



# Aïllament i caracterització de l'enzim alcohol deshidrogenasa a "*Drosophila Hydei*": resposta metabòlica a la ingesta d'alcohols en aquesta espècie

Sílvia Atrian i Ventura

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



AÏLLAMENT I CARACTERITZACIÓ DE L'ENZIM ALCOHOL  
DESHIDROGENASA A DROSOPHILA HYDEI. RESPOSTA  
METABÒLICA A LA INGESTA D'ALCOHOLS EN AQUESTA  
ESPÈCIE.

Memòria presentada per optar  
al Grau de Doctor en Biologia  
per la Universitat de Barcelona  
per

SÍLVIA ATRIAN I VENTURA.

Vist i plau

El Director de la Tesi

*Roser González Duarte*

Dra. Roser Gonzàlez Duarte

Professor Adjunt del Departament de Genètica  
de la Facultat de Biologia de la Universitat  
de Barcelona.

Barcelona, Març 1984.



- 5.1. ESTABILITAT DE L'ENZIM
- 5.2. PES MOLECULAR DEL MONOMER
- 5.3. CORBA D'ACTIVITAT ENZIMÀTICA
- 5.4. pH ÒPTIM D'ACTIVACIÓ DE L'ENZIM PMA
- 5.5. PARÀMETRES CINÈTICS DE L'ENZIM

-5- ESTUDIS FUNCIONALS AMB L'ADH

DE D. HYDEI.

- 5.1. ESTABILITAT DE L'ENZIM.
- 5.2. PES MOLECULAR DEL MONÒMER .
- 5.3. CORBA D'ABSORCIÓ MOLAR.
- 5.4. pH ÒPTIM D'ACTUACIÓ DE L'ENZIM PUR.
- 5.5. PARÀMETRES CINÈTICS DE L'ENZIM.



FIGURA 5.1. Esquema dels estudis realitzats amb la proteïna pura, i tractaments necessaris previs a cada una de les proves indicades.

5.1. ESTABILITAT

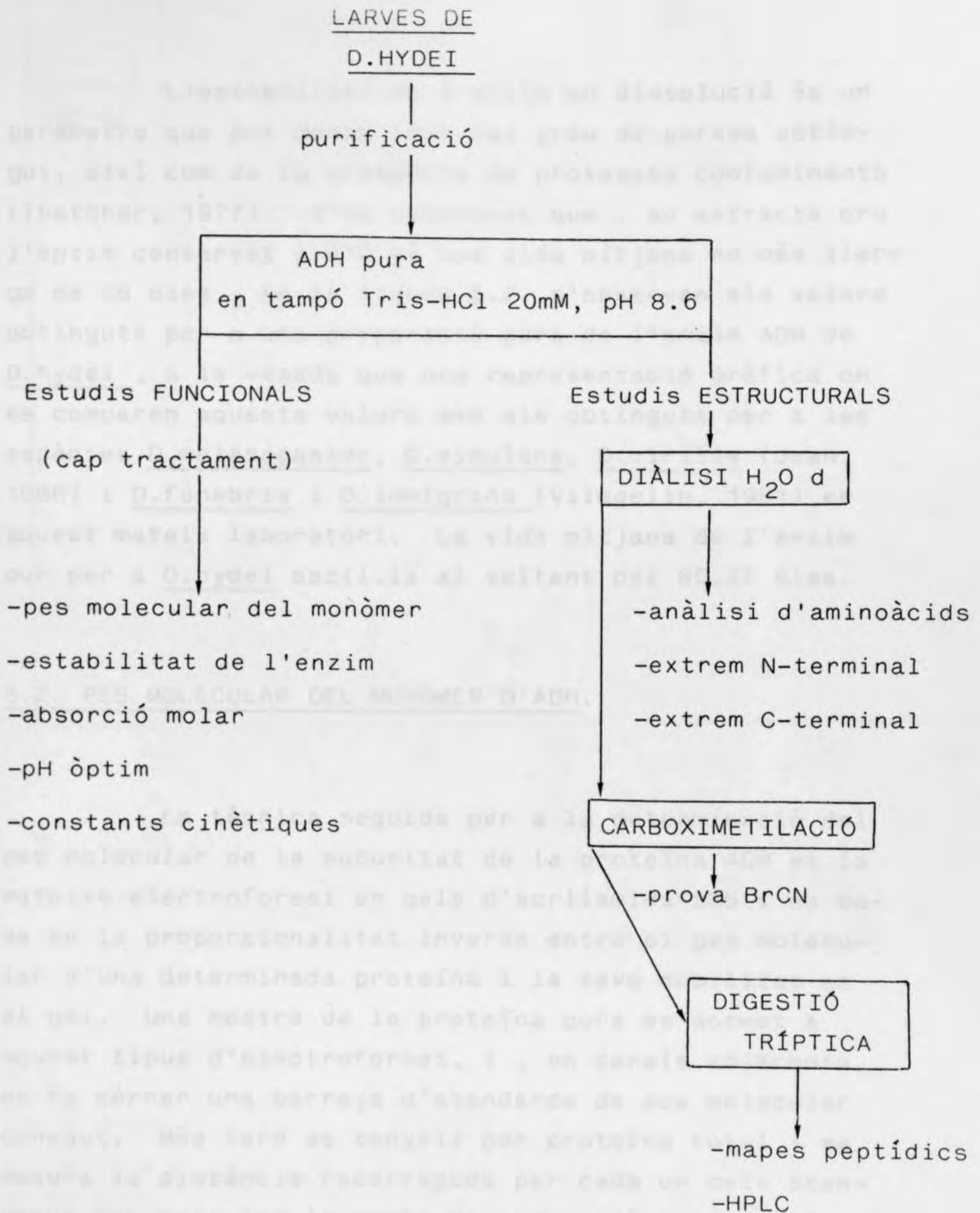


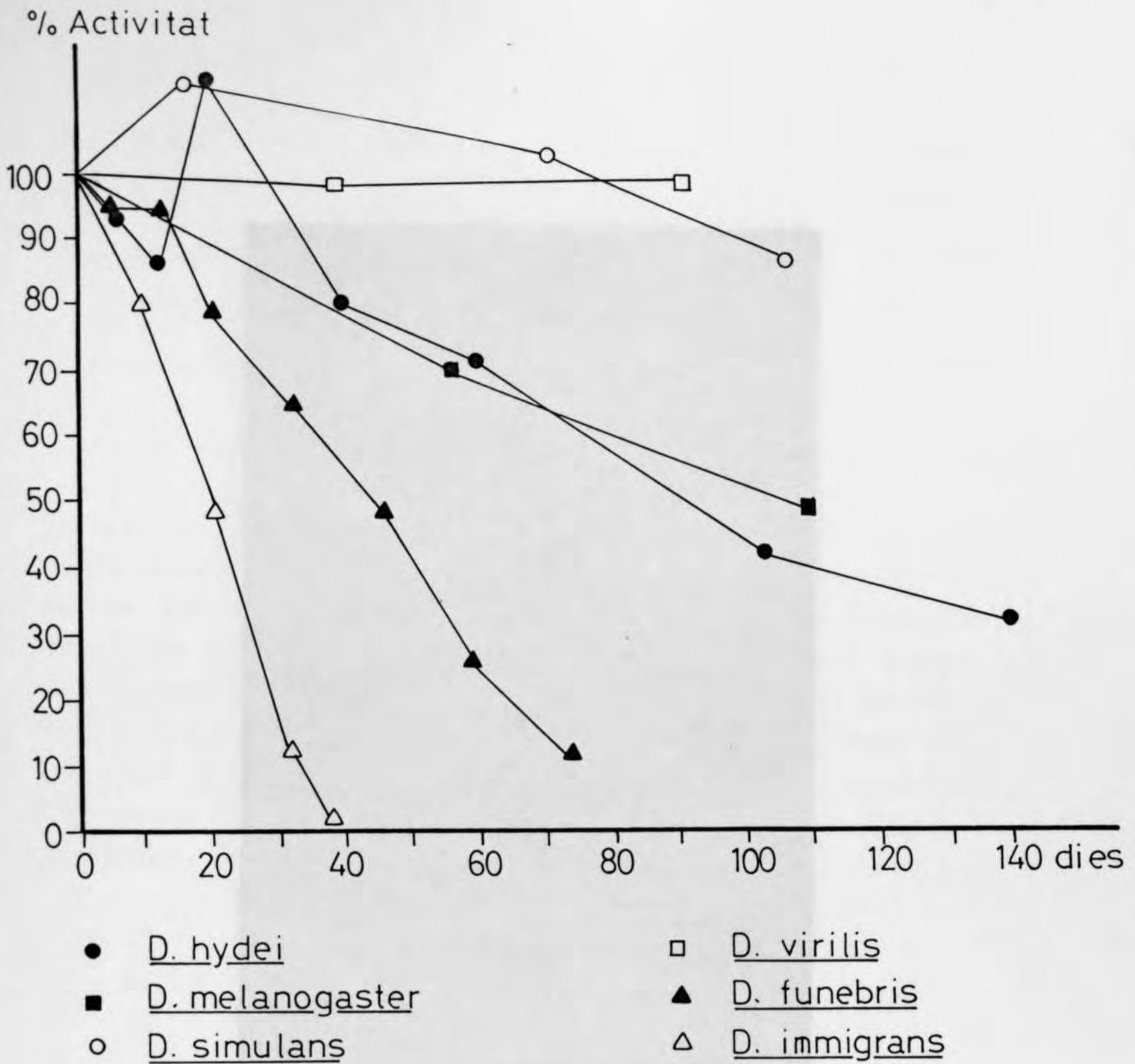
FIGURA 5.1. Esquema dels estudis realitzats amb la proteïna pura, i tractaments necessaris previs a cada una de les proves indicades.

### 5.1. ESTABILITAT DE L'ENZIM PUR.

L'estabilitat de l'enzim en dissolució és un paràmetre que pot donar idea del grau de puresa obtingut, així com de la presència de proteases contaminants (Thatcher, 1977). S'ha comprovat que, en extracte cru l'enzim conservat a 4°C té una vida mitjana no més llarga de 26 dies. En la figura 5.2. s'observen els valors obtinguts per a una preparació pura de l'enzim ADH de D.hydei, a la vegada que una representació gràfica on es comparen aquests valors amb els obtinguts per a les espècies D.melanogaster, D.simulans, D.virilis (Juan, 1980) i D.funnebris i D.immigrans (Vilageliu, 1981) en aquest mateix laboratori. La vida mitjana de l'enzim pur per a D.hydei oscil.la al voltant del 85.27 dies.

