.5 Transformación a células de <i>E. coli</i> (DH5- α).....	21
6.6 Purificación del plásmido a partir de cultivos bacterianos.....	22
6.7 Análisis de restricción.....	23
6.7.1 Reactivos para la reacción de restricción.....	23
6.8 Análisis de la secuenciación.....	23
6.9 Obtención de células competentes.....	24
6.10 Transformación en células competentes de <i>E. coli</i> de la cepa BL21.....	24
6.11 Expresión y purificación de la proteína recombinante.....	24
6.12 Cuantificación de la proteína.....	25
6.13 Electroforesis de la proteína en geles de poliacrilamida-SDS.....	26
6.14 Determinación de la pureza de la proteína.....	27
6.15 Caracterización cinética.....	27
6.15.1 Actividad enzimática.....	27
6.15.2 Efecto de los moduladores sobre la actividad de H2E487K.....	27
6.15.3 Determinación del paso limitante.....	27
6.15.4 Efecto de la temperatura.....	28
6.15.5 Evaluación de la susceptibilidad a aldehídos tóxicos.....	28
7. Resultados.....	28
7.1 Obtención y amplificación de los genes.....	28
7.2 Ligación del gen al vector de clonación y transformación en células DH5- α	29

7.3 Análisis de la secuencia de aminoácidos.....	31
7.4 Sobre-expresión y purificación de las enzimas recombinantes.....	32
7.5 Determinación de los parámetros cinéticos.....	34
7.5.1 Determinación de K_m y V_{max}	34
7.5.2 $K_{0.5}$ por Alda-1 y PPLG.....	35
7.5.3 Determinación de K_m y V_{max} en presencia de Alda-1 y PPLG.....	36
7.6 Aldehídos tóxicos.....	41
7.7 Inactivación de E487K en presencia de Alda-1 y PPLG.....	44
7.8 Determinación del paso limitante sobre el mecanismo cinético.....	45
7.9 Efecto de la Temperatura.....	47
8. Análisis y discusión de resultados.....	50
9. Resumen de resultados.....	53
10. Conclusiones.....	53
11. Referencias.....	54

Abreviaturas

ALDHs, Aldehído deshidrogenasas

ALDH1A1, Aldehído deshidrogenasa clase 1A1

ALDH2, Aldehído deshidrogenasa clase 2

ALDH2*2 o H2E487KALDH2, variante asiática

ALDH3A1, Aldehído deshidrogenasa clase 3A1

ALDA-1, N-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida

PPLG, (2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-il)-N-(2-metilpropil)penta-2,4-dienamida

NAD⁺, Nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado)

NADH, Nicotinamida adenina dinucleótido (reducido)

4-HNE, 4-hidroxi-2-nonenal

[S], Concentración de sustrato

[E], Concentración de enzima

[ES,]Concentración del complejo enzima-sustrato

[EAS], Concentración del complejo enzima-activador-sustrato

DOPAL, 3,4-dihidroxifenilacetaldehído

DOPAC, 3,4-dihidroxifenilacético

MDA, Malondialdehído

IPTG, Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido

kDa, kilodalton

Resumen

Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) son un grupo de enzimas que catalizan la oxidación de una amplia variedad de aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos. Estas enzimas participan en diversos procesos biológicos, incluyendo la desintoxicación de aldehídos generados exógena y endógenamente. Estos aldehídos están involucrados en la etiología y patogénesis de padecimientos en los que se generan altos niveles de estrés oxidante, como la diabetes, la obesidad, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades hepáticas, las enfermedades cardiovasculares, entre otras. Existen diferentes isoformas de las ALDHs, de las cuales las más estudiadas son ALDH1A1, ALDH2 y ALDH3A1, por su alta capacidad de metabolizar aldehídos tóxicos. En particular la ALDH2 está involucrada eficientemente en el metabolismo del etanol, al catalizar la reacción de acetaldehído a su respectivo ácido carboxílico para su posterior eliminación. Debido a la importancia de estas enzimas, es necesario conocer a fondo sus características estructurales y cinéticas con el fin de modular su actividad y proponer compuestos que contribuyan a mitigar el estrés oxidante generado a partir de aldehídos lipídicos.

Una de las variantes de ALDH2 es causada por un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el gen ALDH2 y se encuentra en un 50% de la población del este asiático. Este polimorfismo está asociado a una mutación estructural generada por el intercambio del aminoácido glutamato (E) por una lisina (K) en la posición 487, la cual previene la formación de un par de puentes de hidrogeno que son importantes para la estabilización de la estructura cuaternaria de la enzima. La carencia de estos puentes de hidrogeno desestabiliza el sitio de unión de la coenzima, lo cual abate casi por completo la actividad de la enzima. Debido a lo anterior, en las personas que poseen dicho polimorfismo se acumulan altas concentraciones de diferentes aldehídos, por lo cual, son menos tolerantes al consumo de etanol y muestran una mayor predisposición a padecer diferentes enfermedades que involucran altos niveles de estrés oxidante.

Por otro lado, se ha determinado que el compuesto ALDA-1 es un modulador positivo de la actividad de ALDH2 incrementando un 40-80% su actividad. Además,

en presencia de este compuesto la variante asiática (H2E487K) recupera 30% de su actividad y se ha determinado que el mecanismo es mediante la restauración de la estructura del sitio de unión del NAD⁺, recuperando la afinidad por esta coenzima. Sin embargo, el Alda-1 posee un dominio diclorobenzamida que podría ser tóxico para la célula y a pesar de eso, no se han reportado estudios relacionados a la toxicidad de este compuesto. Por lo anterior, en este trabajo nos enfocamos en estudiar el efecto de la piperlonguminina sobre las propiedades cinéticas de la variante asiática de la ALDH2 humana. La PPLG es un compuesto de origen natural obtenido de la pimienta (*Piper longum*), ampliamente utilizado en la medicina tradicional asiática. A nivel estructural es similar al ALDA-1 y ha sido reportado que posee propiedades anti-cancerígenas, antimelanogénica, antihiperlipidémica, antiplaquetaria y analgésica. Se determinó que PPLG incrementa un 30% la actividad de la enzima y la protege parcialmente de la inactivación por aldehídos lipídicos.

La caracterización de nuevos moduladores de estas enzimas, brinda la posibilidad de diseñar nuevas estrategias terapéuticas que contribuyan a mitigar el estrés oxidante generado por la acumulación de aldehídos.

1. Introducción

2.1 Generalidades de las enzimas

En los sistemas vivientes se llevan a cabo una enorme variedad de reacciones bioquímicas, casi en su totalidad mediadas por un conjunto de catalizadores biológicos denominados enzimas.

La mayoría de las enzimas poseen las siguientes propiedades:

- a) Incrementan la velocidad de una reacción. En general, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas es de 10^8 a 10^{20} veces más alta comparado con reacciones no catalizadas.
- b) Condiciones de reacción moderadas. Poseen la capacidad de llevar a cabo la catálisis en disoluciones acuosas diluidas, temperaturas inferiores a 100°C , presión atmosférica y pH casi neutro.
- c) Mayor especificidad de reacción. Las enzimas tienen un alto grado de especificidad por sus sustratos, comparado con los catalizadores químicos.
- d) Capacidad de regulación. La actividad catalítica de las enzimas se puede modular por la presencia de cofactores o coenzimas presentes en el medio de reacción.

Las enzimas se nombran agregando el sufijo *-asa* al nombre del sustrato o a la función catalítica de la enzima. Debido a que al principio no había normas sistemáticas para denominar a las enzimas, esta práctica condujo a que se usaran dos nombres diferentes para la misma enzimas, es por ello que la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) adoptó un esquema para la clasificación funcional sistemática y la nomenclatura de las enzimas (Lehninger., 2007).

Las enzimas se clasifican y denominan de acuerdo con la naturaleza de las reacciones químicas que catalizan. Existen seis clases principales (Tabla 1), además de subclases y sub-subclases. A cada enzima se le asignan dos nombres y un número de clasificación de cuatro partes; por ejemplo, nombre recomendado

carboxipeptidasa A, nombre sistemático peptidil-L-aminoacidohidrolasa y sus número de clasificación EC 3.4.17.1 ("EC" comisión de enzimas) (Voet et al., 2009).

Tabla 1. Clasificación de enzimas de acuerdo al tipo de reacción

Clasificación	Tipo de reacción catalizada
Oxidorreductasas	Reacciones de oxidación-reducción
Transferasas	Transferencia de grupos funcionales
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
Liasas	Eliminación de grupos para formar dobles enlaces
Isomerasas	Isomerización
Ligasas	Formación de enlaces, acoplado con la hidrólisis de ATP

La actividad catalítica de muchas enzimas depende de la presencia de pequeñas moléculas llamadas cofactores. Generalmente, estos cofactores son capaces de llevar a cabo las reacciones químicas que no pueden realizarse por el conjunto de los veinte aminoácidos diferentes existentes en las enzimas (Voet *et al.*, 2009; Herrera., 1991).

Los cofactores se subdividen en dos grupos: metales y moléculas orgánicas pequeñas llamadas coenzimas. (Tabla 2.)

Tabla. 2 Principales cofactores de algunas enzimas

Cofactor	Enzima
Coenzima	
Tiamina pirofosfato	Piruvato deshidrogenasa
Flavina adenina nucleótido	Monoamino oxidasa
Nicotinamida adenina dinucleótido	Lactato deshidrogenasa
Piridoxal fosfato	Glucógeno fosforilasa
Coenzima A	Acetil-CoA carboxilasa
Biotina	Piruvato carboxilasa
5'-Desoxiadenosil-cobalamina	Metilmalonil-mutasa

Tetrahidrofolato	Timidilato sintasa
Metal	
Zn ²⁺	Anhidrasa carbónica
Zn ²⁺	Carboxipeptidasa
Mg ²⁺	EcoRV
Mg ²⁺	Hexoquinasa
Ni ²⁺	Ureasa
Mo ²⁺	Nitrato reductasa
Se ²⁺	Glutación peroxidasa
Mn ²⁺	Superóxido dismutasa
K ⁺	Propionil-CoA carboxilasa

La efectividad de la acción catalítica de una enzima radica en la capacidad de su estructura proteica para moldearse, lo que es posible de formas muy diversas. La unión del sustrato al sitio correspondiente de la molécula de enzima, desempeña un papel fundamental en la especificidad enzimática, ya que las cadenas laterales de los aminoácidos que constituyen dicho sitio solo permiten el acoplamiento de compuestos con determinadas características estructurales (Herrera, 1991).

2.2 Cinética enzimática

La cinética de una reacción química estudia la velocidad del cambio entre el estado inicial de los sustratos, hasta la formación de los productos y los factores que la modifican. Debido a que las enzimas afectan la velocidad de las reacciones químicas, la aplicación de los principios básicos de la cinética a las reacciones catalizadas por enzimas constituye la cinética enzimática (Herrera, 1991).

Existen diferentes factores que afectan la velocidad de una reacción enzimática; entre ellos cabe destacar: la concentración de enzima y sustrato, la concentración de los activadores e inhibidores; además de la fuerza iónica del medio, el pH y la temperatura (Herrera, 1991; Horton et al., 1995). Por lo tanto, para poder estudiar

la cinética de una determinada enzima, es necesario incluir en la mezcla de reacción los componentes mencionados.

En la cinética enzimática, de la misma forma que en la cinética química, la velocidad de las reacciones se expresa en función de la variación de la concentración del sustrato. La ecuación que define a una reacción enzimática debe relacionar estos dos parámetros. De la ecuación A deriva la ecuación de Michaelis-Menten (B), que define la ecuación de velocidad de una enzima para un solo sustrato (Fig.1).



Figura 1. A) Modelo de Michaelis-Menten. En este modelo la enzima [E] se une con el sustrato [S] reversiblemente para formar el complejo enzima-sustrato [ES] que después se rompe para formar el producto [P] e iniciar un nuevo ciclo catalítico. B) Ecuación de Michaelis-Menten

Algunas enzimas presentan un comportamiento hiperbólico, incluidas las aldehído deshidrogenasas (ALDHs). Este comportamiento es explicado por la ecuación de Michaelis-Menten que relaciona la velocidad inicial, la velocidad máxima y la concentración inicial del sustrato. La representación gráfica de una enzima michaeliana es una hipérbola, debido a la saturación de la enzima con el sustrato, este hecho, constituye tanto un proceso de primer orden, como de orden cero (Fig. 2A). De este gráfico se derivan dos conceptos básicos, V_{\max} y K_m , los cuales describen la velocidad máxima de la enzima y la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima, respectivamente (Lehninger, 2005). La ecuación de Michaelis-Menten puede expresarse algebraicamente de otras formas que permitan una práctica determinación de los parámetros cinéticos como la ecuación de Lineweaver-Burk o dobles recíprocos; la representación gráfica de esta ecuación permite identificar la V_{\max} y K_m ; el punto de corte con el eje de las ordenadas es el equivalente a la inversa de V_{\max} , mientras que el de abscisas es el valor de $-1/K_m$ (Fig. 2B). También se puede visualizar el comportamiento de una

enzima en presencia de un inhibidor y determinar el tipo de inhibición (competitivo, no competitivo, entre otros), pero a pesar de la practicidad de la ecuación, pequeños errores experimentales pueden afectar la representación gráfica llevando a un asignación errónea de parámetros cinéticos; por lo cual existen otros regráficos que nos permiten determinar con mayor precisión estos parámetros.

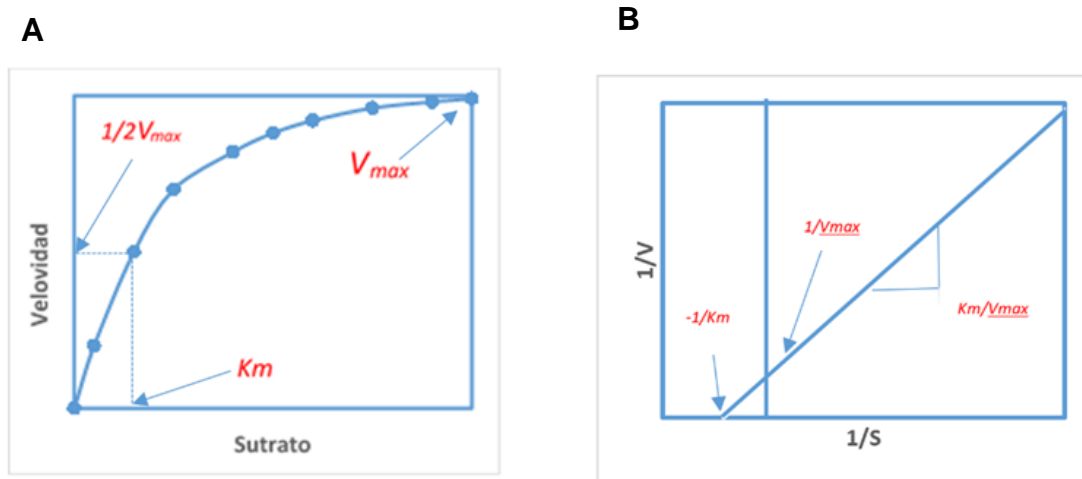


Figura 2. Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk (dobles recíprocos)

2.3 Función, nomenclatura y estructura de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs)

La superfamilia de las ALDHs son un grupo de enzimas involucradas en el metabolismo de un amplio espectro de aldehídos generados endógenamente y exógenamente. Los aldehídos endógenos se forman durante el metabolismo de alcoholes, aminoácidos, vitaminas, esteroides y lípidos; mientras que los aldehídos exógenos suelen generarse por el metabolismo de fármacos, agentes ambientales, la combustión de hidrocarburos y también se pueden adquirir a partir de la dieta (Vasiliou *et al.*, 2000). Estas enzimas, catalizan la oxidación de dichos aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos en una reacción dependiente de NAD(P)⁺ como coenzima. Se encuentran ampliamente distribuidas tanto en bacterias como en mamíferos; hasta la fecha se han identificado diecinueve genes de ALDH en el

genoma humano. La participación de estas enzimas en la regulación de la concentración de aldehídos es muy importante en diferentes procesos celulares, transformando intermediarios de vías metabólicas o llevando a cabo la oxidación de aldehídos que participan en vías de señalización, ya sea como mensajeros intracelulares o reguladores de la transcripción (Marchitti *et al.*, 2008).

En el sistema de nomenclatura actual de las ALDHs para nombrar cada gen, primero se utiliza el símbolo ALDH usado como abreviación de aldehído deshidrogenasa, seguido por el número arábigo que representa la familia y cuando se requiere se usa una letra mayúscula que designa la subfamilia y un segundo número arábigo que indica el gene individual dentro de la subfamilia. Para que una ALDH sea miembro de una familia, debe tener al menos un 70% de identidad de aminoácidos con el resto de proteínas perteneciente a esa familia y para que dos proteínas pertenezcan a una subfamilia debe tener más del 85% de identidad de aminoácidos (Vasiliou *et al.*, 1999; Hempel *et al.*, 1993). Las tres isoformas de aldehído deshidrogenasas más estudiadas en mamíferos son ALDH1A1, citosólica; ALDH2, mitocondrial y ALDH3A1, citosólica. Estas enzimas son tejido específicas, expresándose principalmente en hígado, cerebro, ojos, células rojas, riñón (ALDH1A1), corazón, cerebro, hígado, próstata (ALDH2), glándulas salivales, córnea, estómago, hígado, tracto urinario (ALDH3A1) (Crabb *et al.*, 2004. Vasilis *et al.*, 2000).

La especificidad por sustratos de cada isoforma, está determinada por los aminoácidos que conforman el túnel del sitio activo, ayudando a discriminar entre aldehídos aromáticos, alifáticos y otros (Mann *et al.*, 1999). En el caso de ALDH1A1, ésta utiliza aldehídos alifáticos de cadena corta, mediana y larga, así como aldehídos aromáticos. La ALDH2 toma con alta afinidad aldehídos alifáticos de cadena corta, tales como el acetaldehído y propionaldehído; mientras que ALDH3A1 es preferentemente más afín por aldehídos aromáticos, tal como el benzaldehído (Klyosov *et al.*, 1996; Pappa *et al.*, 2003).