### 5.2. PES MOLECULAR DEL MONÒMER D'ADH.

La tècnica seguida per a la determinació del pes molecular de la subunitat de la proteïna ADH és la mateixa electroforesi en gels d'acrilamida-SDS i es basa en la proporcionalitat inversa entre el pes molecular d'una determinada proteïna i la seva mobilitat en el gel. Una mostra de la proteïna pura es sotmet a aquest tipus d'electroforesi, i, en canals adjacents, es fa córrer una barreja d'standards de pes molecular conegut. Més tard es tenyeix per proteïna total i es mesura la distància recorreguda per cada un dels standards per calcular la recta de regressió entre el logaritme decimal del seu pes molecular i la distància que el separa de l'origen de l'electroforesi. Aquesta recta de regressió permetrà la detrmnació del pes molecular de la mostra problema. En el nostre cas, els valors obtinguts varen ésser:



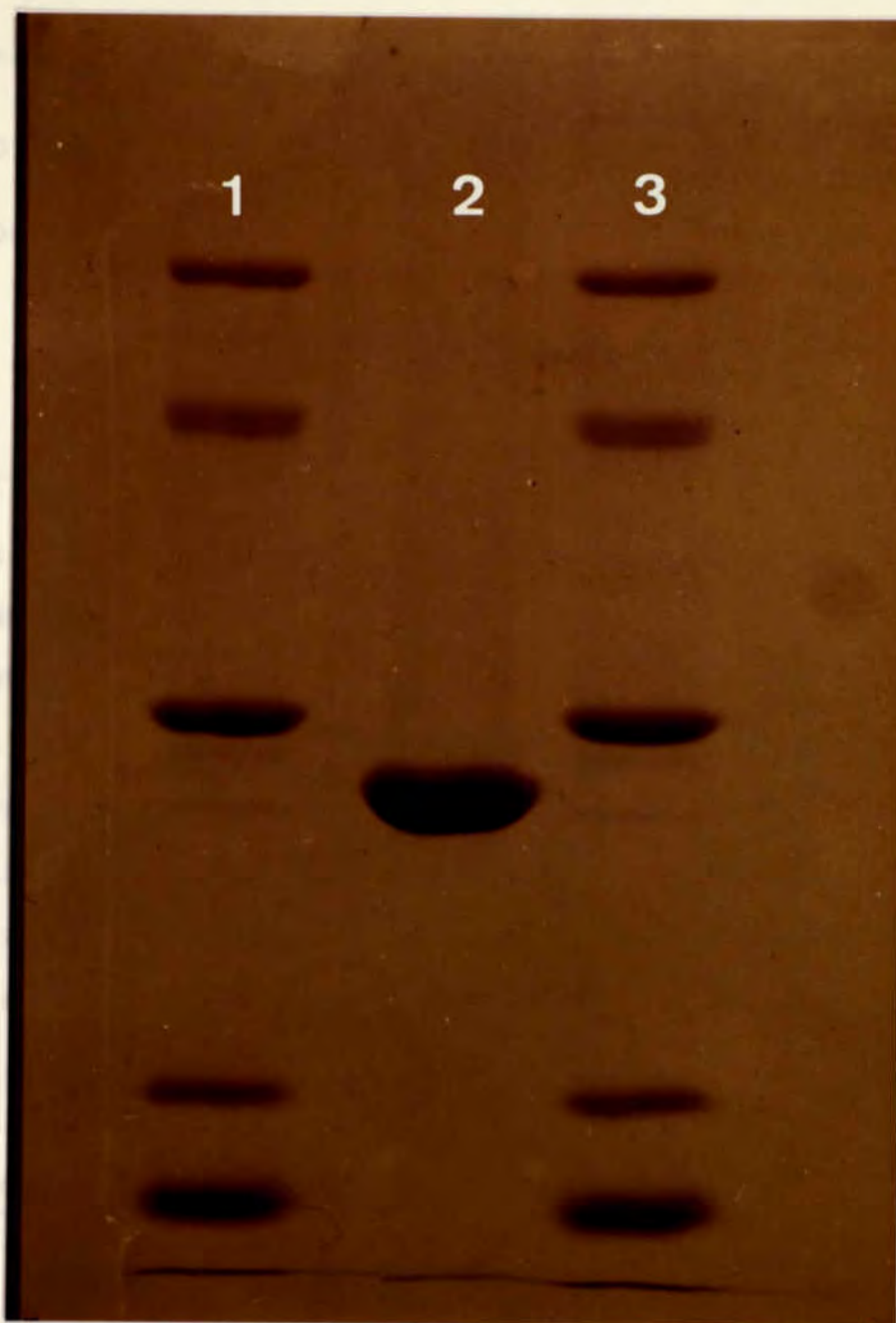
- D. hydei
- D. melanogaster
- D. simulans
- D. virilis
- ▲ D. funebris
- △ D. immigrans

|          |       |       |
|----------|-------|-------|
| 0 dies   | 2.697 | 100%  |
| 8 dies   | 2.516 | 93.2% |
| 15 dies  | 2.322 | 86.1% |
| 22 dies  | 3.096 | 114%  |
| 40 dies  | 2.012 | 74.6% |
| 57 dies  | 1.838 | 68.1% |
| 102 dies | 1.064 | 39.6% |
| 151 dies | 0.838 | 31.9% |
| 200 dies | 0.470 | 17.4% |

(U/ml)

FIGURA 5.2. Estabilitat de l'enzim ADH pur de D. hydei a 4°C, comparada amb la d'altres espècies (Muller i col. 1982)

| proteïna    | M <sub>r</sub> | log M <sub>r</sub> x 10 <sup>5</sup> | distància |
|-------------|----------------|--------------------------------------|-----------|
| BSA         | 66,700         | 1,817                                | 1,26cm    |
| Ovoalbúmina | 45,000         | 1,653                                | 2,50cm    |
| Anh. carb.  |                |                                      | 4,40cm    |
| Mioglobina  |                |                                      | 5,60cm    |
| Citocrom C  |                |                                      | 7,70cm    |



**FIGURA 5.3.** Electroforesi en gel d'acrilamida-SDS per a la determinació del pes molecular del monòmer d'ADH de D.hydei.

- Canals 1,3 : Standards
- a) BSA
  - b) Ovoalbúmina
  - c) Anh. carbònica
  - d) Mioglobina
  - e) Citocrom C

Canal 2 : ADH de D.hydei.



| <u>proteïna</u> | <u>PM</u> | <u>log PM x 10<sup>-3</sup></u> | <u>distància</u> |
|-----------------|-----------|---------------------------------|------------------|
| BSA             | 68,750    | 1.837                           | 1.28cm           |
| Ovoalbúmina     | 45,000    | 1.653                           | 2.50cm           |
| Anh.carbòn.     | 31,000    | 1.491                           | 4.40cm           |
| Mioglobina      | 17,800    | 1.250                           | 6.80cm           |
| Citocrom C      | 12,300    | 1.089                           | 7.70cm           |

La recta de regressió obtinguda:  $y = -0.0907x + 1.9610$ ,  $r = -0.99$

La mobilitat de la banda d'ADH, tal hi com es pot veure en la figura 5.3., era de 4.8cm, valor que va proporcionar un pes molecular de 27,224d. Aquest valor coincideix totalment amb el valor de la subunitat d'ADH per a totes les espècies estudiades, fet que indica la identitat de la estructura global de la molècula en tot el gènere. En haver determinat un valor de 54,213d per a l'enzim actiu (vegeu capítol 3), hom dedueix ràpidament que aquest consisteix en dues subunitats d'idèntic pes molecular.

### 5.3. ABSORCIÓ MOLAR DE L'ADH .

El coeficient d'absorció molar de la proteïna es determina mitjançant una solució de concentració coneguda, a partir de la qual es realitza l'espectre d'absorció en les longituds d'ona compreses entre 220 i 340nm. La proteïna pura es troba en solució en tampó Tris-HCl 20mM, pH 8.6, i per aquesta raó, el blanc de l'espectrofotòmetre es refereix sempre a aquest tampó. L'espectre dona dos màxims, un a 280nm i un a 290nm. Vegeu fig.5.4.

La lectura es realitza en cel·les d'1cm de gruixària, i la concentració va ésser calculada per anàlisi d'aminoàcids. Els resultats són els següents, per a proteïna provinent de diferents purificacions:

A<sub>280</sub>

220 nm

80

280 nm

60

290 nm

40

20

340 nm

0

FIGURA 5.4. Espectre d'absorció de la proteïna ADH de D.hydei en estat pur , en dissolució en tampó Tris-HCl 20mM pH 8.6.

(I)

$$A_{280} = E_{280} \cdot c \cdot l$$

$$E_{280} = \frac{A_{280}}{c \cdot l} = \frac{0.60}{1 \cdot 10.61 \times 10^{-6}} = 5.65 \times 10^4 \text{ l/mol cm}$$

si  $l = 1 \text{ cm}$ 

$$A_{280} = 0.60$$

$$c = 10.61 \text{ nmols/ml}$$

(II)

$$E_{280} = \frac{A_{280}}{c \cdot l} = \frac{0.92}{1 \cdot 22.1 \times 10^{-6}} = 5.20 \times 10^4 \text{ l/mol cm}$$

si  $l = 1 \text{ cm}$ 

$$A_{280} = 0.92$$

$$c = 22.10 \text{ nmols/ml}$$

Com a valor mitjà es pot adoptar  $5.425 \times 10^4 \text{ l/mol cm}$ .

El valor d'absorció molar serà extremadament útil per a una estimació ràpida de la concentració de proteïna en solució, després d'una purificació.

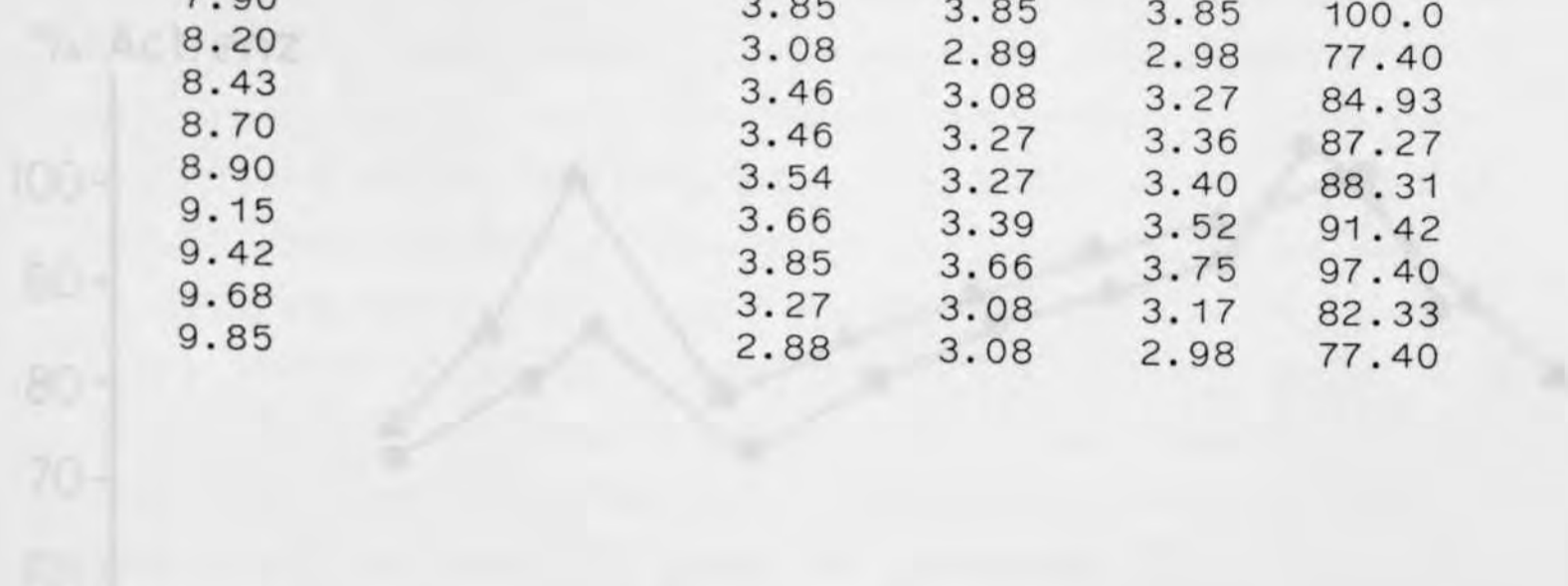
#### 5.4. DETERMINACIÓ DEL pH ÒPTIM DE L'ADH.

La determinació del pH òptim d'actuació de l'ADH en estat pur es va dur a terme amb solucions en tampó Tris-HCl 0.1M, ajustat al pH desitjat en cada cas. Les solucions d'isopropanol i  $\text{NAD}^+$  per a la lectura espectrofotomètrica també s'ajustaven al pH de cada prova. Les lectures es varen realitzar entre els pH de 7.5 i 10.0, a intervals de 0.25 unitats. En la taula 5.1., hom pot apreciar els resultats obtinguts a partir de de dues proves independents, valors que es troben representats en la figura 5.5.



PROVA 1

| pH   | Act. enz(u/ml) |      | $\bar{x}$ | %     |
|------|----------------|------|-----------|-------|
| 7.52 | 2.69           | 3.08 | 2.88      | 74.80 |
| 7.75 | 3.08           | 3.46 | 3.27      | 84.93 |
| 7.90 | 3.85           | 3.85 | 3.85      | 100.0 |
| 8.20 | 3.08           | 2.89 | 2.98      | 77.40 |
| 8.43 | 3.46           | 3.08 | 3.27      | 84.93 |
| 8.70 | 3.46           | 3.27 | 3.36      | 87.27 |
| 8.90 | 3.54           | 3.27 | 3.40      | 88.31 |
| 9.15 | 3.66           | 3.39 | 3.52      | 91.42 |
| 9.42 | 3.85           | 3.66 | 3.75      | 97.40 |
| 9.68 | 3.27           | 3.08 | 3.17      | 82.33 |
| 9.85 | 2.88           | 3.08 | 2.98      | 77.40 |



PROVA 2

| pH   | Act . enz. (U/ml) |      |      | $\bar{x}$ | %     |
|------|-------------------|------|------|-----------|-------|
| 7.58 | 5.00              | 5.00 | 4.23 | 4.74      | 72.44 |
| 7.80 | 5.00              | 5.00 | 5.39 | 5.13      | 78.44 |
| 7.95 | 5.00              | 5.39 | 5.58 | 5.32      | 81.34 |
| 8.23 | 4.23              | 4.62 | 4.23 | 4.36      | 66.66 |
| 8.49 | 5.00              | 4.81 | 5.00 | 4.93      | 75.38 |
| 8.75 | 5.77              | 5.00 | 5.39 | 5.38      | 82.26 |
| 9.00 | 5.77              | 5.39 | 5.00 | 5.38      | 82.26 |
| 9.10 | 5.39              | 5.77 | 5.77 | 5.64      | 86.26 |
| 9.35 | 6.54              | 6.54 | 6.54 | 6.54      | 100.0 |
| 9.50 | 6.54              | 6.16 | 6.74 | 6.48      | 99.08 |
| 9.60 | 5.00              | 5.39 | 5.39 | 5.26      | 80.42 |

TAULA 5.1. Determinació del pH òptim de l'enzim ADH de D. hydei .

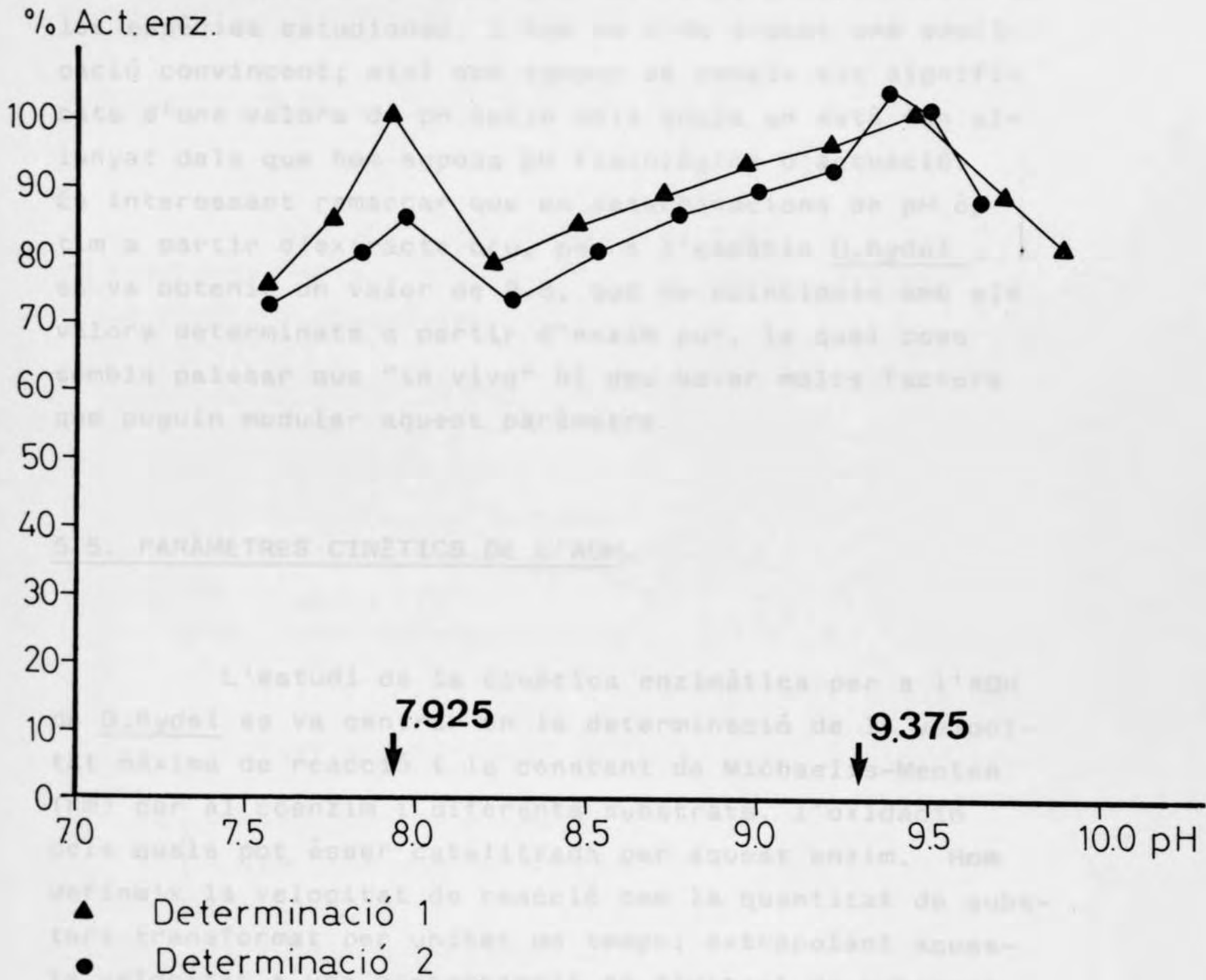


FIGURA 5.5. Determinació del pH òptim d'acció de l'enzim ADH de D. hydei, en estat pur i en tampó Tris-HCl, 20mM.

Els valors obtinguts són:

prova I : 7.90 i 9.40

prova II: 7.95 i 9.35

Hom adopta els valors mitjans: 7.925 i 9.375. El fet de presentar dos pics d'activitat màxima és comú a moltes de les espècies estudiades, i hom no n'ha trobat una explicació convincent; així com tampoc es coneix els significats d'uns valors de pH òptim dels quals un està tan allunyat dels que hom suposa pH fisiològics d'actuació. Es interessant remarcar que en determinacions de pH òptim a partir d'extracte cru, per a l'espècie D.hydei, es va obtenir un valor de 8.5, que no coincideix amb els valors determinats a partir d'enzim pur, la qual cosa sembla palesar que "in vivo" hi deu haver molts factors que puguin modular aquest paràmetre.

#### 5.5. PARÀMETRES CINÈTICS DE L'ADH.

L'estudi de la cinètica enzimàtica per a l'ADH de D.hydei es va centrar en la determinació de la velocitat màxima de reacció i la constant de Michaelis-Menten (Km) per al coenzim i diferents substrats, l'oxidació dels quals pot ésser catalitzada per aquest enzim. Hom defineix la velocitat de reacció com la quantitat de substrat transformat per unitat de temps; extrapolant aquesta velocitat a una concentració no limitant de substrat s'obté la velocitat màxima de reacció. (Vmax) El paràmetre Km indica l'afinitat de l'enzim envers un determinat substrat. Ambdós paràmetres tenen un paper diferent i complementari en el moment de determinar l'aptitud de l'enzim per degradar un substrat concret.

#### Determinació experimental.

Hi ha dos mètodes experimentals per calcular els paràmetres Km i Vmax. El primer, anomenat mètode

diferencial, es basa en l'anàlisi de les velocitats inicials de les reaccions catalitzades per l'enzim sobre diferents concentracions de substrat. El segon, anomenat mètode d'integració, té com a base l'anàlisi de la corba de reacció. Hom ha adoptat el mètode diferencial en dues de les seves variants: la linearització de Lineweaver-Burk i el mètode d'Eisenthal.

Linearització de Lineweaver-Burk.(1934)

Si hom inverteix els dos termes de l'equació de Michaelis-Menten, s'obté una representació linear de la cinètica enzimàtica:

$$v = \frac{[E] [S] k_{cat}}{K_m + [S]}$$

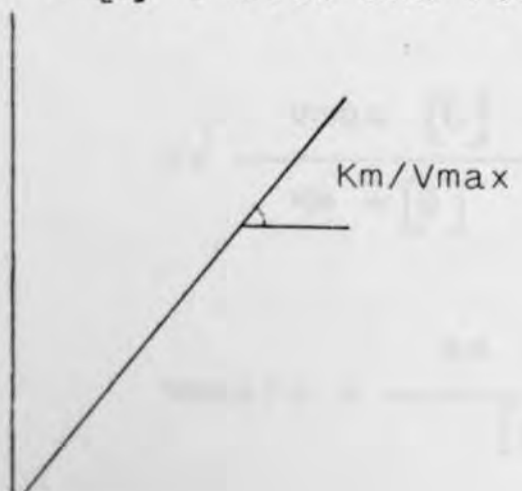
$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$1/v = \frac{K_m + [S]}{V_{max} [S]}$$

$$1/v = 1/V_{max} + (K_m/V_{max}) (1/[S]).$$

- on  $[E]$  = concentració d'enzim
- $[S]$  = concentració de substrat
- $V_{max} = k_{cat} \cdot E$
- $v$  = velocitat de reacció.