También el estado de oligomerización de las ALDHs es variable, en el caso de la ALDH1A1 y ALDH2 la secuencia de aminoácidos que las conforman promueve un

arreglo tetramérico; estas isoformas comparten aproximadamente el 70% de identidad entre ellas; mientras que la ALDH3A1 es un dímero y sólo comparte el 30% de identidad respecto a las isoformas tetraméricas (Liu *et al.*, 1997). A pesar de estas diferencias, los monómeros de todas las isoenzimas poseen en esencia la misma estructura tridimensional y tres dominios: el dominio catalítico, el dominio de unión a la coenzima y el dominio de oligomerización. Por otra parte, es importante mencionar que ALDH1A1 y ALDH2 presentan una extensión de 56 aminoácidos en el amino terminal (el tamaño del monómero es alrededor de 500 aminoácidos), con respecto a ALDH3A1, esta isoforma no presenta esos 56 aminoácidos; sin embargo, posee una extensión de 17 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal (monómero de 453 aminoácidos), que interactúa con el otro monómero para formar el dímero (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001) (Figura 3).

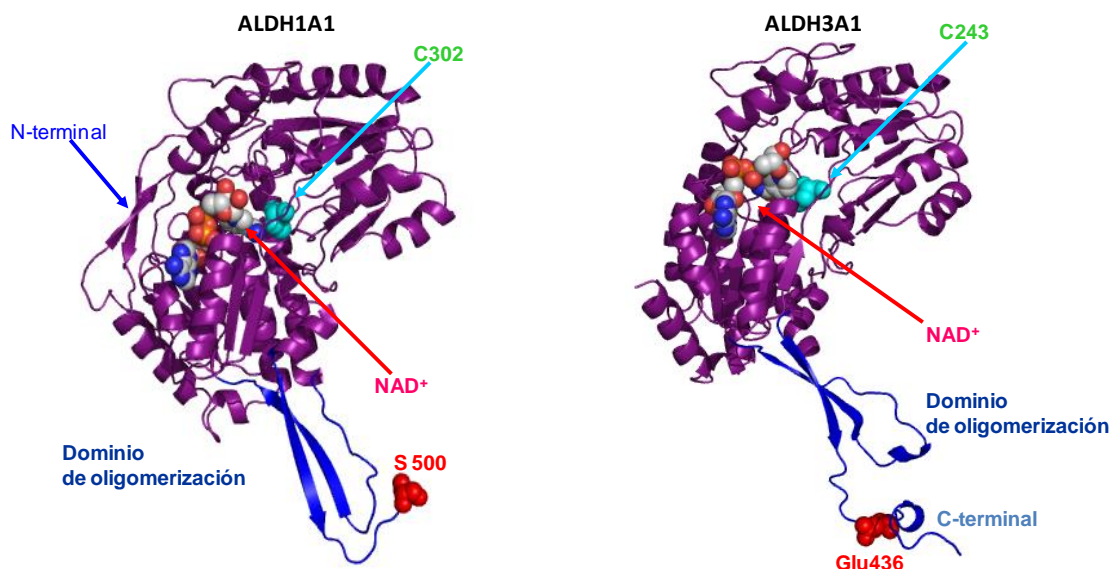


Figura 3. Estructura terciaria de las subunidades de las enzimas ALDH1A1 y ALDH3A1 (Rodríguez-Zavala and Weiner, 2000).

La participación de estas enzimas es crucial en padecimientos que involucran altos niveles de estrés oxidante, como las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades hepáticas, la aterosclerosis, la obesidad, la diabetes; en general enfermedades donde la respuesta antioxidante es rebasada y la generación de radicales libres y aldehídos es muy elevada (Florence.,

1995; Chen *et al.*, 2014). Es por ello que los polimorfismos genéticos de las ALDHs que disminuyen su actividad enzimática se asocian con diversas patologías, incluyendo el síndrome de Sjögren-Larsson, la hiperprolinemia tipo 2, las convulsiones dependientes de piridoxina, la hiperamonemia, la aciduria γ -hidroxibutírico, y la enfermedad hepática alcohólica (Marchitti *et al.*, 2008).

2.4 Mecanismo de reacción de las ALDHs

La reacción global catalizada por las aldehído deshidrogenasas es:



El mecanismo de reacción de este grupo de enzimas es secuencial ordenado. La oxidación de aldehídos es dependiente de NAD(P)^+ , que se une a la enzima libre generando un cambio conformacional, lo cual disminuye el pK_a del residuo de cisteína catalítico e involucra una reacción nucleofílica del sustrato con la Cys 243 en ALDH3A1 y Cys302 en ALDH1A1 y ALDH2, generando un intermediario tiohemiacetal. Posteriormente, ocurre la transferencia del hidruro, esta transferencia se da del intermediario tiohemiacetal al NAD^+ , el cual se reduce a NADH, originando un intermediario tioéster, que es hidrolizado a ácido carboxílico, producto de la reacción. El final de este mecanismo involucra la activación de una molécula de H_2O por una base general que es un residuo de glutamato (E333 en ALDH3A1 y E268 en ALDH1A1 y ALDH2), este residuo realiza un ataque nucleofílico sobre el carbonilo del intermediario tioéster, de este modo, se genera el acilo que es el primer producto liberado por la enzima y por último es liberada la coenzima reducida (NADH) que es el segundo producto de esta reacción (Wang *et al.*, 1995; Mann *et al.*, 1999).

A pesar de que los diversos miembros de la superfamilia de las aldehído deshidrogenasas comparten ciertas características específicas a nivel estructural y funcional, el paso limitante para cada una de las enzimas es diferente: para la ALDH1A1 es la disociación o liberación de la coenzima reducida, mientras que para la ALDH2 es la desacilación o liberación del acilo y finalmente para la ALDH3A1 es

la transferencia del hidruro (Figura 4) (Mann *et al.*, 1999; Blackwellet *al.*, 1987; Weineret *al.*, 1976).

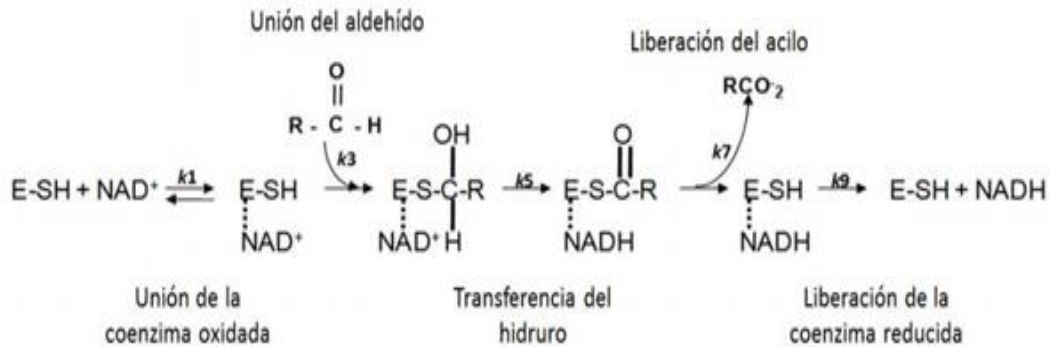


Figura 4. Mecanismo general de reacción de las ALDHs.

Algunos cationes divalentes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} , afectan la actividad específica de algunas isoformas de las ALDHs humanas, lo cual permite identificar la etapa limitante para cada isoforma; pues se ha demostrado que el ion Mg^{2+} , incrementa la velocidad de desacilación y disminuye la velocidad de disociación de la coenzima reducida. Mientras que el ion Mg^{2+} interactúa con el grupo pirofosfato del NAD^+ , promoviendo una unión más fuerte entre la enzima y la coenzima y haciendo más lenta su disociación; este hecho se ve reflejado en la disminución de las constantes de disociación del NAD^+ y el $NADH$ (K_{i_a} y K_{i_q} , respectivamente). En el caso de la ALDH2; se ha determinado que el ion Mg^{2+} promueve una conformación del $NADH$ dentro de la enzima, que favorece la desacilación y genera un incremento sobre la V_{max} . Es por ello, que en presencia de Mg^{2+} , se incrementa la actividad de la ALDH2, se inhibe la actividad de la ALDH1A1 y no hay efecto sobre la ALDH3A1. Esto podría estar relacionado con las sutiles diferencias que existen en la composición de aminoácidos que conforman el sitio de unión de la coenzima, en las diferentes isoformas (Takahashi *et al.*, 1980; Dickinson *et al.*, 1982 and Ho *et al.*, 2005).

2.5 ALDH1A1

La ALDH1A1 se encuentra distribuida en diferentes tejidos, como son ojos, cerebro, hígado, pulmón y riñón. En los ojos, juega un papel importante protegiendo al cristalino, debido a que se encarga de la desintoxicación de los aldehídos generados por la lipoperoxidación producida por la luz UV, manteniendo la transparencia de la córnea (Jester *et al.*, 1999). Por otro lado, esta enzima es utilizada como marcador de células cancerosas, debido a la alta concentración de ALDH1A1 que se ha encontrado en tejidos cancerosos a diferencia de la concentración en el tejido normal (mama, ovario, pulmón, páncreas e hígado) (Jiang *et al.*, 2009; Lovell *et al.*, 2001; Tume, 2014). También tiene una participación de gran impacto durante la embriogénesis, la ALDH1A1 oxida al retinaldehído para generar ácido retinoico, este producto es un mensajero intracelular y regulador transcripcional esencial durante la diferenciación celular y el desarrollo embrionario (Duester, 2000).

En el sistema nervioso central, la monoaminoxidasa (MAO) metaboliza la dopamina a su metabolito aldehído 3,4-dihidroxifenil acetaldehído (DOPAL) que puede ser neurotóxico y su acumulación puede llevar a la muerte celular asociada con patologías de tipo neurológico. La ALDH1A1 mantiene bajos los niveles de DOPAL, a través de su oxidación al ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), pues se ha demostrado que esta enzima se expresa de manera importante en las neuronas dopaminérgicas (Galter *et al.*, 2003; Martchitti *et al.*, 2007).

2.6 ALDH2

La ALDH2, fue la primera enzima en relacionarse con la desintoxicación del acetaldehído generado durante el metabolismo del etanol en el hígado. Esta enzima, actúa oxidando el acetaldehído a en acetato, el cual al ser menos reactivo se elimina fácilmente a través de la vía renal. Actualmente, se sabe que es la enzima responsable de la eliminación del 70% del acetaldehído generado en el hígado a causa de una ingesta alcohólica (Picklo *et al.*, 2001; Feldman *et al.*, 1971).

Aunado a lo anterior, se ha determinado que la ALDH2 es responsable de la activación de la nitroglicerina que se utiliza para tratar la insuficiencia cardiaca y

angina de pecho. La ALDH2 es capaz de reducir la nitroglicerina a nitrito, que posteriormente se metaboliza en la mitocondria por la enzima nitrato reductasa, generando óxido nítrico, este último es un mensajero que regula la actividad celular (Chen et al., 2006). Por otra parte, en los eventos de isquemia se producen altos niveles de 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) y se ha propuesto, que la eliminación de este compuesto por la ALDH2, puede ser uno de los mecanismos que protegen al corazón. A este respecto, en un modelo de roedores sometidos a un protocolo de isquemia-reperfusión, se ha descrito que la activación de esta enzima por la presencia de ALDA-1, reduce el tamaño del infarto un 60% (Chen et al., 2008; Eaton et al., 1999).

2.7 ALDH3A1

La ALDH3A1 desempeña un rol en el metabolismo de los aldehídos derivados de la peroxidación lipídica como lo son alcanales, alquenes y 4-hidroxi-quenales. El 4-HNE es el pro-oxidante más reactivo y citotóxico de los aldehídos producto de la peroxidación lipídica. (Benedetti, 1980).

La ALDH3A1 se ha detectado en altos niveles de expresión en la córnea y en el cristalino de mamíferos debido a que su función principal es la desintoxicación de aldehídos formados durante la peroxidación lipídica inducida por los radicales libres generados de radiación UV, proceso involucrado en la formación de cataratas (Piatigorsky, 1998; Pappa et al., 2003). Este efecto de protección fue demostrado ante la presencia de HNE en células transfectadas de la córnea que carecían de ALDH3A1 de manera endógena. Resultado que las células transfectadas fueron más resistentes a la apoptosis inducida por HNE. (Pappa et al., 2003).

Adicionalmente esta enzima se expresa de forma constitutiva en estómago, hígado, tracto gastrointestinal y las vías urinarias, desintoxicando al organismo de los aldehídos a nivel endógeno y de aquellos adquiridos a través de la dieta (Boesch et al., 1996; Lassen et al., 2007).

2.8 Aldehídos tóxicos

Los aldehídos son especies generadas durante la biotransformación de diversos compuestos endógenos, incluyendo lípidos, aminoácidos, neurotransmisores y carbohidratos; también pueden ser generados a partir de compuestos exógenos, entre ellos se encuentran el formaldehído, acetaldehído y acroleína que están presentes en el smog y en el humo del cigarro. Estos productos, provienen de la combustión incompleta de hidrocarburos o de procesos industriales y representan la principal fuente de contaminación en el aire por aldehídos (Esterbauer *et al.*, 1991; Rickert *et al.*, 1980; O'brien *et al.*, 2005).

Diferentes aldehídos se encuentran de manera natural en varios alimentos, a los cuales proporcionan olor y sabor. Sin embargo, también se encuentran en alimentos fritos, como consecuencia de la degradación de ácidos grasos en el aceite sometidos a altas temperaturas. Entre los aldehídos que se encuentran en mayor concentración están el 4-hidroxi-*trans*-2-nonenal, 4-oxo-*trans*-2-decenal y 4-oxo-*trans*-2-undecenal. Todos ellos son altamente electrofílicos y pueden reaccionar con proteínas, hormonas, enzimas y otros componentes del organismo modificando su estructura y en ocasiones su función (Gillén y Uriarte 2012).

Otro proceso importante es la peroxidación lipídica, los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares oxidándolos, estos ácidos grasos peroxidados se descomponen y sufren un acortamiento de su cadena lateral y se obtienen más de 2200 especies de aldehídos como son el malondialdehído (MDA), 2-alquenes y 4-hidroxi-2-alquenes como es el caso del 4-HNE. Aunque algunos aldehídos son esenciales para llevar a cabo diversos procesos biológicos normales. Muchos aldehídos son citotóxicos e incluso carcinogénicos (Luczaj *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 1996).

Por lo tanto, la peroxidación lipídica no solo ejerce daño directo en las membranas y en su función biológica, sino también de manera indirecta a través de los subproductos generados, propiciando la formación de aductos con el DNA y proteínas. Por otra parte, se ha descrito que el MDA es altamente mutagénico mientras que el 4-hidroxi-2-nonenal es altamente genotóxico. (Esterbauer 1993;

Papazafiropoulou *et al.*, 2011). Aunado a esto, bajas concentraciones de acroleína pueden inducir apoptosis por mecanismos que involucran la activación de caspasas y muerte mitocondrial, pero a concentraciones altas puede generar muerte celular por necrosis. Este fenómeno también se ha observado para el 4-HNE (Burcham *et al.*, 2001; Tanelet *et al.*, 2007; Chenget *et al.*, 2001).

La genocitotoxicidad y mutagenicidad de estos aldehídos es bien conocida y recientemente se ha pensado que son corresponsables de varias enfermedades como el cáncer, Alzheimer y Parkinson, entre otros (Guillén y Goicoechea, 2008; Picklo *et al.*, 2011).

2.9 Polimorfismo ALDH2*2

Se ha reportado que el 50% de la población asiática es sensible a la ingesta alcohólica y diversos reportes indican que esto se debe a la presencia de un polimorfismo en el alelo ALDH2*2, esta variante contiene un residuo de lisina en lugar de un glutamato en la posición 487 (E487K) y esta se ha asociado con una deficiencia en la actividad de ALDH2. La enzima presente en los individuos homocigotos con el alelo mutante es prácticamente inactiva, mientras que en los heterocigotos solo se observa un 40% de la actividad cuando se compara con la enzima silvestre. El alelo en forma homocigota muestra una velocidad alrededor de 8% del alelo normal, ya que muestra un valor de K_m más alto por NAD^+ , esto se debe a que en la estructura cristalográfica de la ALDH2 se observa la formación de puentes de hidrogeno entre el residuo E487 con los residuos R264 y R475, lo cual ayuda a estabilizar la interface dímero-dímero de la enzima, proporcionando integridad estructural al sitio de unión del NAD^+ ; pero en ALDH2*2 la presencia de un residuo de lisina, rompe estas interacciones provocando una transposición estructural que se ve reflejado en la reducción de 10 veces el valor de k_{cat} e incrementa 200 veces el valor de K_m por el NAD^+ (Steinmetz *et al.*, 1997; Larson *et al.*, 2007; Farrés *et al.*, 1994).

La disminución en la actividad enzimática de ALDH2, genera una mayor predisposición a padecer diferentes tipos de enfermedades que involucran altos niveles de estrés oxidante, tal como cáncer (esofágico, gástrico, colon, pulmón),

enfermedades neurodegenerativas, obesidad, alcoholismo, diabetes y cardiopatías (Yokoyama *et al.*, 1998; Picklo *et al.*, 2007).

2.10 Piperlonguminina y Alda-1

De acuerdo a lo mencionado la familia de las aldehído deshidrogenasa es de importancia el estudio de moduladores debido a que forman parte de un delicado equilibrio para reducir la acumulación de aldehídos, contrarrestar el daño de estos; entre otras funciones. En caso particular la ALDH2 ha surgido como clave para promover un efecto cardioprotector además de que en presencia del modulador Alda-1 hay una activación de esta enzima; también se ha demostrado que es capaz de activar a la ALDH1A1 y que restaura casi cerca la actividad de ALDH2 actuando como una chaperona estructural. (Chen *et al.*, 2008; Grant *et al.*, 2009; Belmont *et al.*, 2016; Pérez *et al.*, 2010).