Si hom representa en eixos de coordenades  $1/v$  en front a  $1/[S]$  s'obté una recta de forma  $y = ax + b$ :



- on
- $1/V_{max}$  és l'ordenada en l'origen
- $-1/K_m$  és l'abcisa en l'origen
- $K_m/V_{max}$  és la pendent

Si hom obté la recta de regressió de les inverses de la velocitat inicial de la reacció en front als respectius inversos de les concentracions de substrat, hom obté, en realitat, l'equació de la recta de Lineweaver-Burk, i el valor del quocient entre ambdós paràmetres ( $K_m/V_{max}$  i  $1/V_{max}$ ) proporciona una estimació del valor de  $K_m$ , que s'anomena  $K_m$  aparent de la reacció.

Mètode d'Eisenthal. (Eisenthal-Cornish-Bowden, 1974).

En els eixos de coordenades hom representa  $K_m$  en abcises i  $V_{max}$  en ordenades. Hom construeix cada una de les rectes que queda definida per cada parella de dades experimentals ( $[S]$  i  $v$  corresponent). Teòricament totes aquestes rectes interseccionarien en un mateix punt, la coordenada del qual sobre les abcises fóra precisament el valor de  $K_m$ . En la determinació pràctica, hom compta amb una sèrie de valors d'intersecció per a cada una de les rectes, de manera que hom adopta com a valor de  $K_m$  la mediana de tots ells. Per a  $n$  parelles observacionals, hom té sempre  $\frac{1}{2} n(n-1)$  punts d'intersecció, que provenen de les  $n(n-1)/2!$  combinacions binàries possibles entre ells  $\binom{n}{2}$ . Convé un interval ampli de concentracions de substrat perquè els punts d'intersecció resten millor definits com menys agut és l'angle que defineixen ambdues rectes.

Heus aquí la transformació de l'equació de Michaelis-Menten que deriva en el mètode d'Eisenthal.

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \qquad 1/v = \frac{K_m + [S]}{V_{max} [S]}$$

$$V_{max}/v = \frac{K_m + [S]}{[S]} \qquad V_{max}/v = \frac{K_m}{[S]} + 1$$



$$V_{\max}/v = \frac{K_m}{[S]}$$

$$V_{\max}/v - K_m/[S] = 1$$

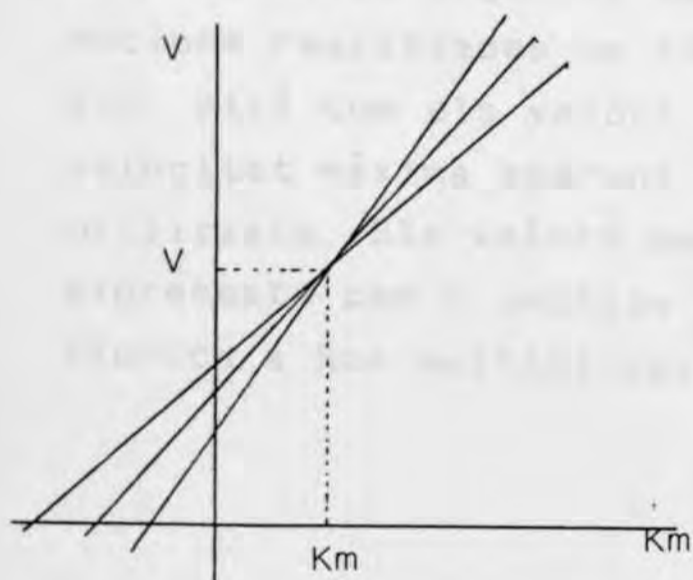
Si hom suposa les incògnites (x) ...  $V_{\max}$

(y) ...  $K_m$

i els paràmetres  $v$  ... a

$[S]$ ... b

hom obté una equació de la forma  $x/a + y/b = 1$ , que no és més que una recta en els eixos de coordenades  $yx$ , que intersecciona amb (a) en les abcises i (y) en les coordenades.



Fóra incorrecte considerar la mitjana en lloc de la mediana, ja que aquesta anul·la els valors extrems de les interseccions.

### Condicions experimentals.

Hom va treballar amb concentracions saturants no inhibidores de coenzim ( $\text{NAD}^+$  1.72mM). Per a la determinació de les  $K_m$  del  $\text{NAD}^+$ , hom va usar isopropanol 120mM com a substrat. (vegeu taula 5.2.)

Per a reaccions on intervenen més d'un substrat i es forma un complex ternari de transició, l'equació de Michaelis-Menten es transforma en:

$$v = \frac{V_{\max} [S_a] [S_b]}{K_m^a K_m^b + K_m^b [S_a] + K_m^a [S_b] + [S_a] [S_b]}$$

on  $[S_a]$  = concentració de substrat a

$[S_b]$  = concentració de substrat b

Si hom conserva invariable el valor d'una d'aquestes concentracions, s'obté la forma general de l'equació de Michaelis-Menten per a l'altre substrat:

$$v = \frac{V_{max} [S_a]}{K_m^a + [S_a]} \quad \text{si } [S_b] = \text{constant.}$$

La velocitat inicial de cada determinació es feia per registre de l'increment d'absorció a 340nm.

En les taules següents es consideren totes les determinacions realitzades en els estudis de cinètica de l'enzim, així com els valors dels paràmetres Km aparent i velocitat màxima aparent per a cada un dels substrats utilitzats. Els valors de velocitat inicial es troben expressats com a unitats enzimàtiques, i els valors recíprocs s'han multiplicat x 10<sup>4</sup>.

| [S <sub>a</sub> ] | [S <sub>b</sub> ] | v <sub>0</sub> | 1/v <sub>0</sub> |
|-------------------|-------------------|----------------|------------------|
| 0.001             | 0.001             | 179.2          | 0.1121           |
| 0.002             | 0.001             | 185.6          | 0.0736           |
| 0.003             | 0.001             | 188.9          | 0.0510           |
| 0.004             | 0.001             | 190.7          | 0.0369           |
| 0.005             | 0.001             | 193.2          | 0.0344           |
| 0.006             | 0.001             | 196.3          | 0.0303           |
| 0.007             | 0.001             | 198.7          | 0.0281           |
| 0.008             | 0.001             | 199.8          | 0.0296           |
| 0.009             | 0.001             | 200.7          | 0.0294           |
| 0.010             | 0.001             | 201.4          | 0.0300           |
| 0.011             | 0.001             | 201.8          | 0.0311           |

| $[NAD^+]_{mm}$ | $[NAD^+]_{final}$ | $1/[NAD^+]$ | sèrie 1     |               |             | sèrie 2       |             |               | sèrie 3 |  |  |
|----------------|-------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|---------|--|--|
|                |                   |             | $V_{inic.}$ | $1/V_{inic.}$ | $V_{inic.}$ | $1/V_{inic.}$ | $V_{inic.}$ | $1/V_{inic.}$ |         |  |  |
| 0.4            | 0.05              | 20          | 774.2       | 0.1291        | 1548.3      | 0.6458        | 1354.8      | 0.738         |         |  |  |
| 1              | 0.125             | 8           | 1354.8      | 0.0738        | 1935.5      | 0.5160        | 1935.4      | 0.516         |         |  |  |
| 2              | 0.25              | 4           | 1935.5      | 0.0516        | 2322.5      | 0.4305        | 3019.3      | 0.331         |         |  |  |
| 4              | 0.5               | 2           | 2709.7      | 0.0369        | 3483.8      | 0.2870        | 3096.7      | 0.323         |         |  |  |
| 8              | 1                 | 1           | 2903.2      | 0.0344        | 3667.4      | 0.2719        | 3870.9      | 0.258         |         |  |  |
| 12             | 1.5               | 0.66        | 3290.3      | 0.0303        | 4258.0      | 0.2348        | 4258.0      | 0.235         |         |  |  |
| 16             | 2                 | 0.5         | 3096.7      | 0.0322        | 3987.0      | 0.2508        | 4064.5      | 0.246         |         |  |  |
| 20             | 2.5               | 0.4         | 2903.2      | 0.0340        | 3870.9      | 0.2583        | 3483.8      | 0.287         |         |  |  |
| 24             | 3                 | 0.33        | 2709.7      | 0.0360        | 3483.8      | 0.2870        | 3483.8      | 0.287         |         |  |  |
| 32             | 4                 | 0.25        | 2516.1      | 0.0390        | 3290.3      | 0.3039        | 2903.2      | 0.344         |         |  |  |
| 40             | 5                 | 0.2         | 1935.4      | 0.0516        | 2903.2      | 0.3444        | 2709.6      | 0.370         |         |  |  |

Punt d'inflexió = punt de saturació del  $NAD^+$  .... entre 1.5 i 2 mm

TAULA 5.2. Determinació de la  $K_m$  aparent pel coenzim ( $NAD^+$ ). Concentració d'isopropanol saturant, 120 mM. (  $V_{inic.} \times 10^3$  )

Km NAD<sup>+</sup> / Mètode de Lineweaver-Burk

sèrie (1) ....  $y = 0.00508x + 0.02913$   $r = 0.99$

$Km = 0.174$

sèrie (2) ....  $y = 0.03704x + 0.23646$   $r = 0.97$

$Km = 0.156$

sèrie (3) ....  $y = 0.03579x + 0.22048$   $r = 0.97$

$Km = 0.162$

$Km \text{ ap. } (\bar{x}) = 0.164 \text{ mM} \pm 0.010$

TAULA 5.3. Càlcul de les constants cinètiques per al NAD<sup>+</sup>

Km NAD<sup>+</sup> / Mètode d'Eisenthal

| <u>sèrie 1</u> | <u>sèrie 2</u> | <u>sèrie 3</u> |                             |
|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|
| 0.076          | 0.058          | 0.013          |                             |
| 0.124          | 0.062          | 0.103          |                             |
| 0.150          | 0.147          | 0.125          |                             |
| 0.169          | 0.181          | 0.134          |                             |
| 0.179          | 0.183          | 0.166          |                             |
| 0.187          | 0.187          | 0.183          |                             |
| 0.189          | 0.241          | 0.318          |                             |
| 0.192          | 0.300          | 0.333          |                             |
| 0.199          | 0.500          | 0.346          |                             |
| 0.223          | 0.692          | 0.374          | $\bar{x} = 0.184 \pm 0.009$ |
| 0.244          |                |                |                             |
| 0.250          |                |                |                             |
| 0.333          |                |                |                             |
| 0.545          |                |                |                             |

Km=0.192

Km=0.185

Km=0.175

| [Isop.] mM | [Isop]f | sèrie 1 |         | sèrie 2 |         | sèrie 3 |         |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|            |         | V inic  | 1/V in. | V inic. | 1/V in. | V inic. | 1/ Vin. |
| 4          | 0.5     | 851.6   | 1.170   | 967.7   | 1.033   | 967.7   | 1.033   |
| 8          | 1       | 1161.3  | 0.861   | 1354.8  | 0.738   | 1161.3  | 0.861   |
| 10         | 1.25    | 1354.8  | 0.738   | 1548.4  | 0.645   | 1625.8  | 0.615   |
| 12         | 1.5     | 1470.9  | 0.679   | 1664.5  | 0.600   | 1741.9  | 0.574   |
| 16         | 2.0     | 1541.4  | 0.645   | 1741.9  | 0.574   | 1858.1  | 0.538   |
| 20         | 2.5     | 1664.5  | 0.600   | 1819.3  | 0.549   | 1896.8  | 0.527   |
| 24         | 3       | 1741.9  | 0.574   | 1935.5  | 0.516   | 1935.5  | 0.516   |
| 32         | 4       | 1994.2  | 0.506   | 2012.9  | 0.496   | 2051.6  | 0.487   |

TAULA 5.4. Determinació de la Km aparent per a l'isopropanol. Concentració de coenzim saturant (NAD<sup>+</sup> 1.72 mM)

Km Isopropanol / Mètode de Lineweaver-Burk.