La piperlonguminina es un compuesto químico aislado de la pimienta larga. Se ha descrito que esta y sus derivados ayudan en la despigmentación, dolor muscular, trastornos del sueño, tuberculosis, enfermedades respiratorias, artritis, enfermedades inflamatorias vasculares y recientemente que disminuye el daño por un evento por la isquemia / reperfusión. (Wonhwa *et al.*, 2013; Kyeong-soo *et al.*, 2005; Manoj *et al.*, 2004; Yoval *et al.*, 2020). Debido a que la estructura de la piperlonguminina es similar a la de Alda-1 y en el laboratorio se vio que esta aumenta la actividad de ALDH2 (Yoval *et al.*, 2020); se dio inicio al presente trabajo.

3. Hipótesis

La presencia de piperlonguminina en el sitio activo de la variante asiática H2E487K restablecerá la actividad de la enzima

4. Objetivo general

Evaluar el efecto de la piperlonguminina sobre las propiedades cinéticas y la estabilidad de la variante H2E487K.

5. Objetivos particulares

1. Generar la variante H2E487K (ALDH2*2), mediante mutagénesis sitio dirigida, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.
2. Clonar el gene de H2E487K en un vector de sobre-expresión
3. Purificar la enzima recombinante H2E487K.
4. Realizar la caracterización cinética de H2E487K en presencia de piperlonguminina y comparar los resultados con los efectos de Alda-1.
5. Evaluar el efecto de piperlonguminina sobre la estabilidad de la enzima y la inactivación por aldehídos lipídicos

6. Materiales y métodos

6.1 Obtención de la mutante H2E487K y amplificación de los genes

A partir de la secuencia de ALDH2 humana, se diseñaron oligonucleótidos en sentido directo y reverso que incluyeran el cambio de aminoácido deseado, en este caso el cambio de un glutamato en la posición 487 por lisina para generar la mutante ALDH2-Glu-487-Lys (H2E487K). Se utilizó la técnica de extensión de primers internos, con la finalidad de generar los dos fragmentos requeridos con la mutación de interés; para poder amplificar estos dos fragmentos se utilizó la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Para el primer fragmento (directo), se generó desde el inicio del gene hasta el sitio de mutación; mientras que para el segundo fragmento se generó desde el sitio de mutación hasta el extremo C-terminal del gene, se utilizó como DNA molde el gene de ALDH2 en un volumen final de reacción de 100 μ L y se generó un gradiente de T_m (59, 57, 55, 52 y 50°C).

Una vez generados los fragmentos con la mutación, se realizó una reacción de traslape para obtener el gene completo que codificara para la enzima mutante. Los productos de PCR se visualizaron con bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1%.

6.1.1 Reactivos para obtener los fragmentos por PCR

Desoxinucleotidotrifosfato (dNTPs).....	0.2 mM
Buffer Vent polimerasa	1X
DNA molde (ALDH2).....	250 ng
Cebador directo (H2487K2) o reverso (H2487k1).....	850-950 pg
Oligonucleótido UN-His o PT77-Ext-CT.....	900 pg
DNA Polimerasa (Vent polimerasa).....	2 U
H ₂ O destilada estéril.....	84 μ L
Volumen total.....	100 μ L

6.1.2 Reactivos para obtener el traslape

Desoxinucleotidotrifosfato (dNTPs).....	0.2 mM
Buffer Vent polimerasa	1X
DNA fragmento directo.....	250 ng
DNA fragmento reverso.....	250 ng
Cebador UN-His.....	900 pg
Cebador PT77-Ext-CT.....	900 pg
DNA Plimerasa (Vent polimerasa).....	2 U
H ₂ O destilada estéril.....	83 µL
Volumen total.....	100 µL

6.1.3 Condiciones de PCR

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	95	5
35	95	1
	42-58	1
	72	2
1	72	10

6.2 Electroforesis en gel de agarosa (DNA)

Los productos obtenidos de la PCR se separaron en un gel de agarosa al 1 %. Para ello se pesaron 0.35 gramos de agarosa disueltos en 35 mL de Buffer TAE 1X (45mM Tris, 45mM de ácido acético, 1mM EDTA) en presencia de bromuro de etidio. Posteriormente, las muestras se aplicaron en el gel ya solidificado y se corrieron a 90 volts por 45 minutos. Se utilizó el marcador de peso molecular de DNA de 1kb (marca New England BioLABs). Por último, los productos de PCR se observaron con la ayuda de un transiluminador UV.

6.6 Extracción de DNA a partir de geles de agarosa

Una vez que se observaron los fragmentos deseados en el gel, estos se cortaron y se procedió a purificarlos utilizando el kit de extracción y purificación de DNA GeneJet gel extraction kit (Thermo Scientific)[®]. En donde se añadió una solución de yoduro de potasio a saturación (800 μ L) al fragmento del gel y se incubó a 60°C por 10 minutos, después de que el gel se solubilizo con la solución, se procedió a transferir la solución a una columna de purificación y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Ya transcurrido el tiempo se centrifugó a 14,000 rpm durante un minuto para eliminar el sobrenadante, la solución salina y los residuos de agarosa. Posteriormente se adicionaron 700 μ L de solución de lavado (0.2M NaCl/ 20mM Tris/EDTA 2mM /Etano 45mLl) y nuevamente se centrifugó por un minuto a las mismas rpm y se desechó el sobrenadante. La columna se centrifugó una vez más en las mismas condiciones para remover cualquier residuo, posteriormente se transfirió la columna a un tubo eppendorf limpio y estéril. Se agregaron 30 μ L de buffer de elución (10mM Tris-HCl, pH 8.5) incubando la columna por 5 minutos a temperatura ambiente y se eluyó centrifugando por 1 minuto a 45000 rpm. El DNA purificado se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm y 280 nm, con el fin de determinar la pureza del DNA; Se considera que un valor de pureza óptimo se encuentra en el intervalo de $\lambda_{260/280} = 1.8-2$.

6.4 Ligación al vector de sobreexpresión

Una vez obtenido el DNA con la mutación correspondiente, se procedió a realizar reacciones de restricción con las enzimas NdeI y HindIII, con la finalidad de generar extremos cohesivos y poder insertar la secuencia al vector de sobreexpresión pET-45b ya previamente cortado con las mismas enzimas, a través de una reacción de ligación. En el diseño del gen, se adicionó a la proteína una etiqueta de histidinas en el extremo *N*-terminal, lo cual sirvió para su posterior purificación.

6.4.1 Condiciones de la ligación

Vector de sobreexpresión pET-45b.....	250 ng
Producto de PCR purificado (Inserto).....	0.5-1 µg
T4 DNA ligasa.....	400 U
ATP.....	1 µL
H ₂ O destilada estéril.....	6 µL
Incubar toda la noche a temperatura ambiente	

6.5 Transformación en células de *E. coli* (DH5-α)

La transformación de células de *E. coli* (DH5α) con la ligación se realizó con el kit TransformAid Bacterial Transformation (Fermentas)[®], este kit nos permite permeabilizar la membrana de la células con el fin de introducir el plásmido de interés.

El protocolo de transformación comenzó un día antes de la misma. Se inocularon 10 mL de medio LB (Tryptona, Extracto de levadura, NaCl) con una colonia de *E. coli* DH5-α, se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante (200 rpm). El día de la transformación se pre-incubaron placas de agar suplementadas con ampicilina 100 µg/mL y también un tubo con medio C (1.5 mL para dos transformaciones) a 37° por 20 minutos. Después, se adicionaron 150 µL del cultivo previo al medio C y se incubó por 20 minutos a 37°C y 200 rpm. Posteriormente, se cosecharon las células centrifugando a 14,000 rpm por 1 min a 4°C; el botón obtenido se resuspendió con 150 µL de solución T (50% de solución A y 50% de solución B) y se incubó en hielo por 5 min, se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones para cosechar y se resuspendió el botón con 150 µL de solución T y se incubó otra vez en hielo por 5 minutos. Se adicionaron 5 µL de la reacción de ligación y se incubó en hielo por 5 minutos. Finalmente, las bacterias se extendieron en las placas de agar y se incubó por toda la noche a 37°C. Las colonias se seleccionaron por la resistencia a ampicilina, ya que el vector pET45-b contiene un gen que codifica para la enzima β-lactamasa; gene que no tienen las células de *E. coli* DH5-α.

6.6 Purificación del plásmido a partir de cultivos bacterianos

Después de la transformación, las colonias aisladas se inocularon en 10 mL de medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/mL y se incubó toda la noche a 200 rpm y 37°C. La extracción de DNA plasmídico se realizó con el kit SV minipreps DNA purification system (Promega). A continuación se describe brevemente el proceso. Transcurrida la incubación se cosecharon las células centrifugando a 14,000 rpm por 1 minuto para obtener un botón de células que fueron resuspendidas con 250 µL de solución de resuspensión (50mM Tris-HCl – pH 7.5 / 10 mM EDTA / 100 µg/mL RNasa), posteriormente se adicionaron 250 µL de solución de lisis (0.2 M NaOH / 1% SDS) y se mezcló por inversión 4 veces; se añadieron 10 µL de proteasa alcalina y nuevamente se mezcló por inversión 4 veces dejando incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, se adicionaron 350 µL de solución de neutralización (4.09 M cloruro de guanidina / 0.759 M acetato de potasio / 2.12 M ácido acético glacial) mezclando por inversión 4 veces y se realizó una centrifugación por 10 minutos a 14,000 rpm a 4°C. Para la obtención del plásmido; se decantó el sobrenadante, en una columna de colección la cual se centrifugo por 1 minuto (14,000 rpm a 4°C), el lavado de la columna se realizó con 750 µL de solución de lavado (60% etanol / 60mM acetato de potasio / 8.3 mM Tris-HCl – pH 7.5 / 10 mM EDTA - pH 8.0), seguida por una centrifugación de 1 min, sin olvidar retirar el sobrenadante, para evitar contaminación. Este paso se repitió con 250 µL de la misma solución y se centrifugó por dos minutos. Finalmente para la elución del plásmido, la columna se transfirió a un tubo eppendorf limpio y estéril, adicionando 30 µL de amortiguador de elución (100 mM Tris-HCl– pH 7.5 / 10 mM EDTA), centrifugando por 1 minuto a 14,000 rpm. Con este DNA plasmídico se realizó el análisis de restricción y secuenciación, para corroborar la identidad de la clona.

6.7 Análisis de restricción

Una vez obtenido el DNA plasmídico purificado, se realizó una digestión con las enzimas Nde I y Hind III, con el fin de verificar la identidad de la construcción realizada. Para esto, se preparó un medio de reacción conteniendo 10µL de plásmido, 1 µL de cada una de las enzimas en un volumen final de 20 µl y la mezcla se incubó a 37 °C por 2 horas. Al término de este tiempo la muestra se corrió en un gel de agarosa al 1% a 90 volts por 45 minutos. Las bandas se revelaron con ayuda del transiluminador UV.

6.7.1 Reactivos para la reacción de restricción

DNA plasmídico.....	2.5-5 µg
Enzimas de restricción (NdeI/HindIII)	10/10 U
Amortiguador de reacción.....	1X
H ₂ O destilada y estéril.....	6 µL

6.8 Análisis de la secuenciación

La construcción de la mutación se envió a analizar por secuenciación automática de DNA a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. La secuencia obtenida se comparó con la secuencia de nucleótidos reportada para el gene de la ALDH2 humana y de esta manera evidenciar que la construcción realizada, únicamente contenía la mutación esperada.

6.9 Obtención de células competentes

Para generar células competentes, se realizó un cultivo de *E. coli* de la cepa BL21 en medio LB, dicho cultivo se incubó a 37°C y 200 rpm, por toda la noche. Al día siguiente se tomaron 500 µL del cultivo para inocular 50 mL de medio LB a 37°C y alcanzar una absorbancia entre 0.3-0.5 a 600nm. Las células se cosecharon centrifugando por 10 minutos a 14,000 rpm y 4°C. El botón obtenido fue resuspendido en 2 mL de CaCl₂ 0.1M estéril a 4°C y después se diluyó a 33 mL en

la misma solución. Se centrifugó nuevamente en las condiciones antes mencionadas y se retiró el sobrenadante. El pellet obtenido fue resuspendido nuevamente en 1 mL de CaCl₂ y se aforó hasta 40 mL con la misma solución. La solución se incubó por aproximadamente 4 horas a 4°C. Finalmente las células se cosecharon y fueron resuspendidas en 2 mL de CaCl₂ 0.1M estéril y 1 mL de glicerol. Se tomaron alícuotas de 100 µL en tubos eppendorf estériles, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C, hasta su utilización.

6.10 Transformación en células competentes de *E. coli* de la cepa BL21

Una vez realizado el análisis de secuenciación, se transformaron células competentes de *E. coli* de la cepa BL21 con las construcciones realizadas previamente. Como primer paso se mezclaron 50 µL de las células con el plásmido obtenido de las células de *E. coli* DH5- α incubando por 30 minutos a 4°C. Se aplicó un choque térmico a las células durante 2 minutos a 42°C, con la finalidad de permeabilizar la membrana y permitir la entrada del plásmido. Las células se incubaron a 4°C por 5 minutos. Se agregó 1 mL de medio LB sin antibiótico e incubaron a 37°C durante 1 hora. Finalmente se plaquearon las células en placas de medio LB (adicionado con agar al 1.5%, 100 µg/mL de ampicilina y 25µg/mL de cloramfenicol). Las células transformantes se seleccionaron por la resistencia a dichos antibióticos.

6.11 Expresión y purificación de la proteína recombinante

Una de las colonias de las células BL21 transformadas se inoculó en 10 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL y cloramfenicol 25µg/mL y se incubó a 37°C por toda la noche a 200 rpm. Con este precultivo, se inocularon 4 L de medio 2XYT (16g de extracto de levadura, 10 g de triptona y 5 g de cloruro de sodio en un litro de agua destilada) y suplementado con ampicilina 100µg/mL y cloramfenicol 25µg/mL, el cultivo se incubó a 37°C y 200rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5, a una longitud de onda de 600 nm. Después, se procedió a la inducción de la expresión de la enzima, para ello se adicionó isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.4 mM. La incubación continuó por toda la noche a

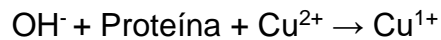
25°C y 200rpm. Para la purificación, las células se cosecharon centrifugando a 5000rpm durante 10 minutos, se lavaron dos veces con 100 mL de NaCl 0.9% y fueron guardadas a -70°C hasta su utilización. El día de la purificación, el pellet fue resuspendido adicionando 3 volúmenes de buffer A (fosfato de sodio 50mM pH 7.5/ 500mMNaCl/ 20mM 2-mercaptoetanol), en seguida las células se rompieron por sonicación (20 ciclos de 5 s de sonicación / 1 min de descanso) utilizando el sonicador MSE, modelo Soniprep 150 a 100 MHz de potencia. El extracto celular fue centrifugado a 45000 rpm durante 30 min y el sobrenadante que contenía la enzima recombinante se inyectó a una columna de afinidad acoplada con níquel, equilibrada con buffer A a 4°C. La columna se lavó con 100mL buffer A suplementado con 50mM de imidazol para eliminar las proteínas adheridas a la columna de manera inespecífica. Finalmente, la proteína de interés se eluyó mediante la aplicación de un gradiente de imidazol de 50mM a 250mM en un volumen final de 100 mL. La proteína pura se concentró utilizando filtros AMICON® con un límite de corte de peso molecular de 30 KDa, se lavó a 4°C con buffer de fosfato de sodio 100mM pH 7.4 para eliminar los restos de imidazol y se; almacenó a -20°C en presencia de 50% de glicerol hasta su utilización.

6.12 Cuantificación de la proteína

Previa a la determinación de la concentración de la enzima, es necesario realizar una precipitación de la proteína con el fin de eliminar compuestos que pudieran interferir con el método de cuantificación. En el protocolo de precipitación se tomó una alícuota de 50 µL de la enzima en un tubo eppendorf de 1.5mL, se adiciona TCA al 13% en un volumen final de 400µL y se incubó toda la noche a 4°C. Después del tiempo de incubación se centrifugo el tubo por 10 min a 14000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón utilizando 50µL de una solución compuesta por 5% SDS y NaOH 0.1M.

La concentración de la enzima se determinó mediante el método del ácido bicinónico (BCA), cuyo fundamento se basa en formar un complejo proteína-Cu²⁺ en condiciones alcalinas, seguido de la reducción de Cu²⁺ a Cu¹⁺, la cantidad de cobre reducido es proporcional al contenido de proteína presente. Finalmente, el

BCA forma un complejo púrpura-azul con el Cu^{1+} que se puede monitorear a 562 nm.



Para la determinación de la cantidad de proteína presente en la muestra se procedió a preparar una curva patrón a diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) (5-100 μg de proteína total). Después, se añadieron 2mL de la mezcla de reacción (solución A (ácido bicinconínico) + solución B (3.6 mM de CuSO_4)) a los tubos y se incubaron a 60°C por 15 min. Por último, se realizó la lectura de absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo UV-1800 a una longitud de onda de 562nm.

6.13 Electroforesis de la proteína en geles de poliacrilamida-SDS

A la purificación se le dio seguimiento para evaluar su pureza mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE electroforesis en el gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio), método para separar proteínas basado en el peso molecular bajo condiciones desnaturizantes. Se prepararon geles de poliacrilamida-SDS los cuales están compuestos por dos fases, el gel separador (10% solución acrilamida-bisacrilamida (9:1)/ 0.5 M Tris pH 8.8/ 0.1% SDS/ 0.5% TEMED/ 0.05% APS) y el gel concentrador (5% solución acrilamida-bisacrilamida (9:1)/ 0.1 M Tris pH 6.8/ 0.1% SDS/ 0.07% Temed/ 0.07% APS); las muestras se mezclaron con buffer de carga (50mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glicerol, 0.1% azul bromofenol, 100 mM DTT) en proporción 1:1 y se hirvieron durante 5 minutos en baño maría para desnaturizar la proteína. El gel se corrió a 150 volts por 45 minutos en el buffer de corrida (250mM Tris-HCl/ 192 mM glicina/ 0.1% SDS). Una vez concluida la electroforesis, el gel se tiñó con azul de Coomassie al 0.05 % en una mezcla de metanol al 50% y ácido acético al 10%. Finalmente, se destiñó con una mezcla de ácido acético al 10% y metanol al 50% en agua.

6.14 Determinación de la pureza de la proteína

Para determinar el porcentaje de pureza se realizó un análisis densitométrico del gel, utilizando el software ImageJ.

6.15 Caracterización cinética

6.15.1 Actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó en presencia de un amortiguador de fosfatos pH 7.4 a 25°C, utilizando diferentes concentraciones de los sustratos (NAD⁺ y aldehído). La reacción se inició con la adición del aldehído y se siguió espectrofotométricamente (Shimadzu UV-1800) a 340 nm la generación de NADH. Los resultados se analizaron por regresión no lineal usando la ecuación de Michaelis-Menten y realizando el correspondiente regráfico de dobles recíprocos de los datos obtenidos. Para dicho análisis se utilizó el software Microcal Origin v.8.0.

6.15.2 Efecto de los moduladores sobre la actividad de H2E487K

Para determinar la concentración y evaluar los efectos de alda-1 y PPLG, se utilizaron diferentes concentraciones de los mismos, manteniendo constantes las concentraciones de NAD⁺ y aldehído a pH 7.4. La actividad enzimática se siguió espectrofotométricamente a 340nm como se mencionó anteriormente.

6.15.3 Determinación del paso limitante

Para determinar si hubo alguna modificación en las constantes de velocidad del mecanismo de reacción, se utilizaron diferentes concentraciones de Mg²⁺, pues se ha determinado que dicho catión nos permite discernir entre los diferentes pasos limitantes en el mecanismo. Por lo cual, se mantuvieron constantes las concentraciones de enzima 0.85 mg, propionaldehído 1 mM y NAD⁺ 8 mM. Este ensayo también fue realizado en presencia de ALDA-1 o piperlonguminina (PPLG) a una concentración de 10 µM.

6.15.4 Efecto de la temperatura

Para evaluar el efecto de ALDA-1 y PPLG sobre la estabilidad estructural de la enzima, se incubaron 0.85 mg de la enzima en ausencia y presencia de los moduladores (20 μ M) y en condiciones saturantes de NAD⁺ (8mM) y propionaldehído (1mM). Dicha reacción se incubó a diferentes temperaturas en función del tiempo. La actividad enzimática remanente de cada condición, se determinó al adicionar el propionaldehído, siguiendo la generación de NADH a 340 nm en un espectrofotómetro con detector de arreglo de diodos (Agilent, modelo 8453).

6.15.5 Evaluación de la susceptibilidad a aldehídos tóxicos

Para determinar si existe un efecto de protección ante la inactivación por aldehídos lipídicos en presencia de los moduladores (ALDA-1 o PPLG), se evaluó la actividad de la enzima modificada (H2E487K) usando como sustratos al 4-HNE y acroleína, en ausencia y presencia de éstos, a concentraciones saturantes de NAD (8 mM).

7. Resultados

7.1 Obtención y amplificación de los genes

A partir de la secuencia reportada del gen de la ALDH2 humana, se diseñaron oligonucleótidos en sentido directo y reverso que incluyeran el cambio de un glutamato por una lisina en la posición 487 para generar la mutante ALDH2-Glu487Lys (H2E487K). Se realizaron las reacciones de PCR correspondientes mediante la técnica de extensión de primers internos con la finalidad de amplificar los dos fragmentos requeridos con las mutaciones en el sitio de interés.

El primer fragmento (directo) se generó desde el inicio del gene hasta el sitio de mutación, mientras el segundo fragmento (reverso) fue desde el sitio de la mutación hasta el extremo C-terminal. Los fragmentos correspondientes generados fueron de 1,500 pb y 500 pb (Fig. 5A y B), Después de haber obtenido dichos fragmentos, se realizó el traslape de éstos y se amplificó el gene completo correspondiente a 2,000 pb (Fig 5C).

7.2 Ligación del gene al vector de clonación y transformación en células DH5- α

El inserto de DNA obtenido por el traslape, se purificó del gel y se cortó con las enzimas NdeI y HindIII para ligarlo al vector de sobreexpresión pET-45b. Posteriormente, se transformaron las células de *E. coli* de la cepa de DH5- α para obtener suficientes copias del plásmido con el gen de interés. Para seleccionar las clonas que tuvieran el plásmido, la mezcla de transformación se extendió en cajas con medio LB más ampicilina, de tal forma que solo crecieran las clonas que contenían plásmido. La selección se da por resistencia a la ampicilina debido a que el plásmido contiene el gene que codifica para la enzima β -lactamasa, la cual rompe el anillo β -lactámico de los antibióticos de la familia de las penicilinas y cefalosporinas.

De las colonias que crecieron a partir de la transformación de las células DH5- α , se sembraron 3 en medio LB líquido con ampicilina (100 μ g/mL) para purificar los plásmidos. De éstos, se realizó un análisis de restricción para identificar los plásmidos que contuvieran el inserto correspondiente al gene con la mutación. La identidad de la mutante H2E487K se evaluó a partir de la digestión con la enzima NdeI y HindIII, generando dos fragmentos uno de 5,000 pb correspondiente al vector de sobreexpresión y otro de 1,500 pb con la mutación como se puede observar en la figura 6 indicando que los plásmidos contienen el gene de interés.

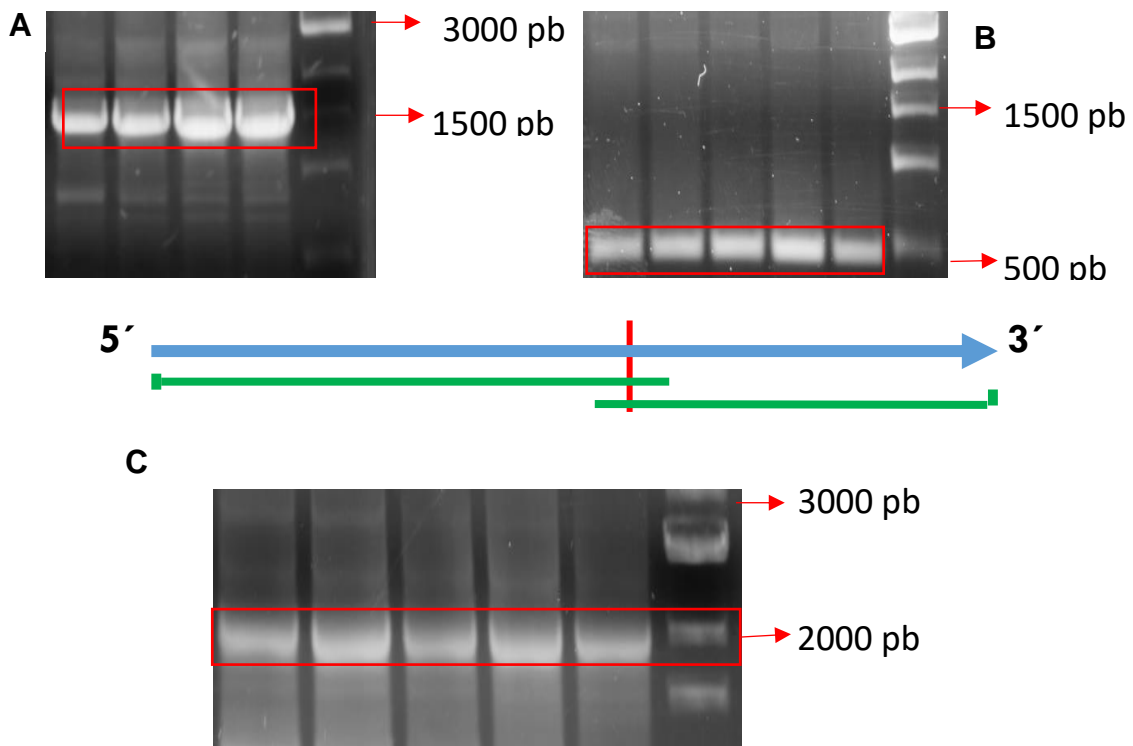


Figura 5. Resultados del análisis de electroforesis de los productos de las reacciones de PCR, para la obtención de la mutante H2E487K. (A) Fragmento directo de 1,500 pb; (B) Fragmento reverso de 500 pb; (C) Amplificación del gene completo de la mutante de 2000 pb. El último carril de cada figura corresponde al marcador molecular de 1 Kb.

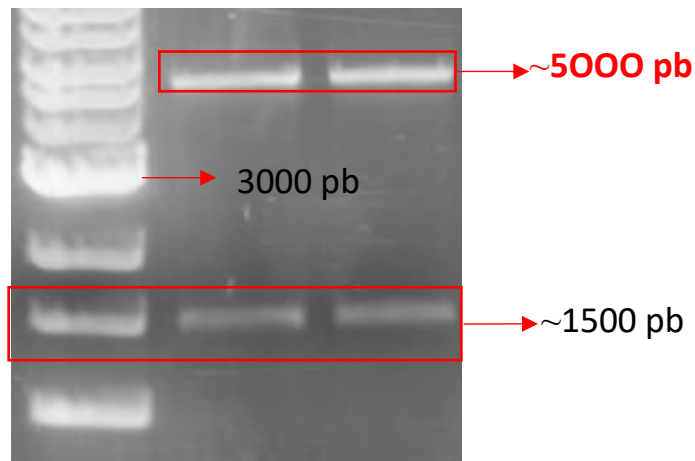


Figura 6. Análisis de restricción del plásmido. Digestión de los plásmidos correspondientes a la mutante con las enzimas de restricción NdeI y HindIII. En los recuadros se muestran las bandas con los fragmentos generados y en el primer carril el marcador de peso molecular de 1Kb.

7.3 Análisis de la secuencia de aminoácidos

De las clonas positivas del análisis de restricción, se seleccionó una, la cual se envió a secuenciación automática de nucleótidos. La secuencia obtenida se tradujo a secuencia de aminoácidos y se comparó con la reportada para el gen de la ALDH2 humana.

De la comparación de ambas mutantes se obtuvo un 99.8% de identidad. Este porcentaje se debe al cambio del aminoácido deseado para la enzima mutante (figura 7) y como se observa en la figura, no ocurrieron cambios espurios en la secuencia.

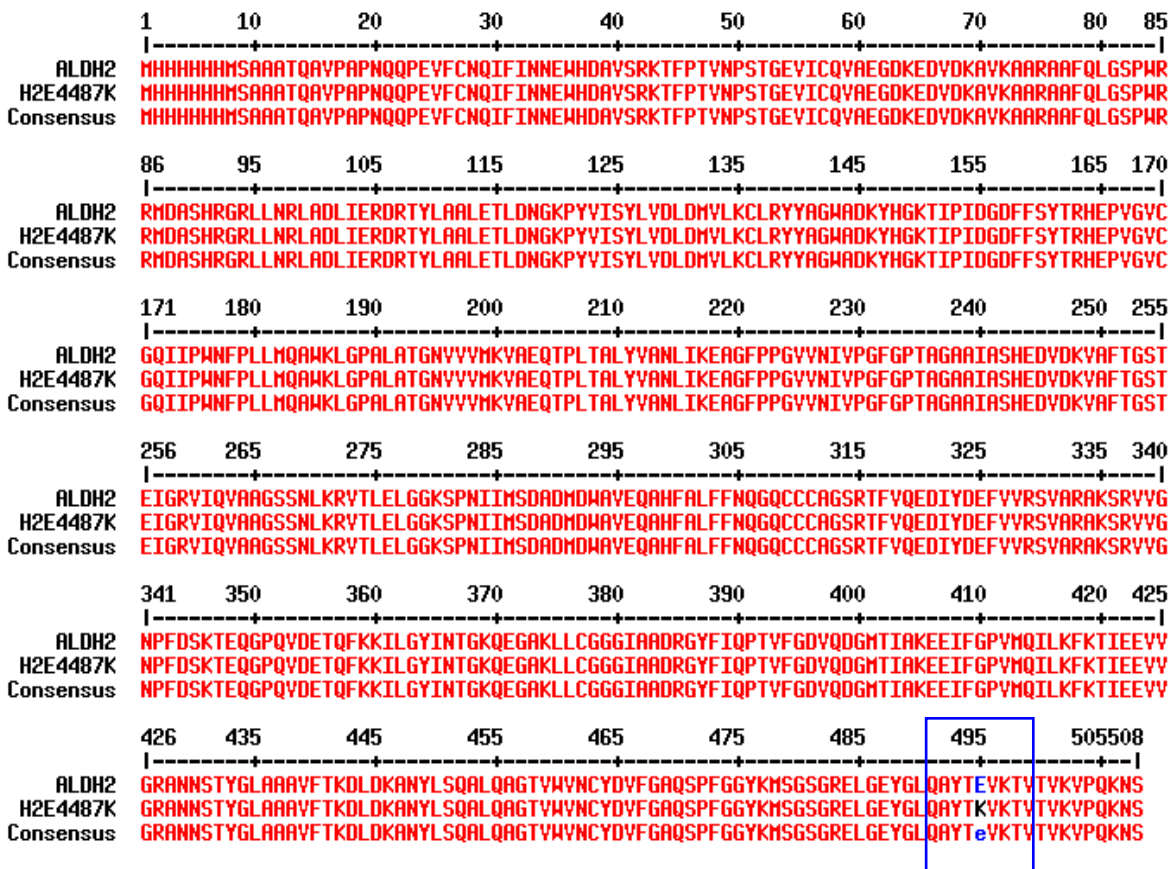
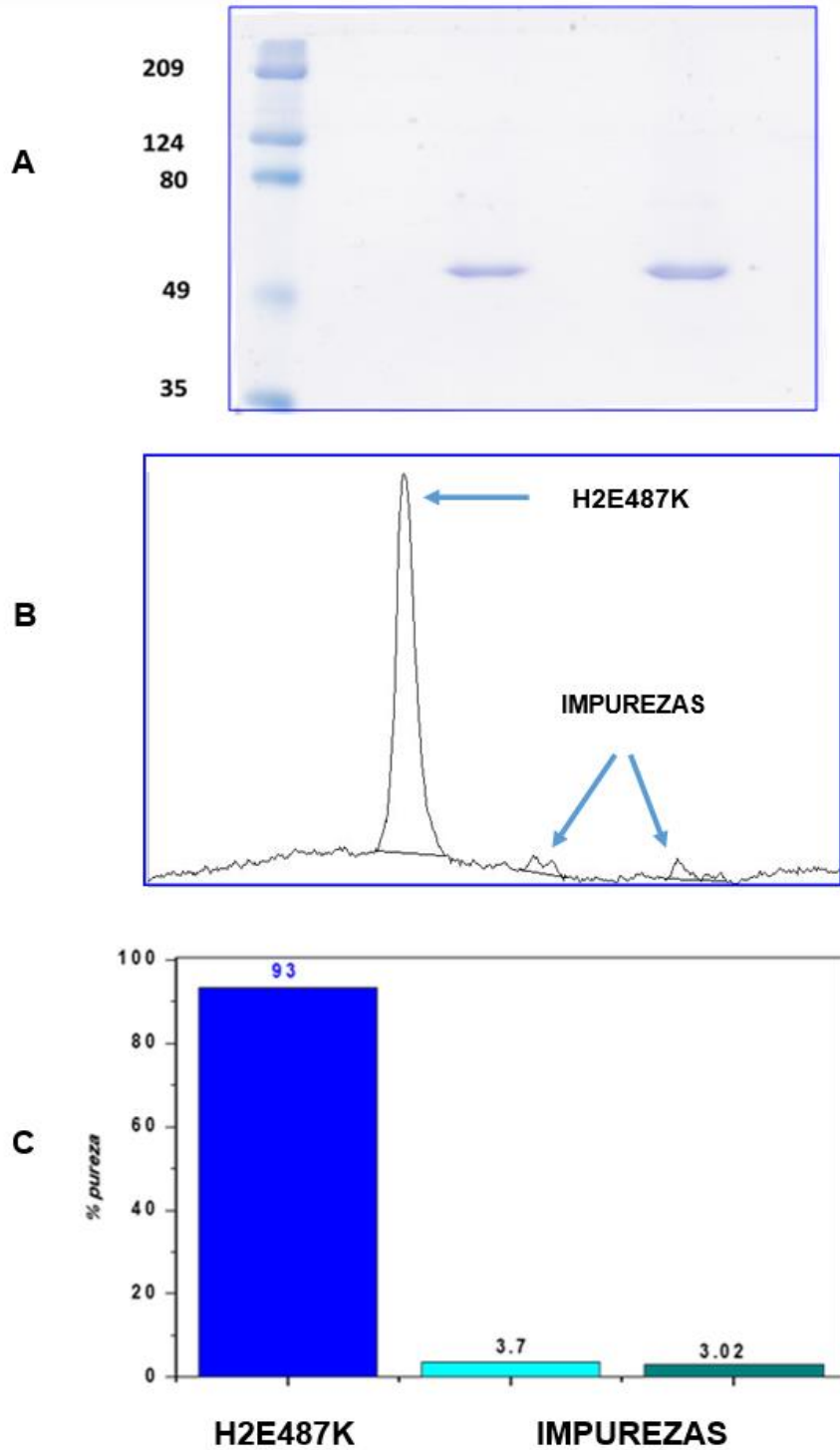


Figura 7. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la enzima mutante H2E487K. Dentro del recuadro azul se muestra el cambio de aminoácido.