Km Isopropanol / Mètode de Lineweaver-Burk.

|                 | sèrie 1   | sèrie 2           | sèrie 3    |
|-----------------|---|-------------------|------------|
| sèrie (1) ....  | $y = 0.370x + 0.446$                            |                   | $r = 0.99$ |
|                 | $K_m = 0.841$                                   | $V_{max} = 2.238$ |            |
| sèrie (2) ....  | $y = 0.4157x + 0.308$                           |                   | $r = 0.99$ |
|                 | $K_m = 0.742$                                   | $V_{max} = 2.409$ |            |
| sèrie (3) ....  | $y = 0.331x + 0.397$                            |                   | $r = 0.95$ |
|                 | $K_m = 0.834$                                   | $V_{max} = 2.515$ |            |
| Valors mitjans: |   |                   |            |
|                 | $K_m \text{ ap.} = 0.8056 \text{ mM} \pm 0.062$ |                   |            |
|                 | $V_{max} = 2.387 \text{ mMols/min} \pm 0.158$   |                   |            |

TAULA 5.5. Càlcul de les constant cinètiques per a l'isopropanol.

Km Isopropanol / Mètode d'Eisenthal.

| <u>sèrie 1</u> | <u>sèrie 2</u> | <u>sèrie 3</u> |
|----------------|----------------|----------------|
| 0.375          | 0.324          | 0.227          |
| 0.571          | 0.405          | 0.250          |
| 0.614          | 0.526          | 0.272          |
| 0.625          | 0.530          | 0.340          |
| 0.677          | 0.540          | 0.375          |
| 0.740          | 0.545          | 0.384          |
| 0.750          | 0.574          | 0.465          |
| 0.769          | 0.583          | 0.472          |
| 0.783          | 0.631          | 0.477          |
| 0.793          | 0.652          | 0.500          |
| 0.812          | 0.666          | 0.540          |
| 0.857          | 0.705          | 0.625          |
| 0.908          | 0.727          | 0.629          |
| 0.927          | 0.729          | 0.750          |
| 0.999          | 0.736          | 0.761          |
| 0.999          | 0.740          | 0.789          |
| 0.999          | 0.750          | 0.833          |
| 1.015          | 0.775          | 0.874          |
| 1.033          | 0.800          | 0.884          |
| 1.049          | 0.818          | 0.999          |
| 1.071          | 0.833          | 1.036          |
| 1.125          | 0.843          | 1.372          |
| 1.217          | 0.857          | 1.499          |
| 1.517          | 0.862          | 1.826          |
| 1.713          | 0.899          | 2.999          |
| 1.797          | 1.263          | 5.800          |
| 2.497          | 1.406          |                |
| 2.666          | 1.666          |                |

Km = 0.963

Km = 0.732

Km = 0.755

Km = 0.816 ± 0.074

TAULA 5.6.

| <u>[Et.] mM</u> | <u>[Et] f.</u> | <u>série 1</u> |                | <u>série 2</u> |                | <u>série 3</u> |                |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                 |                | <u>V inic.</u> | <u>1/V in.</u> | <u>V inic.</u> | <u>1/V in.</u> | <u>V inic.</u> | <u>1/V in.</u> |
| 20              | 2.5            | 270.96         | 0.369          | 270.96         | 0.369          | 283.87         | 0.352          |
| 40              | 5              | 387.09         | 0.258          | 387.09         | 0.258          | 451.61         | 0.221          |
| 80              | 10             | 541.93         | 0.184          | 619.35         | 0.161          | 516.13         | 0.193          |
| 100             | 12.5           | 606.45         | 0.165          | 645.16         | 0.155          | 645.16         | 0.155          |
| 160             | 20             | 645.16         | 0.155          | 683.87         | 0.146          | 709.67         | 0.141          |
| 200             | 25             | 483.87         | 0.146          | 774.19         | 0.129          | 774.19         | 0.129          |

Mètode de Lineweaver-Burk.

(1)  $y = 0.627x + 0.121$      $r = 0.99$     (2)  $y = 0.673x + 0.105$      $r = 0.99$     (3)  $y = 0.595x + 0.112$      $r = 0.99$

Km = 5.166mM  
Vmax = 8.210

Km = 6.394mM  
Vmax = 9.493

Km = 5.315mM  
Vmax = 8.920

Km ap. = 5.625mM ± 0.758    Vmax = 8.874 ± 0.727 mMols/min

TAULA 5.7. Determinació de la Km aparent per a l'etanol. Concentració de coenzim saturant (NAD<sup>+</sup> 1.72 mM)



Km etanol / Mètode d'Eisenthal

| <u>sèrie 1</u>                                 | <u>sèrie 2</u> | <u>sèrie 3</u> |
|--|----------------|----------------|
| 2.380  | 2.222          | 1.666          |
| 3.213  | 2.325          | 3.750          |
| 3.749  | 2.500          | 3.999          |
| 4.705  | 3.750          | 4.705          |
| 4.767  | 4.999          | 5.000          |
| 4.915  | 5.565          | 5.434          |
| 4.917  | 6.248          | 5.454          |
| 4.943  | 6.500          | 5.833          |
| 5.000  | 6.591          | 5.937          |
| 5.600  | 6.865          | 6.248          |
| 5.603  | 7.500          | 7.223          |
| 5.714  | 8.331          | 11.998         |
| 6.668  | 9.998          | 12.496         |
| 7.590  | 14.994         | 14.274         |
| 11.359   | 27.962         |                |
| Km=4.943                                       | Km=6.500       | Km=5.643       |
| $\underline{\underline{Km = 5.695 \pm 0.882}}$ |                |                |

TAULA 5.8.



| [Isob.] | [Isob]f | sèrie 1   |                 | sèrie 2 |         | sèrie 3 |         |
|---------|---------|-----------|-----------------|---------|---------|---------|---------|
|         |         | 1/[Isob.] | V inic. 1/V in. | V inic. | 1/V in. | V inic. | 1/V in. |
| 3.2     | 0.4     | 2.5       | 877.41          | 903.22  | 1.107   | 1032.35 | 0.968   |
| 6.4     | 0.8     | 1.25      | 1061.29         | 1225.80 | 0.815   | 1290.32 | 0.775   |
| 8       | 1       | 1         | 1225.80         | 1354.83 | 0.738   | 1419.35 | 0.704   |
| 9.6     | 1.2     | 0.83      | 1290.32         | 1419.35 | 0.704   | 1483.87 | 0.674   |
| 12      | 1.5     | 0.66      | 1354.83         | 1548.38 | 0.645   | 1522.58 | 0.656   |
| 16      | 2       | 0.5       | 1491.35         | 1677.41 | 0.596   | 1677.41 | 0.596   |

Mètode de Lineweaver-Burk.

(1)  $y = 0.217x + 0.594$   $r=0.99$  (2)  $y = 0.252x + 0.484$   $r=0.99$  (3)  $y = 0.179x + 0.526$   
 $r = 0.99$

Km= 0.367mM

Km= 0.520mM

Km= 0.346mM

Vmax= 1.683

Vmax= 2.083

Vmax= 1.923

TAULA 5.9. Determinació de la Km aparent per a l'isobutanol. Concentració de coenzim saturant (1.72mM )

Km isobutanol/ Mètode d'Eisenthal.

| <u>sèrie 1</u> | <u>sèrie 2</u> | <u>sèrie 3</u> |
|----------------|----------------|----------------|
| 0.285          | 0.375          | 0.174          |
| 0.342          | 0.444          | 0.255          |
| 0.352          | 0.480          | 0.266          |
| 0.306          | 0.500          | 0.313          |
| 0.369          | 0.526          | 0.333          |
| 0.370          | 0.545          | 0.336          |
| 0.374          | 0.553          | 0.352          |
| 0.382          | 0.600          | 0.370          |
| 0.399          | 0.624          | 0.388          |
| 0.424          | 0.645          | 0.444          |
| 0.428          | 0.651          | 0.486          |
| 0.467          | 0.666          | 0.499          |
| 0.653          | 0.727          | 0.514          |
| 0.609          | 0.749          | 0.666          |
| 0.866          | 0.857          | 0.877          |

Km=0.382                      Km=0.600                      Km=0.370

Km= 0.450 ± 0.146

TAULA 5.10.

série 1série 2série 3

| <u>[N-but]</u> | <u>[N-but]</u> f | <u>1/[N-but]</u> | <u>V inic.</u> | <u>1/V in.</u> | <u>V inic.</u> | <u>1/V in.</u> | <u>V inic.</u> | <u>1/V in.</u> |
|----------------|------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 16             | 2                | 0.5              | 516.13         | 0.193          | 580.64         | 0.172          | 645.16         | 0.155          |
| 24             | 3                | 0.33             | 645.16         | 0.155          | 774.19         | 0.129          | 774.19         | 0.129          |
| 32             | 4                | 0.25             | 709.60         | 0.141          | 838.70         | 0.119          | 877.42         | 0.114          |
| 40             | 5                | 0.2              | 838.70         | 0.119          | 903.22         | 0.110          | 903.22         | 0.110          |
| 48             | 6                | 0.16             | 903.22         | 0.110          | 929.03         | 0.107          | 967.74         | 0.103          |

Mètode de Lineweaver-Burk.

$$(1) y = 0.242x + 0.073 \quad r = 0.99$$

$$K_m = 3.310 \text{mM}$$

$$V_{\text{max}} = 1.428$$

$$(2) y = 0.193x + 0.071 \quad r = 0.98$$

$$K_m = 2.710 \text{mM}$$

$$V_{\text{max}} = 1.368$$

$$(3) y = 0.153x + 0.078$$

$$r = 0.99$$

$$K_m = 2.140 \text{mM}$$

$$V_{\text{max}} = 1.282$$

TAULA 5.11. Determinació de la  $K_m$  aparent per a l'N-butanol. Concentració de coenzim saturant ( 1.72mM)

Km N-butanol / Mètode d'Eisenthal.

|  | <u>sèrie 1</u>               | <u>sèrie 2</u> | <u>sèrie 3</u> |
|--|------------------------------|----------------|----------------|
|  | 401.90                       | 490.32         | 472.90         |
|  | 416.12                       | 481.04         | 481.04         |
|  | 500.64                       | 581.04         | 581.04         |
|  | 515.76                       | 580.04         | 580.04         |
|  | 519.96                       | 670.04         | 670.04         |
|  | 517.07                       | 683.67         | 683.67         |
|  | 0.21                         | 0.204          | 0.204          |
|  | 0.03                         | 0.04           | 0.04           |
|  | 0.72                         | 0.67           | 0.67           |
|  | 0.156                        | 0.156          | 0.156          |
|  | 0.149                        | 0.107          | 0.107          |
|  | 0.41                         | 0.141          | 0.141          |
|  | Km= 3.678                    | Km= 2.138      | Km= 1.999      |
|  | <u>Km . 2.605 mM ± 1.054</u> |                |                |

TAULA 5.12.