7.4 Sobreexpresión y purificación de las enzimas recombinantes

El seguimiento de la proteína de interés, se realizó a través de la determinación enzimática en las fracciones eluidas con el gradiente de imidazol (materiales y métodos), una vez identificadas las fracciones con actividad enzimática, se lavaron y concentraron en filtros AMICON (MWCO 30KDa). La proteína purificada y concentrada se corrió en un gel desnaturizante de SDS-PAGE y se puede observar una banda de aproximadamente 54 KDa, la cual corresponde al peso molecular del monómero de ALDH2. Para obtener el porcentaje de pureza de la enzima se realizó un densitograma del gel, obteniendo un porcentaje mayor al 90% (Fig. 8).



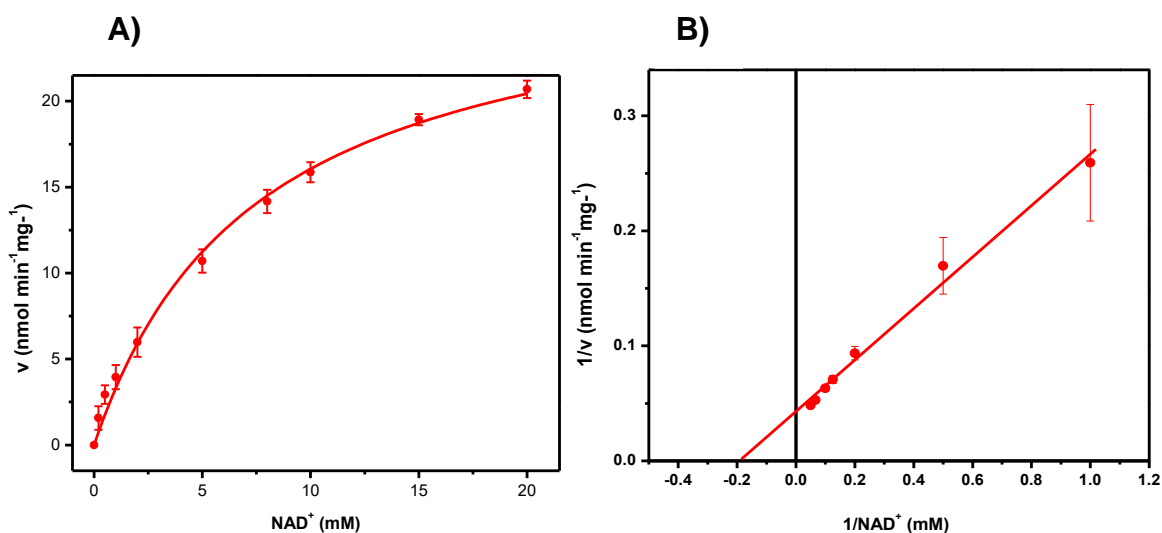
(A) E487K en un gel desnaturante de SDS-PAGE. En el primer carril el marcador de peso molecular; segundo y tercer carril enzima purificada y concentrada. (B) Densitograma. El pico más alto corresponde a la enzima. (C) Análisis gráfico del porcentaje de pureza.

7.5 Determinación de los parámetros cinéticos

7.5.1 Determinación de K_m y V_{max}

Una vez que la enzima fue purificada, se obtuvo el perfil cinético con cada uno de sus sustratos (propionaldehído y NAD^+ , a pH 7.4). Para el primer perfil que se muestra se varió la concentración del NAD^+ (2-20mM) y se fijó la concentración del aldehído 1mM (Fig.9) mientras que para el caso del segundo perfil se varió la concentración de aldehído (1-80 μ M), manteniendo fija la concentración de NAD^+ 8mM (Fig.9). Ambas curvas, presentan un comportamiento hiperbólico ajustándose al modelo de Michaelis-Menten. Al realizar el regráfico de Lineweaver-Burk se puede observar que los puntos se ajustan a la ecuación de la recta; de este regráfico también se calcularon los valores de K_m y V_{max} para cada sustrato (Fig. 9).

H2E487K



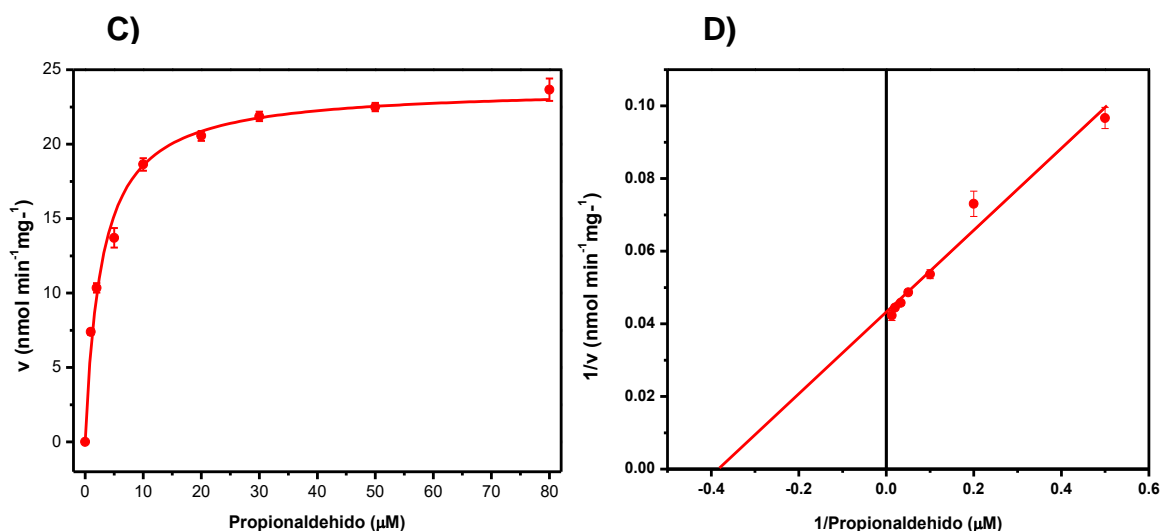


Figura 9. Perfil cinético de H2E487K al variar el NAD^+ y el aldehído, respectivamente, a pH 7.4. A, ajuste de los datos de la cinética al variar el NAD^+ a la ecuación de Michaelis-Menten. B, gráfica de Lineweaver-Burk de los datos de a. C, ajuste de los datos de la cinética al variar el propionaldehído a la ecuación de Michaelis-Menten. D, gráfica de Lineweaver-Burk de los datos de C.

7.5.1 $K_{0.5}$ por ALDA-1 y PPLG

Se determinó la concentración máxima de activación de H2E487K en presencia de ALDA-1 y PPLG (piperlongumina), para lo cual se evaluó la actividad de la enzima en condiciones saturantes de ambos sustratos (NAD^+ 8 mM y propionaldehído 1 mM) con diferentes concentraciones de los moduladores (0 - 50 μM). Como se puede observar en la figura 10, la actividad de H2E487K incrementa a concentraciones crecientes del modulador correspondiente y el máximo de activación se alcanza entre 20 y 50 μM . El valor obtenido de $K_{0.5}$ para ALDA-1 fue de 3.9 ± 0.6 y para PPLG 5.1 ± 0.5 . De acuerdo con los resultados obtenidos se estableció la concentración de 20 μM en ambos moduladores para los experimentos posteriores.

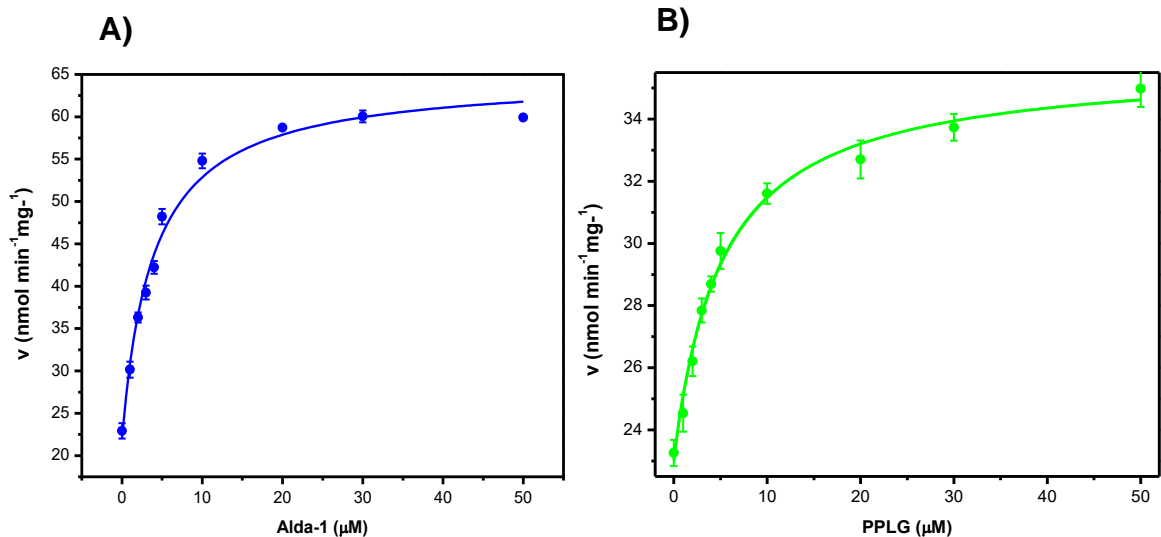


Figura 10. $K_{0.5}$ por ALDA-1 y PPLG

7.5.3 Determinación de K_m y V_{max} en presencia de ALDA-1 y PPLG

Una vez determinada la concentración para obtener la activación máxima de los moduladores, se evaluaron los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de H2E487K y de la enzima silvestre (Fig. 11A, B y C). El valor de K_m por NAD^+ fue de 7.5 ± 0.9 mM, mientras que para la enzima silvestre se obtuvo un valor de 65.5 ± 5.0 μM. Con respecto al valor de K_m por el aldehído fue de 2.8 ± 0.5 μM para la mutante y de 0.66 ± 0.10 μM en la silvestre. La velocidad de la H2E487K disminuyó aproximadamente 25 veces al compararse con la enzima silvestre (tabla 3). Estos resultados, indican que hay una modificación en la conformación del sitio activo, lo cual reduce 75% la eficiencia catalítica de la enzima mutada, comparada con el control usando propionaldehído como sustrato. En presencia de Alda-1 o PPLG la eficiencia catalítica por propionaldehído no se restablece; sin embargo, los aldehídos producto de la lipoperoxidación son los fisiológicos, por lo cual este análisis se realizó usando 4-HNE y acroleína, como se muestra en la siguiente sección.

A)

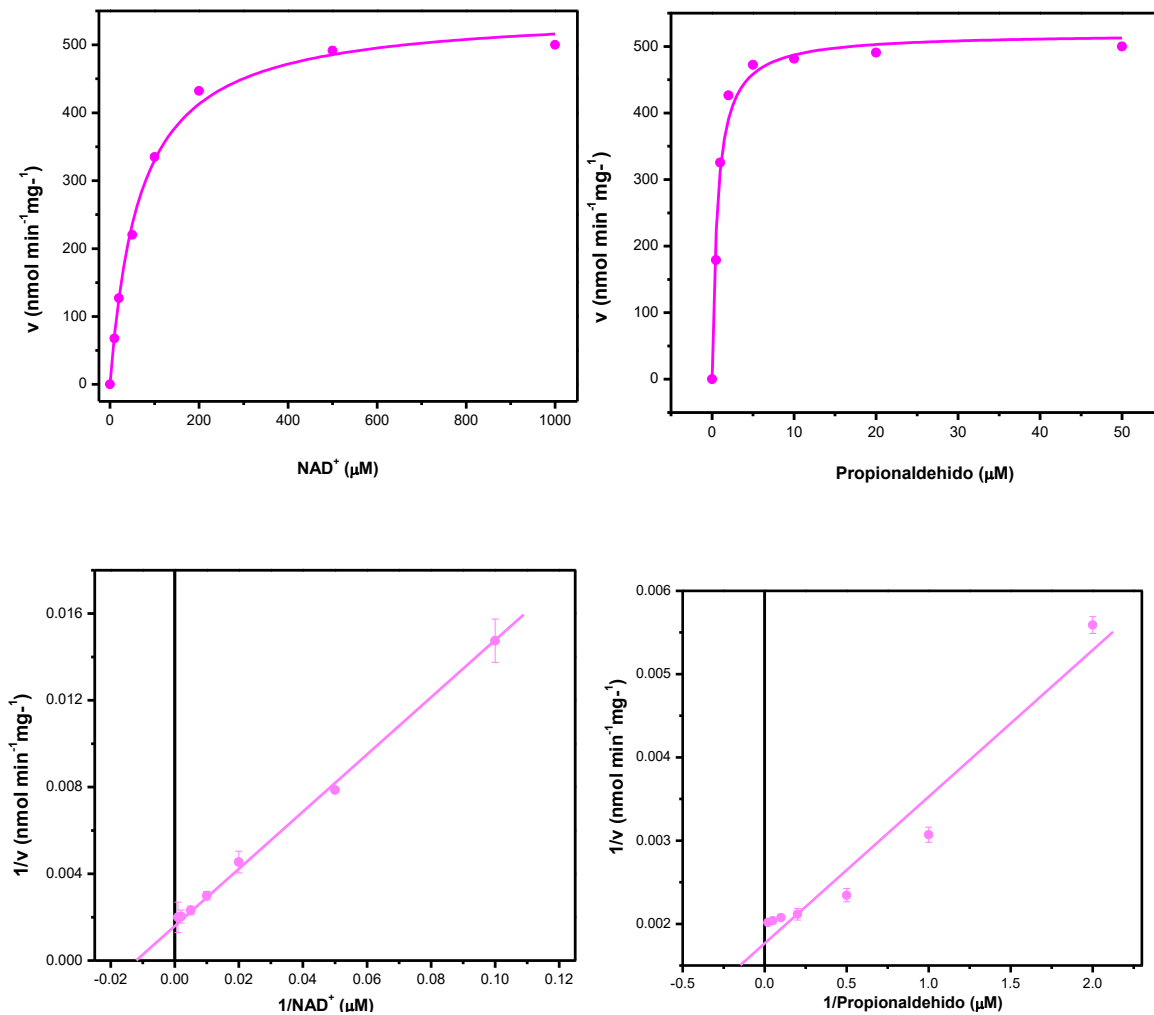


Figura 11. A) Perfil cinético al variar NAD⁺ y el aldehído en ALDH2 a pH 7.4

B)

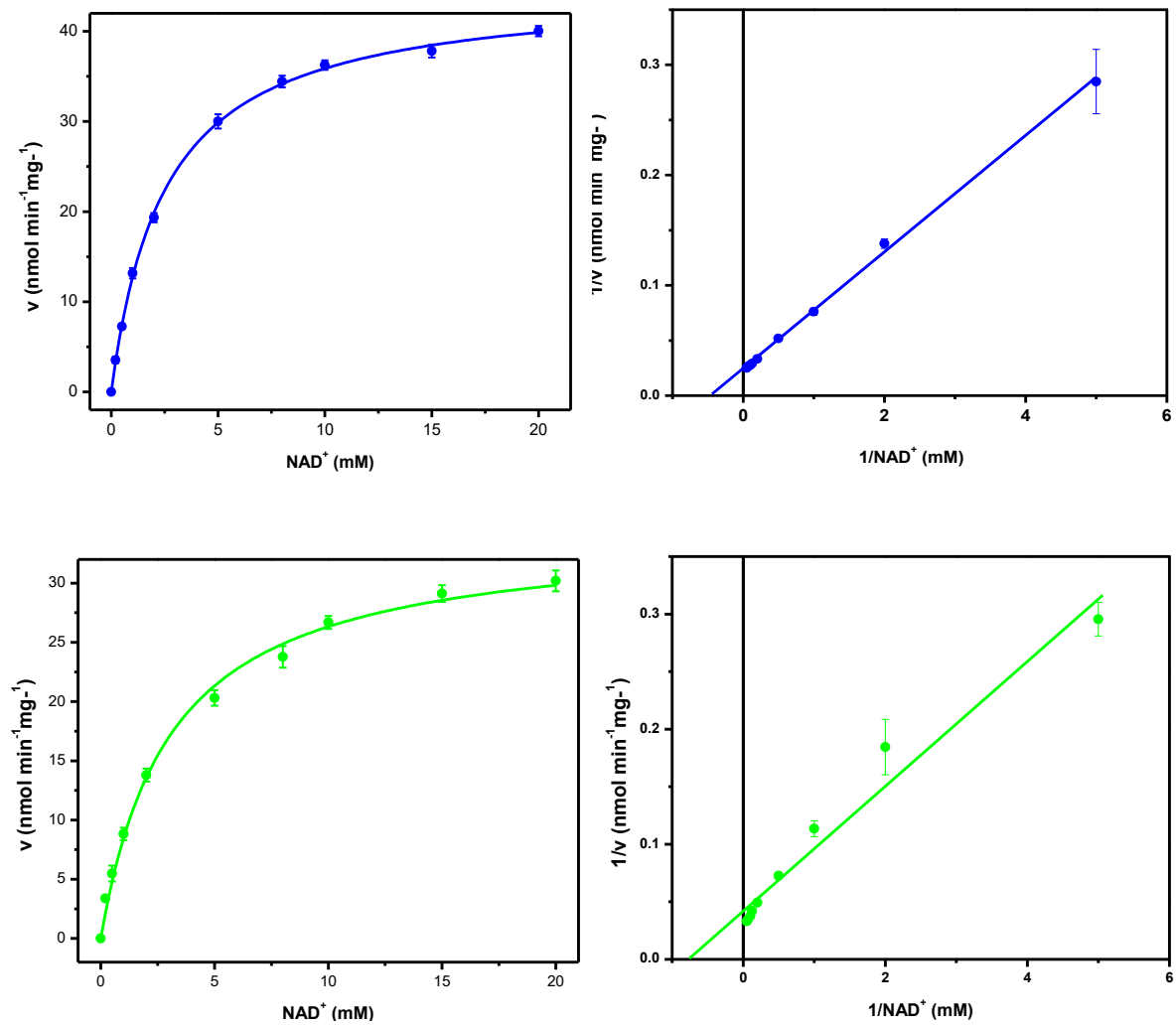


Figura 11. B) Perfil cinético de H2E487K al variar NAD^+ a pH 7.4 en presencia de ALDA-1 (●) 20 μ M y PPLG (●) 20 μ M.

C)

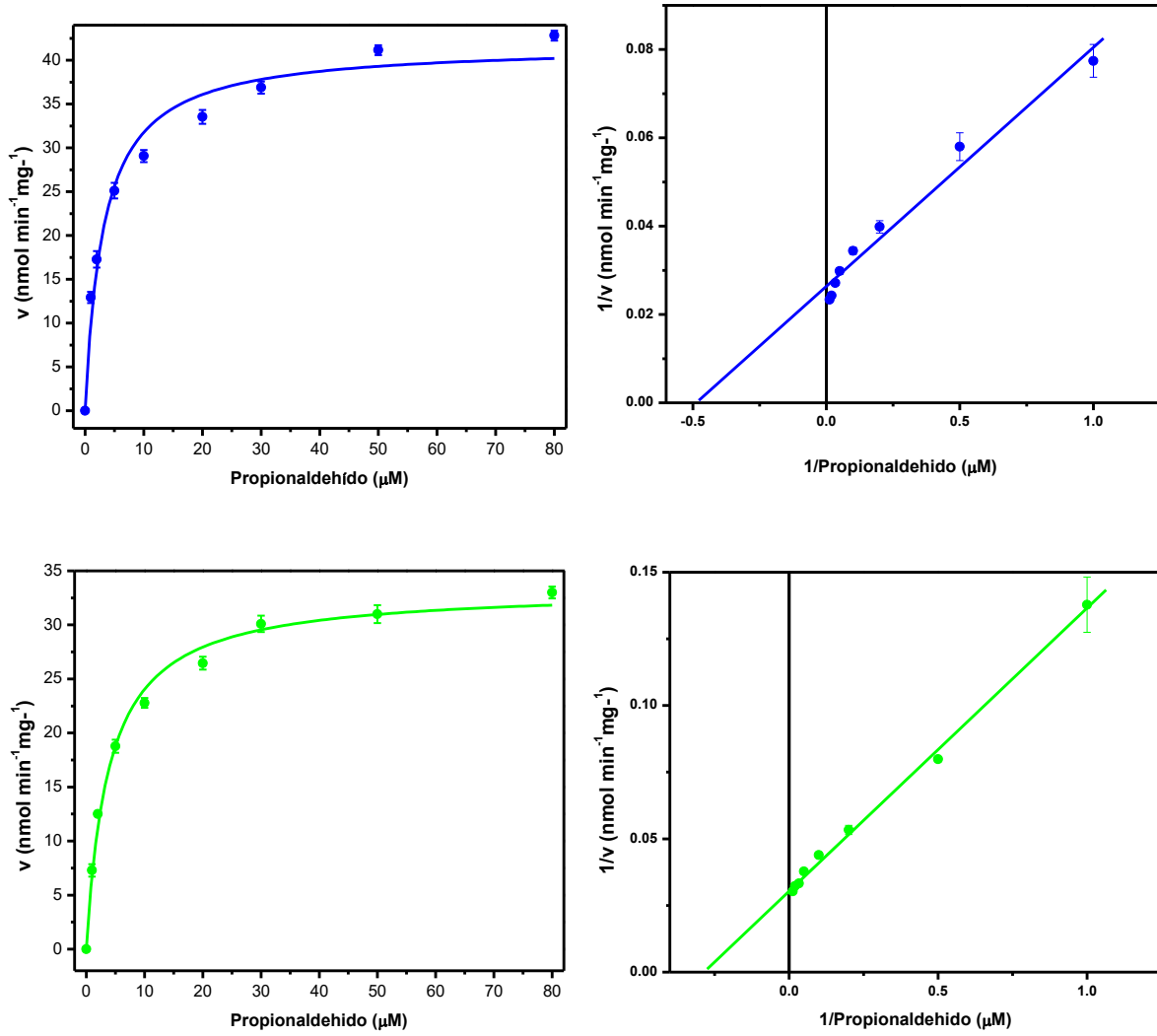


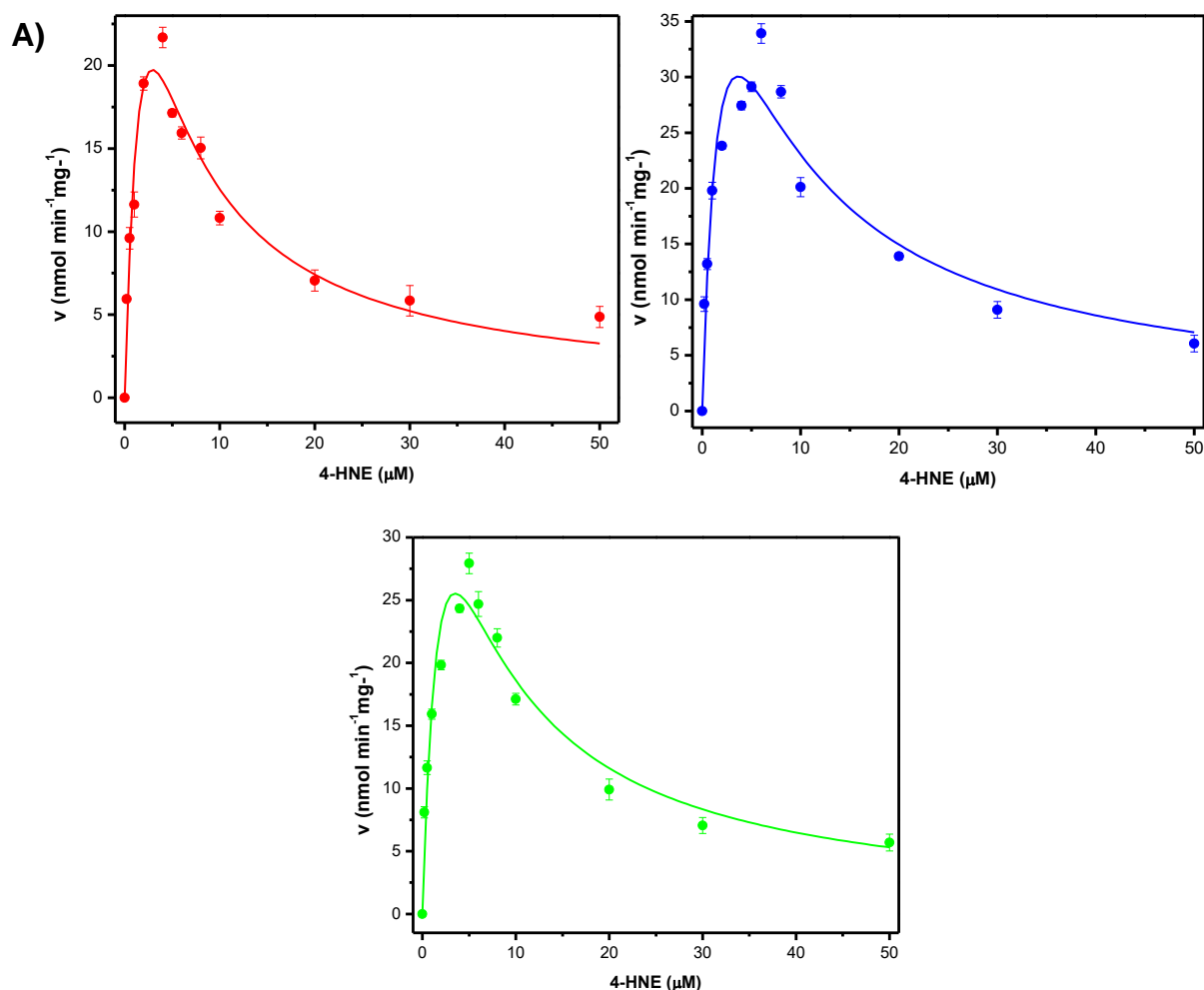
Figura 11 C. Perfil cinético de H2E487K al variar el aldehído a pH 7.4 en presencia de ALDA-1 (●) 20 μM y PPLG (●) 20 μM.

	<i>K_m</i>		<i>V_m (nmol min⁻¹mg⁻¹)</i>		<i>V_m/K_m</i>	
	NAD ⁺	Propionaldehído	NAD ⁺	Propionaldehído	NAD ⁺	Propionaldehído
Silvestre	65.5 ± 5.0 μM	0.66 ± 0.10 μM	549 ± 11	519 ± 15	8.3 ± 0.1	786.4 ± 3
H2E487K	7.5 ± 0.9 mM	2.8 ± 0.5 μM	25.9 ± 2.4	25.9 ± 2.4	3.5 ± 0.1	9.3 ± 0.4
H2E487K + ALDA-1	2.5 ± 0.2 mM	3.5 ± 0.6 μM	43.4 ± 1.7	43.4 ± 1.7	17.4 ± 0.4	12.4 ± 1.1
H2E487K+ PPLG	3.0 ± 0.2 mM	3.9 ± 0.4 μM	33.9 ± 0.9	33.9 ± 0.9	11.3 ± 0.5	8.7 ± 0.1

Tabla 3. Parámetros cinéticos calculados para ALDH2 y H2E487K en ausencia y presencia de los activadores.

7.6 Aldehídos tóxicos

Posteriormente, se determinaron los parámetros cinéticos por 4-HNE y acroleína de los aldehídos producidos durante la peroxidación lipídica y se evaluó la susceptibilidad de la enzima a estos aldehídos tóxicos. Los resultados revelaron que tanto ALDA-1 como PPLG incrementan ligeramente la V_{max} de la enzima cuando se utiliza 4-HNE como sustrato (Fig. 12A), y también se incrementa ligeramente el valor de la K_i . Sin embargo, con acroleína los cambios observados en el valor de K_m y V_{max} ; sin embargo, no fueron detectados, la K_i se incrementa casi al doble en presencia de PPLG con respecto al control y no se detectó actividad en presencia de ALDA-1 (Figura 12). Lo anterior indica que la presencia de alda-1 incrementa la reactividad de la cisteína catalítica promoviendo una inactivación más fuerte de la enzima por acroleína. Un resumen de los datos obtenidos se muestra en la tabla 4.



B)

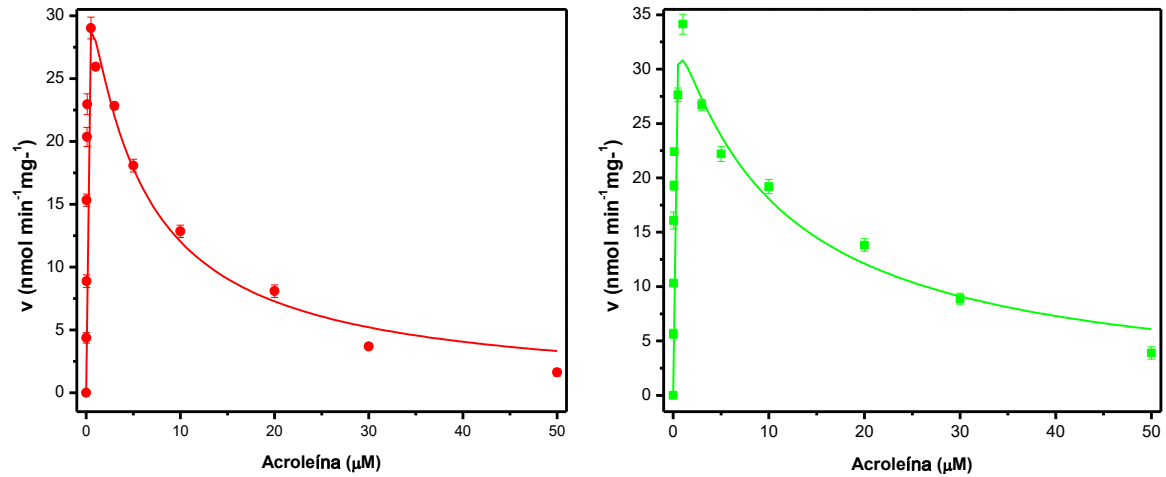


Figura 12. A) Perfil cinético de la enzima H2E487K en ausencia de activador (●), con Alda-1 (●) 20 μM y con PPLG (●) 20 μM en presencia de 4-HNE a pH 7.4. B) Perfil cinético de la enzima H2E487K en ausencia de activador (●), con Alda-1(●) 20 μM y con PPLG (●) 20 μM en presencia de acroleína a pH 7.4.

	<i>K_i</i> (μ M)		<i>K_m</i> (μ M)		<i>V_m</i> ($\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)		<i>V_m/K_m</i>	
	4-HNE	Acroleína	4-HNE	Acroleína	4-HNE	Acroleína	4-HNE	Acroleína
H2E487K	3.0 \pm 1.7	5.2 \pm 0.8	2.8 \pm 1.6	0.6 \pm 0.01	58.3 \pm 24.4	33 \pm 1.7	20.8 \pm 1.1	583 \pm 9
H2E487K+ Alda-1	5.9 \pm 1.1	ND	2.2 \pm 1.2	ND	67.0 \pm 21.1	ND	31.0 \pm 1.5	ND
H2E487K+ PPLG	4.3 \pm 1.5	10.2 \pm 1.6	2.8 \pm 1.5	0.7 \pm 0.01	66.7 \pm 24.8	36.0 \pm 1.8	24 \pm 1	511 \pm 11

Tabla 4. Parámetros cinéticos calculados para H2E487K usando 4-HNE y acroleína como sustratos en presencia de ALDA-1 y PPLG.

7.7 Inactivación de H2E487K en presencia de ALDA-1 y PPLG

Con el fin de realizar un análisis más riguroso de la susceptibilidad de la enzima a la inactivación por 4-HNE y acroleína, se realizó un perfil de inactivación, incubando a la enzima con el modulador a 2 μ M y 5 μ M del aldehído correspondiente (4-HNE o acroleína), en ausencia de NAD⁺, a diferentes tiempos y midiendo la actividad remanente con propionaldehído y NAD⁺ saturantes al término de cada tiempo de incubación. Los resultados muestran que tanto ALDA-1 como PPLG protegen de la inactivación por 4-HNE y acroleína. En el minuto 15 se puede observar cómo se preserva el 65 y 45% de la actividad en presencia de ALDA-1 y PPLG respectivamente, cuando la enzima es expuesta a 4-HNE. Resultados similares se observaron cuando la enzima fue expuesta a acroleína (Fig. 13).

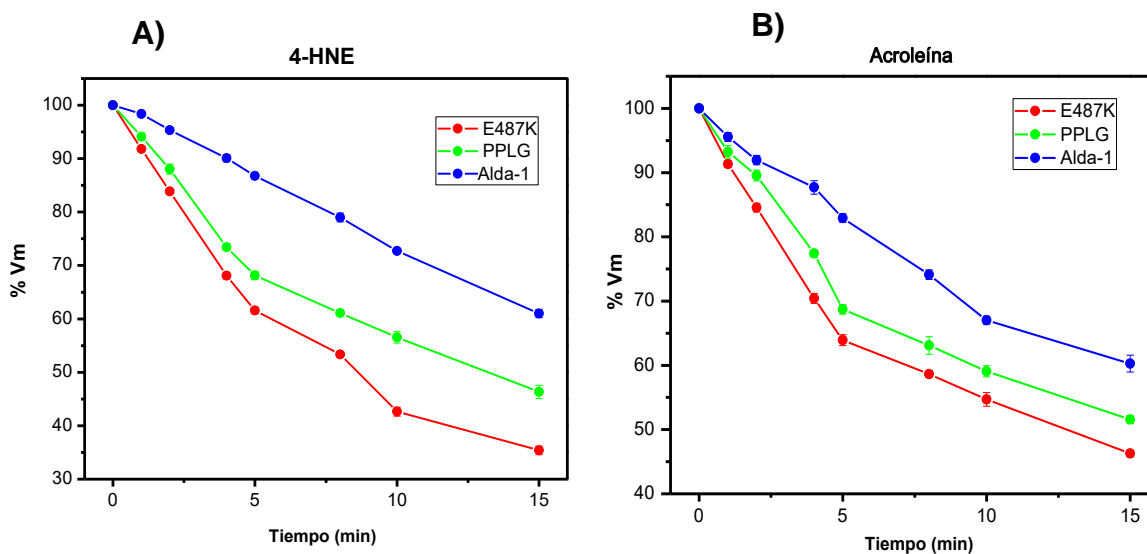
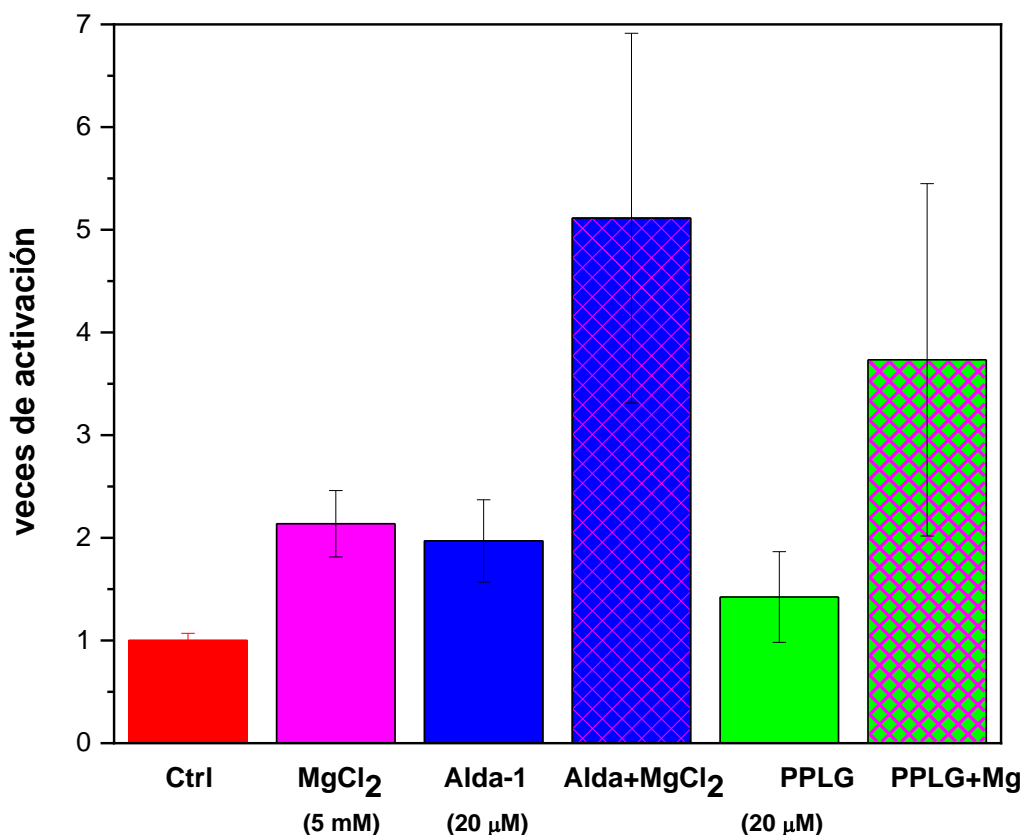


Figura 13. Perfil de inactivación de H2E487K en presencia de 4-HNE (A) y Acroleína (B).