TAULA 5.13. Determinació de la Km alcohòlica amb el mètode d'Eisenthal. Concentració de substrat constant i 1.73mM.

série 1

série 2

série 3

| <u>[N-prop]</u> | <u>[N-prop]·f</u> | <u>1/[N-prop]</u> | <u>V inic.</u> | <u>1/V in.</u> | <u>V inic.</u> | <u>1/V in.</u> | <u>V inic.</u> | <u>1/V in.</u> |
|-----------------|-------------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 16              | 2                 | 0.5               | 451.60         | 0.221          | 490.32         | 0.204          | 412.90         | 0.242          |
| 24              | 3                 | 0.33              | 516.12         | 0.193          | 451.93         | 0.184          | 451.60         | 0.225          |
| 32              | 4                 | 0.25              | 580.64         | 0.172          | 619.35         | 0.161          | 541.93         | 0.184          |
| 40              | 5                 | 0.2               | 645.16         | 0.155          | 645.16         | 0.155          | 580.64         | 0.172          |
| 48              | 6                 | 0.16              | 670.96         | 0.149          | 658.06         | 0.151          | 619.35         | 0.161          |
| 64              | 8                 | 0.125             | 709.67         | 0.141          | 709.67         | 0.141          | 683.87         | 0.164          |

Mètode de Lineweaver-Burk

(1)  $y = 0.219x + 0.114$   $r = 0.99$

$K_m = 1.920\text{mM}$

$V_{max} = 9.090$

(2)  $y = 0.169x + 0.121$   $r = 0.98$

$K_m = 1.387\text{mM}$

$V_{max} = 8.333$

(3)  $y = 0.260x + 0.119$   
 $r = 0.97$

$K_m = 2.180\text{mM}$

$V_{max} = 8.403$

$K_m \text{ ap} = 1.829\text{mM} \pm 0.457$

$V_{max} = 8.608 \pm 0.473$

TAULA 5.13. Determinació de la  $K_m$  aparent per a l'N-propanol. Concentració de coenzim saturant ( 1.72mM).

Km N-propanol / Mètode d'Eisenthal.

| <u>sèrie 1</u> | <u>sèrie 2</u> | <u>sèrie 3</u> |
|----------------|----------------|----------------|
| 1.200          | 0.666          | 0.692          |
| 1.497          | 0.799          | 1.818          |
| 1.599          | 0.857          | 1.857          |
| 1.600          | 1.000          | 1.999          |
| 1.676          | 1.237          | 2.000          |
| 1.882          | 1.333          | 2.239          |
| 1.929          | 1.366          | 2.399          |
| 2.000          | 1.401          | 2.838          |
| 2.285          | 1.428          | 2.998          |
| 2.322          | 1.599          | 3.368          |
| 2.400          | 1.638          | 3.545          |
| 2.571          | 1.824          | 3.570          |
| 2.707          | 2.000          | 3.636          |
| 3.000          | 2.462          | 3.751          |
| 4.000          | 2.999          | 6.000          |

Km=2.000

Km= 1.401

Km= 2.838

$$\text{Km} = \underline{\underline{2.079\text{mM} \pm 0.816}}$$

TAULA 5.14

Lineweaver-Burk

Km

Eisenthal

Vmax.  
(mmols/min/mol sub.)

|                  |                 |                 |             |
|------------------|-----------------|-----------------|-------------|
| NAD <sup>+</sup> | 0.164mM ± 0.010 | 0.184mM ± 0.009 | -----       |
| Isopropanol      | 0.805mM ± 0.062 | 0.810mM ± 0.074 | 7.36 ± 0.21 |
| Etanol           | 5.625mM ± 0.758 | 5.695mM ± 0.082 | 2.77 ± 0.15 |
| Isobutanol       | 0.408mM ± 0.109 | 0.450mM ± 0.146 | 5.93 ± 0.43 |
| N-propanol       | 1.829mM ± 0.457 | 2.079mM ± 0.816 | 2.70 ± 0.09 |
| N-butanol        | 2.716mM ± 0.656 | 2.605mM ± 1.054 | 4.18 ± 0.17 |

TAULA 5.15. Quadre resum de les constants cinètiques de l'ADH de D.hyei.

Figura 5.15. Representació gràfica de les velocitats de reacció de l'ADH de D.hyei amb els substrats isopropanol, etanol, isobutanol, n-propanol i n-butanol. Les velocitats de reacció s'obtingueren a partir de les dades de la taula 5.15. Le catalasa d'extracte de D.hyei s'utilitzà.



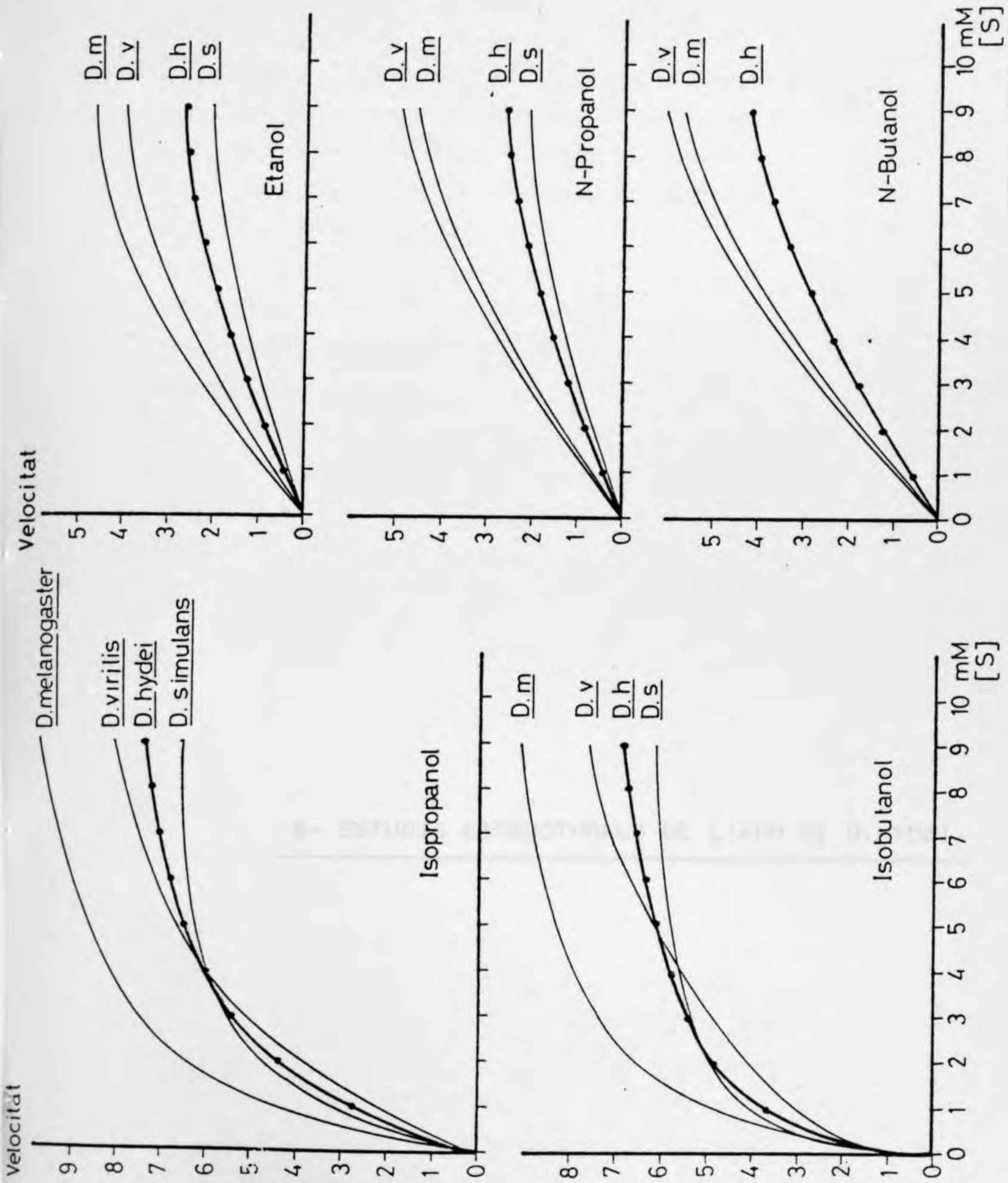


FIGURA 5.6. Representació gràfica de les velocitats de reacció de l'enzim ADH de D.hydei i altres espècies estudiades (E.Juan, 1980), en la catàlisi d'oxidació de diferents substrats.

6. ESTUDIS ESTRUCTURALS DE L'ADH DE D.HYDEI.

- 6.1. COMPOSICIÓ I AMPLIFICACIÓ DEL MONÒMER D'ADH.
- 6.2. DETERMINACIÓ DE METIIONINA EN LA MOLÈCULA.
- 6.3. DETERMINACIÓ DE L'EXTREM N-TERMINAL.
- 6.4. DETERMINACIÓ DE L'EXTREM C-TERMINAL.
- 6.5. CARBOXIMETILACIÓ.
- 6.6. DIGESTIÓ TRÍPTICA.
- 6.7. MAPES PEPTÍDICS ANALÍTICS.
- 6.8. MAPES PEPTÍDICS PREPARATIUS.
- 6.9. HPLC.

6.1. COMPOSICIÓ D'AMINOÀCIDS DEL MONÒMER D'ADH.

6. ESTUDIS ESTRUCTURALS DE L'ADH DE D.HYDEI.

6.1. COMPOSICIÓ D'AMINOÀCIDS DEL MONÒMER D'ADH.

6.2. DETERMINACIÓ DE METIONINA EN LA MOLÈCULA.

6.3. DETERMINACIÓ DE L'EXTREM N-TERMINAL.

6.4. DETERMINACIÓ DE L'EXTREM C-TERMINAL.

6.5. CARBOXIMETILACIÓ.

6.6. DIGESTIÓ TRÍPTICA.

6.7. MAPES PEPTÍDICS ANALÍTICS.

6.8. MAPES PEPTÍDICS PREPARATIUS.

6.9. HPLC.

Oxidació amb àcid perbòrmic.

L'oxidació de la proteïna prèvia a la digestió permet l'estimació dels valors de cisteïna com a àcid cisteic, a la vegada que els de la metionina com a la cisteïna. L'aminació térdina pot fer variar els valors de cisteïna, per això no es consideren els valors dels (6.1. a 6.3.) Les anàlisis amb mostra oxidada es fan mitjançant una hidròlisi de 24h a 105°C.

Anàlisi del triptòfan.

Per a la quantificació del triptòfan es aconsegueix la mostra a hidròlisi amb mitjançant un àcid cisteic amb el para-aminosalicilat.

## 6.1. COMPOSICIÓ D'AMINOÀCIDS DEL MONÒMER D'ADH.

Per establir la composició d'aminoàcids de la subunitat de la proteïna ADH, hom va efectuar tres proves complementàries:

- hidròlisi àcida a 105°C durant 24, 48 i 72h.
- oxidació de la proteïna seguida d'hidròlisi àcida.
- anàlisi del triptòfan per hidròlisi amb un àcid dèbil.