7.8 Determinación del paso limitante sobre el mecanismo cinético

Se evaluó el paso limitante de la reacción de la enzima, para evaluar si los activadores afectaban este paso. Para ello la actividad enzimática se ensayó en un intervalo de 0- 5 mM de Mg^{2+} en presencia y ausencia de los moduladores (20 μ M). Como se observa en la figura 14A y B, la velocidad se incrementa conforme aumenta la concentración de Mg^{2+} hasta alcanzar un incremento de casi 5 veces en presencia de ALDA-1 y 3.5 veces con PPLG (figura 14A). Estos resultados indican que el paso limitante sigue siendo la desacilación en presencia de los dos activadores. También a partir de estos perfiles se determinó la $K_{0.5}$ por Mg^{2+} en cada condición como se puede observar en los gráficos (figura 14B).

A)



B)

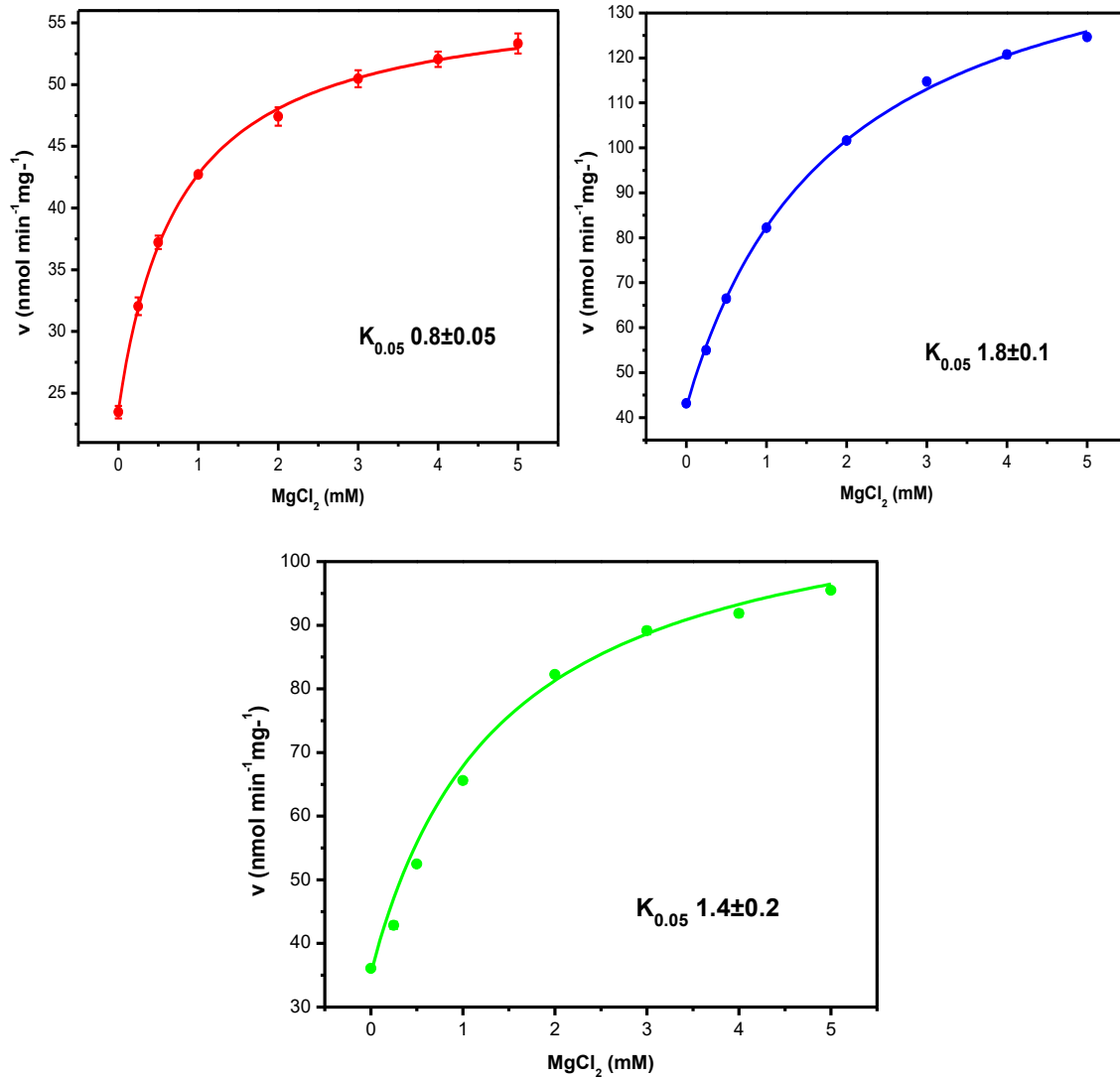


Figura 14. (A) Efecto del Mg^{2+} sobre la actividad de H2E487K (●), en presencia de Alda-1(●) y PPLG (●). (B) Perfil cinético variando la concentración de Mg^{2+} .

7.9 Efecto de la Temperatura

Por último, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la estabilidad estructural de la enzima. Se incubó la enzima a diferentes temperaturas (25, 35 y 45°C) en presencia de ALDA-1 y PPLG (20 μ M) y se determinó el porcentaje de actividad remanente con respecto al tiempo. Como se muestra en la Figura 15, ambos moduladores protegen de la desnaturalización por temperatura a H2E487K. Con la finalidad de reforzar el análisis de este ensayo, se determinó la constante de inactivación y la energía de activación a partir de un gráfico de Arrhenius, en el cual se puede observar que tanto la constante y energía de activación disminuyen en presencia de ALDA-1 y PPLG (Figura 16 y tabla 5).

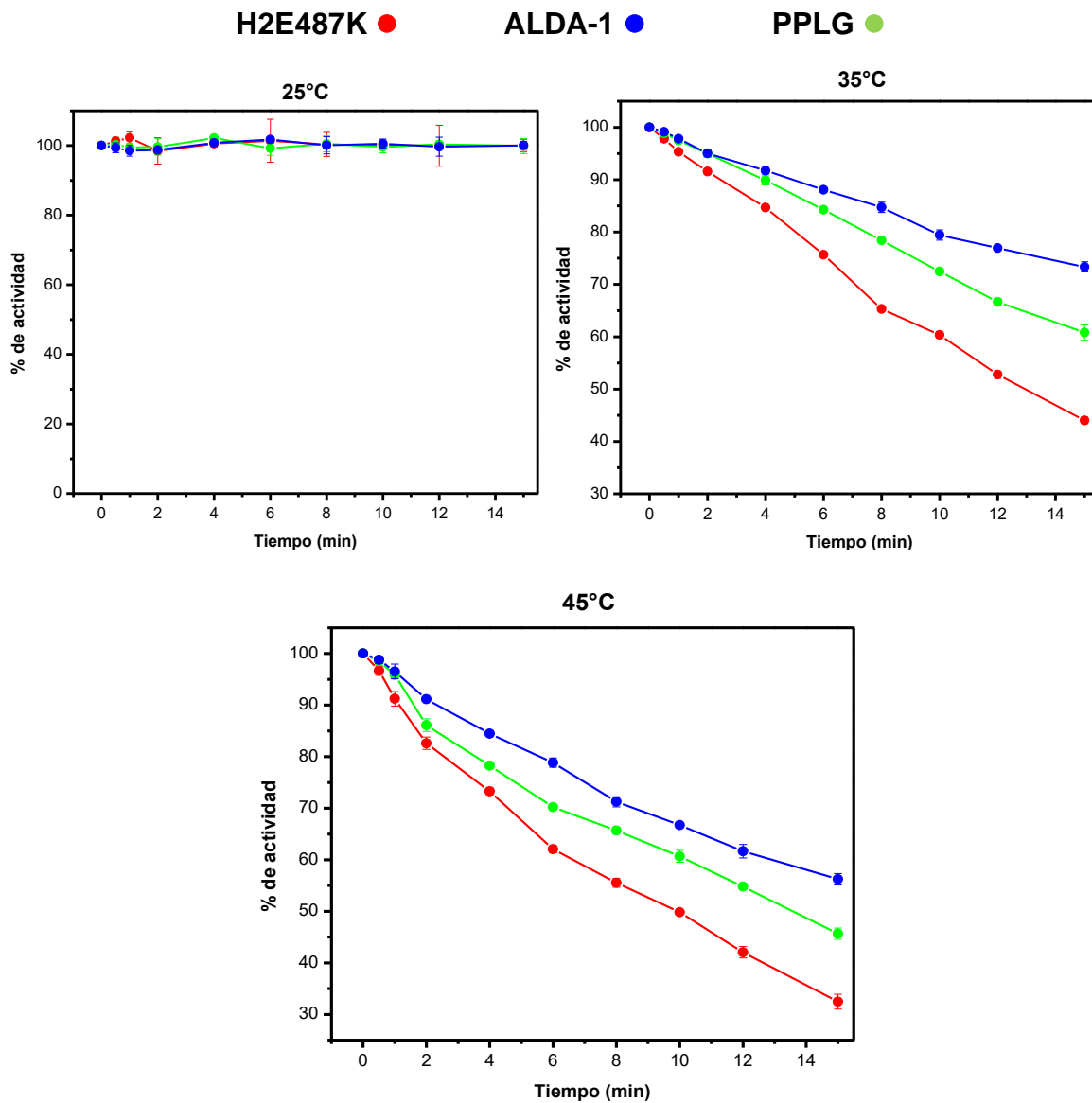
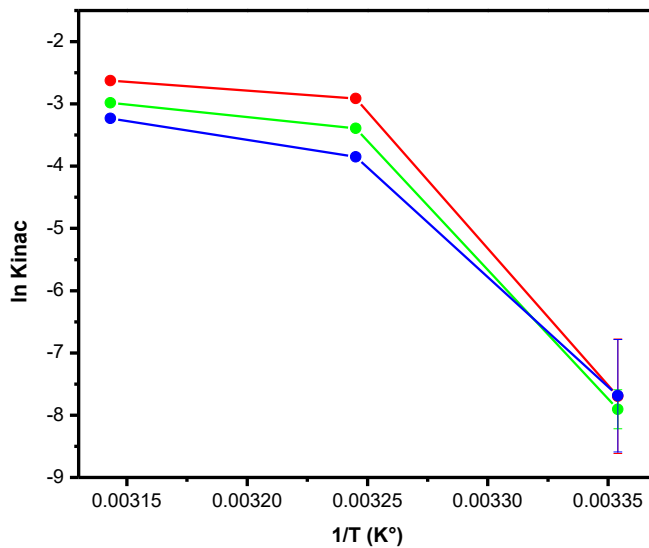


Figura 15. Efecto de la temperatura en la estabilidad de H2E487K en presencia de sus moduladores.

Tabla 5. Constantes de inactivación por temperatura para H2E487K en presencia de ALDA-1 y PPLG.

<i>K</i> _{inactivación} (<i>min</i> ⁻¹)			
	25°C	35°C	45°C
H2E487K	7.9±0.3	3.9±0.03	3.2±0.4
Alda-1	7.7±0.9	2.9±0.02	2.6±0.03
PPLG	7.7±0.9	3.4±0.03	2.9±0.02



E _a (cal/mol)	
H2E487K	48033.7
ALDA-1	42133.5
PPLG	46640.6

Figura 16. Gráfico de Arrhenius en presencia de los moduladores; a partir de las constantes de inactivación para cada temperatura se calculó la energía de activación para cada una de las condiciones.

8. Análisis y discusión de resultados.

Existen diversos estudios que involucran la participación de la ALDH2 en modelos de mitigación del estrés oxidativo. Se ha determinado que la actividad de esta enzima correlaciona con un decremento en el daño al miocardio, en un modelo de isquemia-reperfusión en ratas. Cuando ALDA-1 se administra de manera previa a la isquemia, el tamaño del infarto disminuye cerca de un 60% (Chen *et al.*, 2008). Sin embargo, a la fecha no se han reportado estudios clínicos con este compuesto; por lo cual, la búsqueda y diseño de activadores de esta enzima sigue revistiendo gran interés.

En el presente trabajo, se realizó la caracterización de la piperlonguminina (PPLG) como un activador de la H2E487K (variante asiática, con el fin de determinar si la presencia de este compuesto podría restablecer la actividad enzimática de esta mutante o mejorar su eficiencia catalítica por diversos aldehídos. Como se mencionó anteriormente). La piperlonguminina, es un compuesto de origen natural que posee una estructura similar al ALDA-1; por lo cual su análisis resultó altamente atractivo para el grupo de trabajo.

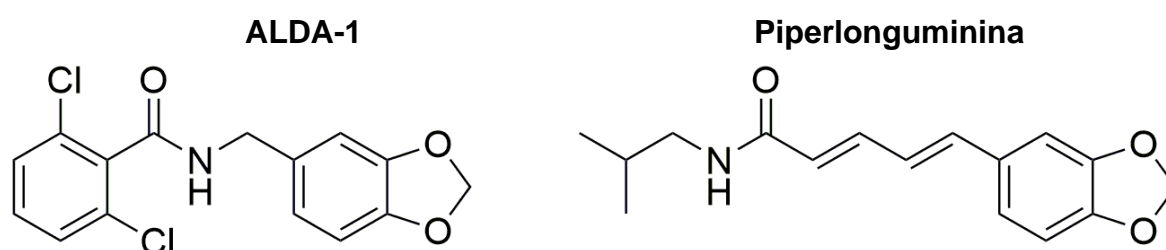


Figura 17. Estructuras de ALDA-1 y PPLG

Como se puede observar en los resultados, la PPLG es un activador no esencial de H2E487K. En cuanto a los parámetros cinéticos, se determinó que dicho compuesto incrementa la afinidad por el NAD⁺ de forma similar al ALDA-1 y disminuye la afinidad por el propionaldehído, lo cual se ve reflejado en el incremento del valor de $K_{m_{prop}}$. Este efecto se puede explicar por la forma en la que se une el activador a la enzima; pues se ha propuesto que ALDA-1 se une a la entrada del sitio de unión al

aldehído, bloqueando el acceso de este sustrato a su sitio de unión; por lo cual, tanto el NAD⁺ como el propionaldehído entran por el sitio de unión al NAD⁺ para acceder al sitio catalítico (Belmont-Díaz et al. 2016). Lo anterior explica el incremento de la *K_m* por el aldehído. Por otro lado, se determinó que ALDA-1, restablece la estructura del sitio de unión del NAD⁺ en H2E487K lo que puede explicar la disminución del valor de *K_m* por NAD⁺ (Pérez et al., 2010). Dado que los resultados obtenidos en presencia de PPLG fueron similares a lo ya reportado para el ALDA-1, podemos sugerir que el mecanismo de activación de ALDH2 por PPLG es similar al obtenido en presencia de ALDA-1.

Previamente, se mencionó la importancia de estas enzimas en el metabolismo de aldehídos tóxicos generados durante la lipoperoxidación, tal como el 4-HNE y la acroleína. Es por ello, que se evaluó la capacidad catalítica de H2E487K en presencia de los moduladores (ALDA-1 o PPLG); como se puede observar en la tabla 4 la presencia de los moduladores incrementa ligeramente el valor de *K_i* por ambos aldehídos, lo cual indica que se requiere una mayor concentración de 4-HNE para inhibir a la enzima. Por otro lado, si bien los cambios en los valores de *K_m* por 4-HNE fueron sutiles, si hubo un incremento en la eficiencia catalítica en presencia de los moduladores, esto podría favorecer la velocidad de oxidación de estos aldehídos a los ácidos carboxílicos los cuales son compuestos menos tóxicos y fáciles de eliminar. Con respecto a la acroleína, en presencia de PPLG, no hubo cambios al compararse con la enzima en ausencia de moduladores y en presencia de ALDA-1, no se detectó actividad. Esto se puede deber a que la acroleína es un aldehído de 3 carbonos, es decir, al ser un aldehído pequeño tiene un fácil acceso al sitio catalítico, sin importar si PPLG o ALDA-1 se encuentran presentes. El hecho de que en la combinación ALDA-1 + acroleína no se haya detectado actividad, puede ser debido a que en presencia del ALDA-1, la cisteína catalítica se encuentre más expuesta, lo cual puede favorecer la formación de un aducto de la acroleína con el residuo catalítico, inactivando de esta forma a la enzima.

Como parte del análisis de la susceptibilidad de la enzima a aldehídos lipídicos, se realizó un perfil de inactivación con respecto al tiempo (Fig. 13). A este respecto, se

puede observar que H2E487K se protege ligeramente en presencia de los moduladores, lo cual mitiga el efecto de inhibición y favorece la catálisis contrarrestando el efecto tóxico durante este periodo de tiempo. Estos datos indican que PPLG también está actuando como una chaperona molecular.

Ahora bien, una condición que se requiere para la activación enzimática es un incremento en la velocidad del paso limitante, para ello se evaluó el efecto del Mg^{2+} sobre la actividad de H2E487K, pues ya se ha reportado que este catión incrementa la velocidad de la desacilación para ALDH2. En presencia de Mg^{2+} , se ha reportado que también se incrementa la velocidad, lo cual indica que la desacilación sigue siendo el paso determinante en el mecanismo cinético de reacción (Ho *et al.*, 2005). En el caso de H2E487K también se determinó el efecto del Mg^{2+} obteniendo como resultado que tanto en presencia de ALDA-1, como de PPLG, se incrementa la actividad de la enzima (Fig. 14). De acuerdo con estos resultados la desacilación sigue siendo el paso limitante de la velocidad, aunque en presencia de los moduladores es menos limitante y podemos sugerir que tanto ALDA-1 como PPLG favorecen una conformación del NADH generado en el sitio catalítico que promueve la rápida liberación del acilo al medio. Otra explicación al incremento en la actividad es que el sitio catalítico se vuelve ligeramente más hidrofóbico y al mismo tiempo al verse disminuido en tamaño el pocket catalítico en presencia de los moduladores, esto favorece un mayor número de choques productivos entre los sustratos.

Finalmente, se determinó la estabilidad de H2E487K a diferentes temperaturas, en presencia y ausencia de ALDA-1 y PPLG. Los resultados obtenidos indicaron que tanto que ALDA-1, como PPLG protegen el sitio activo pues la actividad a 35°C se ve preservada un 80% y un 65%, respectivamente y a 45°C un 55 y 45%, respectivamente; mientras que en ausencia de los moduladores se pierde del 60% al 70% de la actividad a las mismas temperaturas. La constante de inactivación obtenida en presencia de los moduladores al realizar un análisis del gráfico de Arrhenius, fue menor al compararse con su control, esto nos indica que la interacción modulador-enzima le brinda estabilidad estructural al sitio activo, funcionando ambos moduladores como chaperonas moleculares.

9. Resumen de resultados

PPLG restablece parcialmente la actividad de H2E487K mimetizando el comportamiento de ALDA-1.

La mutación de H2E487K no afecta el paso limitante del mecanismo de reacción (liberación del acilo).

PPLG preserva parcialmente la actividad de H2E487K al ser sometida a diferentes temperaturas.

PPLG protege parcialmente a H2E87K de la inactivación por aldehídos lipídicos como acroleína y 4-HNE.

10 Conclusión

La PPLG es un activador no esencial de tipo mixto de la ALDH2 y H2E487K y protege a estas enzimas de la inactivación por aldehídos lipídicos.

11. Referencias

Belmont, J. A.; Yoval, B.; Calleja, L. F.; Pardo, J. P.; Rodríguez, J. S. (2016). Alda-1 modulates the kinetic properties of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2). *FEBS J.* 283(19): 3637-3650.

Benedetti, A., Comporti, M., Esterbauer, H., (1980). Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim. Biophys.* 620:281–296.

Blackwell, L. F.; Motion, R. L.; MacGibbon, A. K. H.; Hardman, M. J.; Buckley, P.D. (1987). Evidence that the slow conformation change controlling NADH release from the enzyme is rate-limiting during the oxidation of propionaldehyde by aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* 242(3):803-808.

Boesch, J. S., Lee, C., Lindahl, R. G.: (1996). Constitutive expression of class 3 aldehyde dehydrogenase in cultured rat corneal epithelium. *J. Biol. Chem.* 271:5150–5157.

Boesch, J. S.; Lee, C.; Lindahl, R.G. (1996). Constitutive expression of class 3 aldehyde dehydrogenase in cultured rat corneal epithelium. *J. Biol. Chem.* 271(9):5150-5157.

Budas, G. R.; Disatnik, M.H.; Mochly, R. D. (2009) Aldehyde Dehydrogenase 2 In Cardiac Protection: A New Therapeutic Target?. *Trends Cardiovasc. Med.* 19(5):158-64.

Burcham, P.C. and Fontaine, F. (2001). Extensive protein carbonylation precedes acrolein-mediated cell death in mouse hepatocytes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15:309-316.

Chen, C. H.; Budas, G.R.; Churchill, E.N.; Disatnick, M. H.; Hurley, T. D.; Mochly-Rosen, D. (2008). Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science.* 321(5895):1493-1495.

- Chen, C.H.; Ferreira, J.C.; Gross, E.R.; Mochly-Rosen, D. (2014). Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol. Rev.* 94(1):1-34.
- Chen, Z. and Stamler, J.S. (2006). Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Trends cardiovasc. Med.* 16(8):259-265.
- Cheng, J. Z.; Shinghal, S.S.; Sharma, A.; Saini, M.; Yang, Y.; Awasthi, S.; Zimniak, P.; Awasthi, Y.C. (2001). Transfection of mGSTA4 in HL-60 cells protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by inhibiting JNK-mediated signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* 392(2):197-207.
- Crabb, D.W.; Matsumoto, M.; Chang, D.; You, M. (2004). Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc. Nutr. Soc.* 63(1):49-63.
- Dickinson, F.M. and Hart, G.F. (1982). Effect of Mg²⁺, Ca²⁺ and Mn²⁺ on sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* 205(2):443-448.
- Duester, G. (2000). Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. of biochem./FEBS J.* 267(14):4315-4324.
- Eaton, P.; Li, J.M.; Hearse, D. J.; Schattock, M.J. (1999). Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart. *The Am. J. Physiol.* 276(3Pt2):H935-H943.
- Esterbauer, H. (1993). Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am. J. Clin. Nutr.* 57:779S-786S.
- Esterbauer, H.; Schaur, R.; Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malodialdehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol Med.* 11:81-128.
- Esterbauer, H.; Zollner, H.; Schaur, R. J. (1988). Hydroxyalkenals: Cytotoxic products of lipid peroxidation. *ISI atlas Sci. Biochem.* 1:311-317.

Farrés, J., Wang, X., Takahashi, K. et al (1994). "Effects of Changing Glutamate 487 to Lysine in Rat and Human Liver Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase" J. Biol. Chem. 269(19): 1384-13860.

Feldman, R. I. and Weiner, H. (1971). Horse liver aldehyde dehydrogenase. II. Kinetics and mechanistic implications of dehydrogenase and esterase activity. J. Biol. Chem.. 247:267-272.

Florence, T.M. (1995). The role of free radicals in disease. Clin. Exp. Ophthalmol.. 23(1):3-7.

Galter, D.; Buervenich, S.; Carmine, A.; Anvret, M.; Olson, L. (2003) ALDH1 mRNA: presence in human dopamine neurons and decrease in substantia nigra in Parkinson's disease and in the ventral tegmental area in Schizophrenia. Neurobiol. Dis. 14(3):637-647.

Gillén. M. D. and Uriarte, P. S. (2012). Aldehydes contained in edible oils of a very different nature after prolonged heating at frying temperature: Presence of toxic oxygenated α,β unsaturated aldehydes. Food Chem.. 131:915-926.

Guillén, M.D. and Goicoechea, E. (2008). Formation of oxygenated α,β -unsaturated aldehydes and other toxic compounds in sunflower oil oxidation at room temperature in closed receptacles. Food Chem.. 111:157-164

Guillén, M.D. and Goicoechea, E. (2008). Toxic oxygenated α,β -unsaturated aldehydes and their study in foods: A review. Crit. Rev. Food Sci. 48:119-136.

Hempel, J.; Nicholas, H.; Lindahl, R. (1993). Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework. Protein Sci. 2(11):1890-900.

Herrera, E. (1991). Bioquímica aspectos estructurales y vías metabólicas. (1ra edición, pp. 89-138). España: Interamericana McGraw-Hill

Ho, K.K.; Allali-Hassani, A.; Hurley, T.D.; Weiner, H. (2005). Differential effects of Mg²⁺ ions on the individual kinetic steps of human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. Biochemistry 44(22):8022-9.

Ho, KK, Allali, A, Hurley TD and Weiner H (2005) Differential effects of Mg²⁺ ions on the individual kinetic steps of human aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* 44, 8022-8029.

Hsu, L.C.; Chang, W.C.; Yoshida, A. (1992). Cloning of a cDNA encoding human ALDH7, a new member of the aldehyde dehydrogenase family. *Gene* 151(1-2):285-289.

Jester, J.V.; Moller-Pedersen, T.; Huang, J.; Sax, C.M.; Kays, W.T.; Cavangh, H.D.; Petroll, W.M.; Piatigorsky, J. (1999). The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins. *J. Cell Sci.* 112 (5): 613-22.

Jiang, F.; Qiu, Q.; Khanna, A.; Todd, N. W.; Deepak, J.; Xing, L.; Wnag, H.; Liu, Z.; Su, Y.; Stass, S. A.; Katz, R. L. (2009) Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol. Cancer Res.* 7:330-338

Kim, K.; Kim, J.; Eom, S.; Lee, S.; Min, K.; Kim, Y. (2006). Inhibitory effect of piperlonguminine on melanin production in melanoma B16 cell line by downregulation of tyrosinase expresión. *Pigment Cell Res*19:90–98.

Klyosov, A. A. (1996). Kinetics and specificity of human liver aldehyde dehydrogenases toward aliphatic, aromatic, and fused polycyclic aldehydes. *Biochemistry* 35(14):4457-67.

Larson, H.N.; Zhou, J.; Chen, Z.; Stamler, J.S.; Weiner, H.; Hurley, T. D. (2007) Structural and functional consequences of coenzyme binding to the inactive Asian variant of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. Roles of residues 475 and 487. *J. Biol. Chem.* 282(17):12940-12950.

Lassen, N., Bateman, B., Estey, T., Kuszak, J. R., Nees, D. W., Piatigorsky, J., Duester, G., Day, B. J., Huang, J., Hines, L. M., Vasiliou, V. (2007). Multiple and additive functions of ALDH3A1 and ALDH1A1: cataract phenotype and ocular oxidative damage in *Aldh3a1(-/-)/Aldh1a1(-/-)* knock-out mice. *J. Biol. Chem.* 282(31): 25668-25676

Lehninger, A.L. (2007) *Principios de Bioquímica*. (5ta edición, pp. 188-241). Barcelona: Ediciones Omega.

Liu, Z.J.; Sun, Y.J.; Rose, J.; Chung, Y.J.; Hsiao, C.D.; Chang, W.R.; Kuo, I.; Perozich, J.; Lindahl, R.; Hempel, J.; Wang, B.C. (1997). The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nat. Struct. Biol.* 4(4):317-26.

Lovell, M. A.; Xie, C.; Markesbery, W. R. (2001) Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. *Neurobiol. Aging* 22:187-194.

Luczaj, W. and Skrzydlewska, E. (2003). DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8(2):391-413.

Mann, C.J. and Weiner, H. (1999). Differences in the roles of conserved glutamic acid residues in the active site of human class 3 and class 2 aldehyde dehydrogenases. *Protein Sci.* (10):1922-9.

Marchal, S. and Branlant, G. (1999). Evidence for the chemical activation of essential cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry* 38(39):12950-8.

Marchitti, S. A.; Chen, T.; Thompson, D. C.; Vasiliou, V. (2011). Ultraviolet radiation: cellular antioxidant response and role ocular aldehyde dehydrogenase enzymes. *Eye Contact Lens.* 37:206-213.

Marchitti, S. A.; Deitrich, R. A.; Vasiliou, V. (2007). Neurotoxicity and metabolism of the catecholamine-derived 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-dihydroxyphenylglycolaldehyde: the role of aldehyde dehydrogenase. *Pharmacol. Rev.* 59:125-150.

Marchitti, S.A.; Brocker, C.; Stagos, D.; Vasiliou, V. (2008). Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4(6): 697-720.

O'Brien, P. J.; Siraki, A.G.; Shangari, N. (2005) Aldehyde sources, metabolism molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit. Rev. Toxicol.* 35:609-662.

Papazafiropoulou, A.; Skliros, E.; Sotiropoulos, A.; Papagragos, C.; Gikas, A.; Apostolou, O.; Kaliora, H.; Tountas, C. (2011). Prevalence of target organ damage in hypertense subjects attending primary care: C.V.P.C. study (epidemiological cario-vascular study in primary care). *BMC Family Practice.* 1471(2296):12-75.

Pappa, A., Estey, T., Manzer, R., Brown, D., Vasiliou, V. (2003). Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea. *The Biochemical Journal.* 376(3): 615-623

Pappa, A.; Brown, D.; Koutalos, Y.; Gregori, J.; White, C.; Vasiliou, V. (2005) Human Aldehyde dehydrogenase 3A1 inhibits proliferation and promotes survival of human corneal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 280:27998-28006.

Pappa, A.; Chen, C., Koutalos, Y.; Townsend, A., Vasiliou, V. (2003). ALDH3A1 protects human corneal epithelial cells from ultraviolet- and 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 1178-1189.

Pappa, A.; Estey, T.; Manzer, R.; Brown, D.; Vasiliou, V. (2003). Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea. *Biochem J.* 376(3):615-23.

Patigorky, J. (1998) Multifunctional lens crystallins and corneal enzymes. More than meets the eye. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 842:7-15

Perez, S.; Younus, H.; Vanam, R.; Chen, C-H.; Mochly, D.; Hurley, T.D. (2010) Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 159-164.

Picklo M.J. and Montine T.J. (2001). Acrolein inhibits respiration in isolated brain mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1535(2):145-152.

Picklo, M. J. and Montine, T. J. (2007). Mitochondrial effects of lipid-derived neurotoxins. *J. Alzheimer's Dis.* 12 (2): 185-193.

Picklo, M.J.; Azenkeng, A.; Hoffmann, M.R. (2011). Trans-4-oxo-2-nonenal potentially alters mitochondrial function. *Free Radic. Biol. Med.* 50:400-407.

Rickert, W. S.; Robinson, J. C.; Young, J. C. (1980) Estimating the hazards of less hazardous cigarettes. I. Tar, nicotine, carbón monoxide, acrolein, hydrogen cyanide, and total aldehyde deliveries of Canadian cigarettes. *J. Toxicol. Environ. Health* 6:351-365.

Rodriguez-Zavala, J.S. and Weiner, H. (2002). Structural aspects of aldehyde dehydrogenase that influence dimer-tetramer formation. *Biochemistry* 41(26):8229-37.

Steinmetz, C. G.; Peiguang, X.; Weiner, H.; Hurley, T.D. (1997). Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* 5:701-711.

Takahashi, K. and Weiner, H. (1980). Magnesium stimulation of catalytic activity of horse liver aldehyde dehydrogenase. Changes in molecular weight and catalytic sites. *The J. Biol. Chem.* 255: 8206-8209.

Tanel, A. and Averill-Bates, D. A. (2007). Inhibition of acrolein-induced apoptosis by the antioxidant N-acetylcysteine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321:73-83.

Tume, L. F. (2014). Las células madre del cancer como centro de investigación de la inmunoterapia. *Venez. Oncol.* 26(3):199-216.

Vasiliou, V. and Nebert, DW. (2005). Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum. Genomics.* 2(2):138-43.

Vasiliou, V.; Bairoch, A.; Tipton, K.F.; Nebert, D.W. (1999). Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics.* 9(4):421-34.

Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C. (2009). *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular.* (2da edición, pp. 314-316). Buenos Aires: Médica Panamericana.

Wang, M.F.; Han, C.L.; Yin, S. J.; (2009). Substrate specificity of human and yeast aldehyde dehydrogenases. *Chem. Biol. Interact.*16;178 (1-3):36-9.

Wang, X. and 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):237-43.

Weiner, H.; Hu, J.H.; Sanny, C.G. (1976). Rate-limiting steps for the esterase and dehydrogenase reaction catalyzed by horse liver aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 251(13):3853-5.

Wonhwa, L.; Hayoung, Y.; Jeong, K.; Sangkyu, L.; Jun-Goo, J.; Min, You-Mie, L.; Jong, B. (2013). Barrier protective effects of piperlonguminine in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo, *Food and Chemical Toxicology*, 58:149-157.

Yokoyama, A.; Muramatsu, T.; Ohmori, T.; Yokoyama, T.; Okuyama, K.;TakahashiH.;Hasegawa,Y.; Higuchi, S.; Maruyama, K.; Shirakura, K.;Ishii, K. (1998). "Alcohol-related cancers and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholics". *Carcinogenesis* 19 (8): 1383-1387.

Yokoyama, A.; Muramatsu, T.; Ohomori, T.; Makuuchi, H.; Higuchi, S.; Matsushita, S.; Yoshino, K.; Maruyama, K.; Nakano, M.; Ishii, H. (1996) Multiple primary esophageal and concurrent upper aerodigestive tract cancer and the aldehyde dehydrogenase-2- genotype of Japanese alcoholics. *Cancer* 77:1986-1990.

Yoval S. B.; Calleja, L.F.; de la Luz, H. E. M.; Rodríguez, Z. J. S. (2020). Piperlonguminine a new mitochondrial aldehyde dehydrogenase activator protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1864 (11):129684.

Zhou, J. and Weiner, H. (2001). The N-terminal portion of mature aldehyde dehydrogenase affects protein folding and assembly