### Hidròlisi àcida.

Un alíquot de la proteïna obtinguda del procés de purificació, és sotmés a diàlisi exhaustiva enfront d'H<sub>2</sub>O destil·lada. El tractament per a l'anàlisi es troba descrit en el capítol de material i mètodes. Hom consigna en les taules 6.1. a 6.3. els valors obtinguts en les hidròlisis àcides a 105°C durant 24, 48 i 72h. S'han modificat els valors per a aquells aminoàcids que precisen rectificació per possible modificació o destrucció (cas de la treonina i la serina) o per hidròlisi incompleta de l'enllaç peptídic (cas de la valina i l'isoleucina).

### Oxidació amb àcid perfòrmic.

L'oxidació de la proteïna prèvia a la hidròlisi permet l'estimació dels valors de cisteïna com a àcid cisteic, a la vegada que els de la metionina com a la corresponent sulfona o sulfòxid. L'aminoàcid tirosina pot resultar malmés en l'oxidació, per això no se'n consideren els valors (vegeu també taules 6.1. a 6.3.) Les anàlisis amb mostra oxidada sofreixen una hidròlisi de 24h a 105°C.

### Anàlisi del triptòfan.

Per a la quantificació del triptòfan es sotmeté la mostra a hidròlisi feble mitjançant un àcid dèbil, com és el para-toluensulfònic.

|         | 24h.  | 48h.  | 72h.  | Ox <sub>1</sub> . | Ox <sub>2</sub> . | $\bar{x}$ | residus |
|---------|-------|-------|-------|-------------------|-------------------|-----------|---------|
| Asx     | 60.44 | 54.46 | 65.94 | 63.49             | 52.54             | 59.37     | 31.24   |
| Thr     | 35.28 | 29.83 | 33.18 | 33.47             | 28.49             | 35.25     | 18.55   |
| Ser     | 25.46 | 28.65 | 25.24 | 28.05             | 22.60             | 24.80     | 13.05   |
| Glx     | 35.23 | 30.89 | 39.39 | 40.01             | 29.75             | 35.05     | 18.44   |
| Pro     | 16.91 | 15.82 | 18.91 | 18.99             | 15.03             | 17.09     | 8.09    |
| Gly     | 37.11 | 35.24 | 39.20 | 39.36             | 36.02             | 37.38     | 19.67   |
| Ala     | 51.08 | 48.28 | 53.69 | 54.62             | 47.46             | 51.01     | 26.84   |
| Val     | 31.43 | 30.77 | 34.36 | 31.80             | 28.63             | 34.36     | 18.08   |
| Met     | ---   | ---   | 1.13  | ---               | ---               | 1.32      | 0.63    |
| Ile     | 35.50 | 34.97 | 39.86 | 34.02             | 29.17             | 39.86     | 20.97   |
| Leu     | 39.73 | 37.19 | 41.15 | 40.25             | 34.94             | 38.65     | 21.65   |
| Tyr     | 12.22 | 11.19 | 12.12 | ---               | ---               | 11.85     | 6.23    |
| Phe     | 20.71 | 19.28 | 21.39 | 21.04             | 19.00             | 20.28     | 10.67   |
| His     | 6.95  | 6.57  | 7.26  | ---               | ---               | 6.92      | 3.64    |
| Lys     | 32.90 | 34.48 | 37.73 | 32.06             | 34.26             | 34.29     | 18.04   |
| Arg     | 12.75 | 10.74 | 15.43 | 17.35             | 11.33             | 13.52     | 7.11    |
| Cis.AC. | ---   | ---   | ---   | 3.86              | 3.32              | 3.59      | 1.89    |

TAULA 6.1. Anàlisi d'aminoàcids de l'ADH de D.hydei.

|        | 24h.  | 48h. | 72h.  | Ox.   | $\bar{x}$ | Residus |
|--------|-------|------|-------|-------|-----------|---------|
| Asx    | 68.51 | ---  | 64.56 | 67.45 | 66.54     | 29.93   |
| Thr    | 37.34 | ---  | 33.45 | 37.86 | 39.83     | 19.91   |
| Ser    | 32.12 | ---  | 25.56 | 33.55 | 30.41     | 13.27   |
| Glx    | 42.58 | ---  | 37.07 | 42.88 | 40.84     | 17.83   |
| Pro    | 28.21 | ---  | 24.74 | 29.51 | 28.39     | 12.39   |
| Gly    | 47.38 | ---  | 43.24 | 51.07 | 47.23     | 20.62   |
| Ala    | 67.90 | ---  | 57.90 | 66.86 | 64.22     | 20.04   |
| Val    | 41.40 | ---  | 38.71 | 42.34 | 40.82     | 21.90   |
| Met    | 2.70  | ---  | 2.55  | ---   | 2.62      | 1.14    |
| Ile    | 45.85 | ---  | 47.55 | 44.24 | 44.73     | 22.80   |
| Leu    | 47.45 | ---  | 40.43 | 46.79 | 44.89     | 19.60   |
| Tyr    | 16.51 | ---  | 14.46 | ---   | 15.48     | 6.75    |
| Phe    | 23.60 | ---  | 21.70 | 24.80 | 24.30     | 10.21   |
| His    | 8.02  | ---  | 7.27  | 9.93  | 8.41      | 3.67    |
| Lys    | 38.29 | ---  | 26.00 | 44.01 | 36.10     | 15.70   |
| Arg    | 14.62 | ---  | 14.62 | 14.53 | 14.59     | 6.37    |
| CisAc. | ---   | ---  | ---   | 4.73  | 4.73      | 2.15    |

TAULA 6.2. Anàlisi d'aminoàcids de l'ADH de D.hydei.

|        | 24h.  | 48h.  | 72h.  | Ox.   | $\bar{x}$ | residus |
|--------|-------|-------|-------|-------|-----------|---------|
| Asx    | 72.89 | 71.88 | 85.46 | 74.27 | 76.12     | 29.85   |
| Thr    | 38.39 | 37.79 | 44.87 | 39.11 | 44.04     | 17.61   |
| Ser    | 34.87 | 30.23 | 36.61 | 34.42 | 34.03     | 13.34   |
| Glx    | 46.74 | 42.45 | 53.21 | 45.55 | 46.98     | 18.42   |
| Pro    | 33.68 | 28.41 | 34.06 | 28.78 | 31.23     | 12.24   |
| Gly    | 53.35 | 48.16 | 62.01 | 51.76 | 53.82     | 21.10   |
| Ala    | 65.83 | 65.07 | 79.42 | 68.13 | 69.61     | 27.29   |
| Val    | 40.07 | 42.57 | 52.87 | 42.36 | 52.87     | 20.73   |
| Met    | 2.00  | 2.90  | 3.11  | ---   | 2.67      | 1.04    |
| Ile    | 40.37 | 45.21 | 56.01 | 45.40 | 56.02     | 21.96   |
| Leu    | 42.22 | 46.57 | 54.84 | 47.41 | 47.76     | 18.73   |
| Tyr    | 18.42 | 16.29 | 19.59 | ---   | 18.10     | 7.10    |
| Phe    | 26.56 | 24.49 | 18.31 | 24.51 | 26.22     | 10.28   |
| His    | 8.82  | 8.03  | 10.43 | 13.90 | 10.31     | 4.04    |
| Lys    | 37.25 | 27.44 | 31.24 | 48.41 | 36.08     | 14.15   |
| Arg    | 14.95 | 13.47 | 18.16 | 14.38 | 15.24     | 5.97    |
| Cis.Ac | ---   | ---   | ---   | 6.13  | 6.13      | 2.40    |

TAULA 6.3. Anàlisi d'aminoàcids de l'ADH de D.hydei.

|     | <u>nº residus</u> | <u>mostra 1</u>   | <u>mostra 2</u> | <u>mostra 3</u> | <u>mostra 4</u>           |
|-----|-------------------|---|-----------------|-----------------|---------------------------|
| Tyr | 6                 | 4.07  | 1.73            | 1.38            | 1.22                      |
| Phe | 10                | 7.60  | 1.53            | 2.11            | 2.12                      |
| His | 4                 | 3.16  | 1.39            | 1.52            | 1.57                      |
| Trp | ?                 | 2.95  | 1.02            | 1.20            | 0.90                      |
| Lys | 16                | 12.85   | 6.22            | 6.02            | 5.33                      |
| Arg | 6                 | 4.53  | 2.00            | ---             | ---                       |
|     | <hr/>             |   |                 |                 |                           |
|     | 37                |   |                 |                 |                           |
| Trp |                   | 4.05  | 3.58            | 3.63            | 3.60                      |
|     |                   |   |                 |                 | $\bar{x} = 3.71 \pm 0.11$ |
|     |                   | $\text{Divisor} = \frac{\text{Tyr} + \text{Phe} + \text{His} + \text{Lys}}{37}$ |                 |                 |                           |

TAULA 6.4. Anàlisis independents de triptòfan.

TAULA 6.3. VALORS DE LA RESIDUA DE LA ANÀLISIS PER MÈTODE A\*ADP.



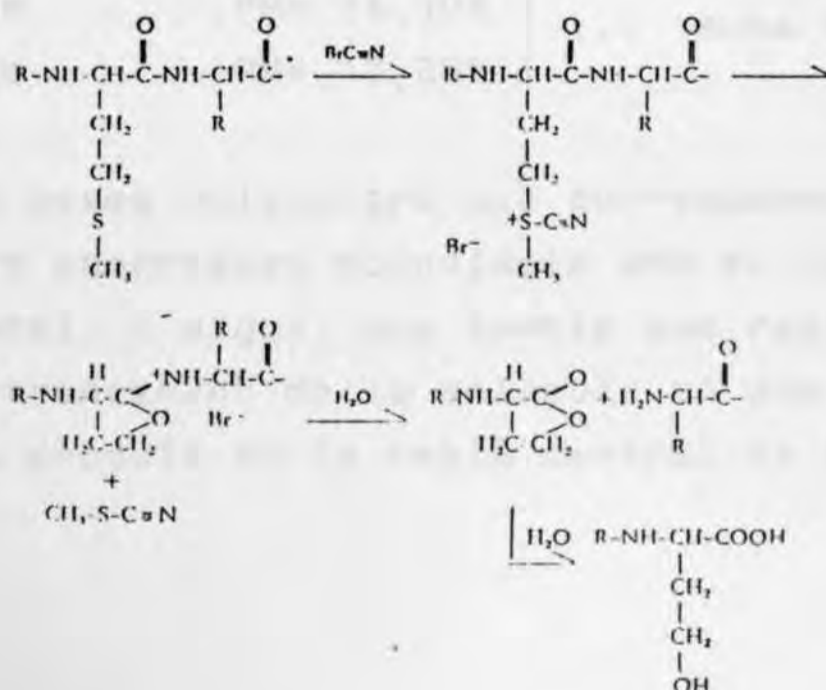
|        | -1-   | -2-   | -3-   | $\bar{x} \pm e$  | residus    |
|--------|-------|-------|-------|------------------|------------|
| Asx    | 31.24 | 29.85 | 29.93 | 30.34 $\pm$ 0.71 | 30         |
| Thr    | 17.61 | 19.91 | 18.55 | 18.69 $\pm$ 1.30 | 19         |
| Ser    | 13.05 | 13.34 | 13.27 | 13.22 $\pm$ 0.13 | 13         |
| Glx    | 18.44 | 18.42 | 17.83 | 18.23 $\pm$ 0.31 | 18         |
| Pro    | 8.99  | 12.24 | 12.39 | 11.20 $\pm$ 1.76 | 11         |
| Gly    | 19.67 | 21.20 | 20.62 | 20.46 $\pm$ 0.66 | 21         |
| Ala    | 26.84 | 27.29 | 28.04 | 27.39 $\pm$ 0.55 | 28         |
| Val    | 18.08 | 20.73 | 21.90 | 20.23 $\pm$ 1.79 | 20         |
| Met    | 0.63  | 1.04  | 1.14  | 0.93 $\pm$ 0.24  | 1          |
| Ile    | 20.97 | 21.96 | 22.80 | 21.91 $\pm$ 0.83 | 22         |
| Leu    | 21.65 | 18.73 | 19.60 | 19.99 $\pm$ 1.38 | 20         |
| Tyr    | 6.23  | 7.10  | 6.75  | 69.69 $\pm$ 0.39 | 6          |
| Phe    | 10.67 | 10.28 | 10.21 | 1.38 $\pm$ 0.22  | 10         |
| His    | 3.64  | 4.04  | 3.67  | 3.78 $\pm$ 0.20  | 4          |
| Lys    | 18.04 | 14.15 | 15.76 | 15.98 $\pm$ 1.79 | 16         |
| Arg    | 7.11  | 5.97  | 6.37  | 6.48 $\pm$ 0.53  | 6          |
| CisAc. | 1.89  | 2.40  | 2.06  | 2.11 $\pm$ 0.23  | 2          |
|        |       |       |       |                  | total= 247 |

TAULA 6.5. Càlcul dels residus de cada aminoàcid per monòmer d'ADH.

La mostra s'introdueix a l'analitzador d'amino-àcids dissolta en medi alcalí (LiOH) i no en HCl com és normal en el sistema de l'autoanalitzador Chromaspeck. Aquesta és l'araó per la qual s'obtenen unes anàlisis amb la zona corresponent als aminoàcids àcids distorsionada, i per tant, s'han de quantificar els nmols de triptòfan en relació amb els aminoàcids propers de la zona bàsica del cromatograma.(taula 6.4)

6.2. DETERMINACIÓ DE METIONINA EN LA MOLÈCULA.

La presència d'un residu de metionina en la subunitat d'ADH de D.hydei mereixia un estudi particular ja que l'esmentat aminoàcid és absent en l'enzim de D.melanogaster, en totes les seves variants. En les hidròlisis àcides sempre s'ha detectat metionina, tal com palesen els resultats de les taules 6.1. a 6.3. Hidròlisis àcides dutes a terme a 105°C, durant 108h a un nivell de buit molt inferior a 10<sup>-1</sup> torrs, varen donar sempre resultats concordants amb la presència d'un residu en la molècula. Malgrat aixó no es va poder detectar mai la presència de metionina sulfona o sulfòxid en les mostres oxidades, per problemes de resolució en el cromatograma, per aixó hom va procedir a la digestió amb bromur de cianógen, un reactiu que trença específicament la cadena polipeptídica pels residus metionina, segons la reacció:



L'especificitat de la digestió amb BrCN depèn del pH al qual es realitza la prova. A pH alcalí, el BrCN reaccionarà amb els grups bàsics de les proteïnes, mentre que a pH neutre o àcid, la reacció només implica els residus cisteïna o metionina. Aquest fet obliga a la carboximetilació de la proteïna per bloquejar la reactivitat dels grups sulfhidril i provocar una reacció exclusiva amb la metionina. La prova es du a terme doncs, a pH àcids i a temperatura ambient, de manera que l'exposició de tota la molècula a l'acció del reactiu quedi assegurada per la utilització de proteïna carboximetilada. La concentració de BrCN ha d'excedir més de 500 vegades la de la proteïna: en el nostre cas 0.04 mols de proteïna ( en solució d'1mg/ml en àcid fòrmic al 70%) varen ésser digerits amb 0.02mMols de BrCN (2mg/ml). La reacció es mantenia sempre en atmosfera reductora de  $N_2$ , i es deixava transcórrer durant 24h. Una vegada acabat el tractament, la mostra era liofilitzada i redissolta directament en tampó de mostra per a electroforesi en acrilamida-SDS, en gels amb gradient de 13 a 27% d'acrilamida. El resultat d'aquesta prova va indicar que només una part de la mostra havia estat degradada: per densitometria de bandes tenyides amb Coomassie Blue en el gel, es va obtenir el valor d'un 15% de digestió front un 85% de proteïna no digerida. L'anàlisi de la distància de migració d'aquestes bandes va proporcionar els valors següents:

|          |            |                   |
|----------|------------|-------------------|
| x= 9.7cm | PM= 27,593 | ... subunitat ADH |
| x=13.5cm | PM= 14,105 | ... suma = 27.364 |
| x=14.9cm | PM= 13,295 |                   |

La suma dels pesos moleculars que corresponen a les bandes inferiors observades coincideix amb el valor de la subunitat total, o sigui, que sembla que realment hi hagi hagut un trencament de la molècula en dos fragments, que s'hauria produït en la regió central de la cadena peptídica.

### 6.3. DETERMINACIÓ DE L'EXTREM N-TERMINAL.

Una quantitat aproximada a 10 nmols de proteïna es va sotmetre a marcatge amb clorur de dansil i posterior hidròlisi àcida. La mostra era aplicada a plaques de poliamida de 5x5cm i analitzada en un sistema de cromatografia bidimensional. El resultat va ésser la no detecció de cap aminoàcid amb grup amino-terminal lliure, fet que afegeix l'ADH de D.hydei al gran grup de proteïnes eucariotes amb un N-terminal bloquejat. En totes les mostres analitzades només es varen detectar els punts corresponents a la O-tirosina i els aminoàcids bàsics, ja que tots ells reaccionen amb el clorur de dansil per grups laterals.

### 6.4. DETERMINACIÓ DE L'EXTREM C-TERMINAL.

Les anàlisis es varen dur a terme mitjançant la metodologia indicada en el capítol de material i mètodes. Els resultats obtinguts es mostren en la figura 6.1. i a partir d'aquí es pot assegurar la presència de 5 aminoàcids concrets en l'extrem carboxi-terminal de la molècula: isoleucina, glicina, serina, alanina i leucina. Evidentment, l'últim aminoàcid és isoleucina. La posició anterior pot estar ocupada per una glicina o serina, i l'anterior a aquesta per una alanina o leucina. L'aproximament dels valors de nivells d'aminoàcid alliberats per carboxipeptidasa A no permet una afirmació categòrica sobre quin és cada aminoàcid en cada cas. En la discussió es considerarà aquesta composició del C-terminal en relació a d'altres espècies de Drosophila de composició coneguda.

## 6.5. CARBOXINFTETILACID

nmols AA lliberat

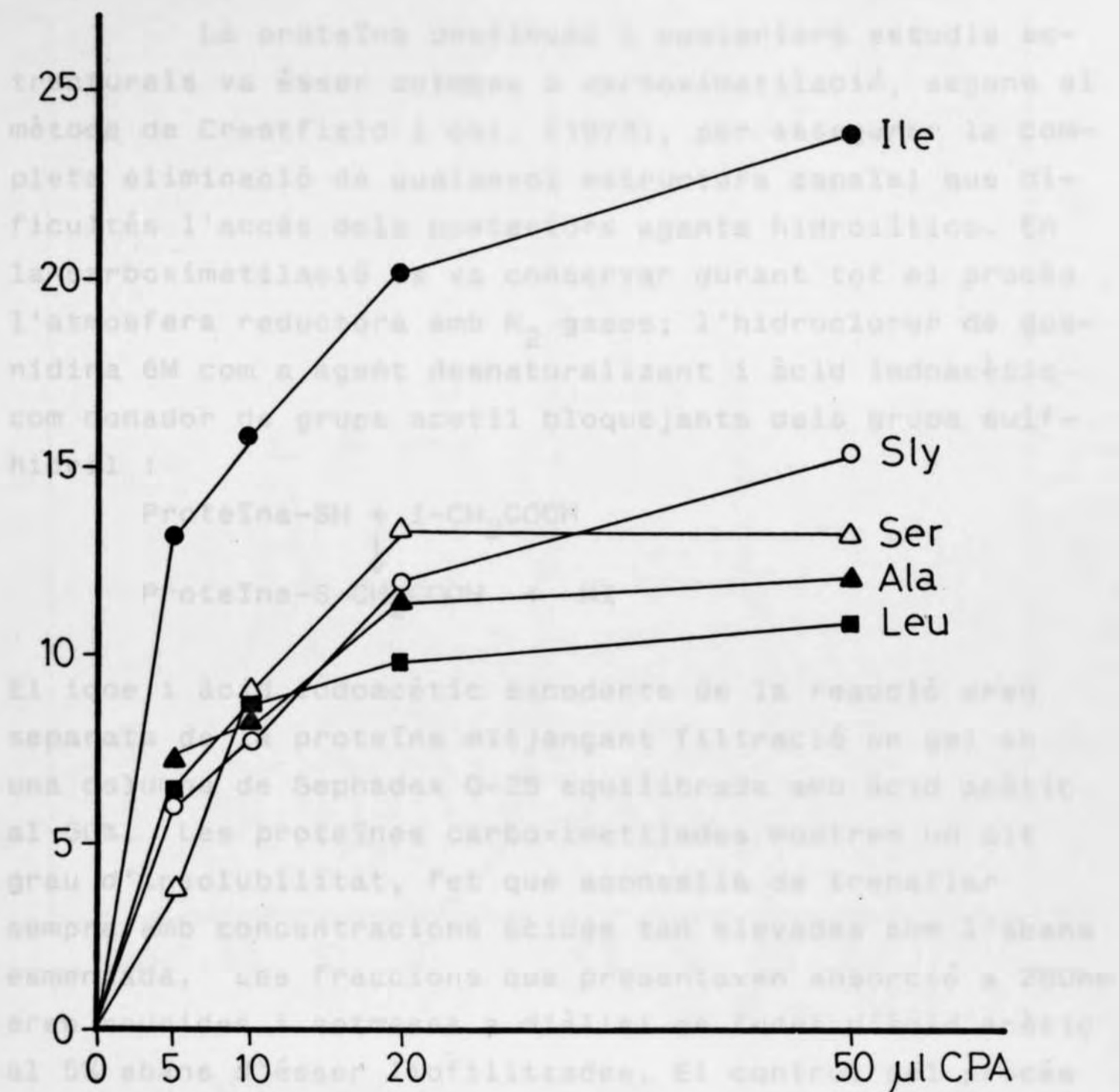
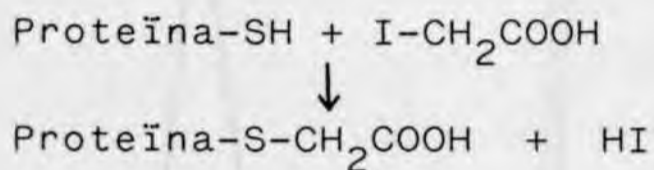


FIGURA 6.1. Determinació de l'extrem C-terminal de la molècula d'ADH de D.hydei, per digestió amb Carboxipeptidasa A (CPA).

## 6.5. CARBOXIMETILACIÓ.

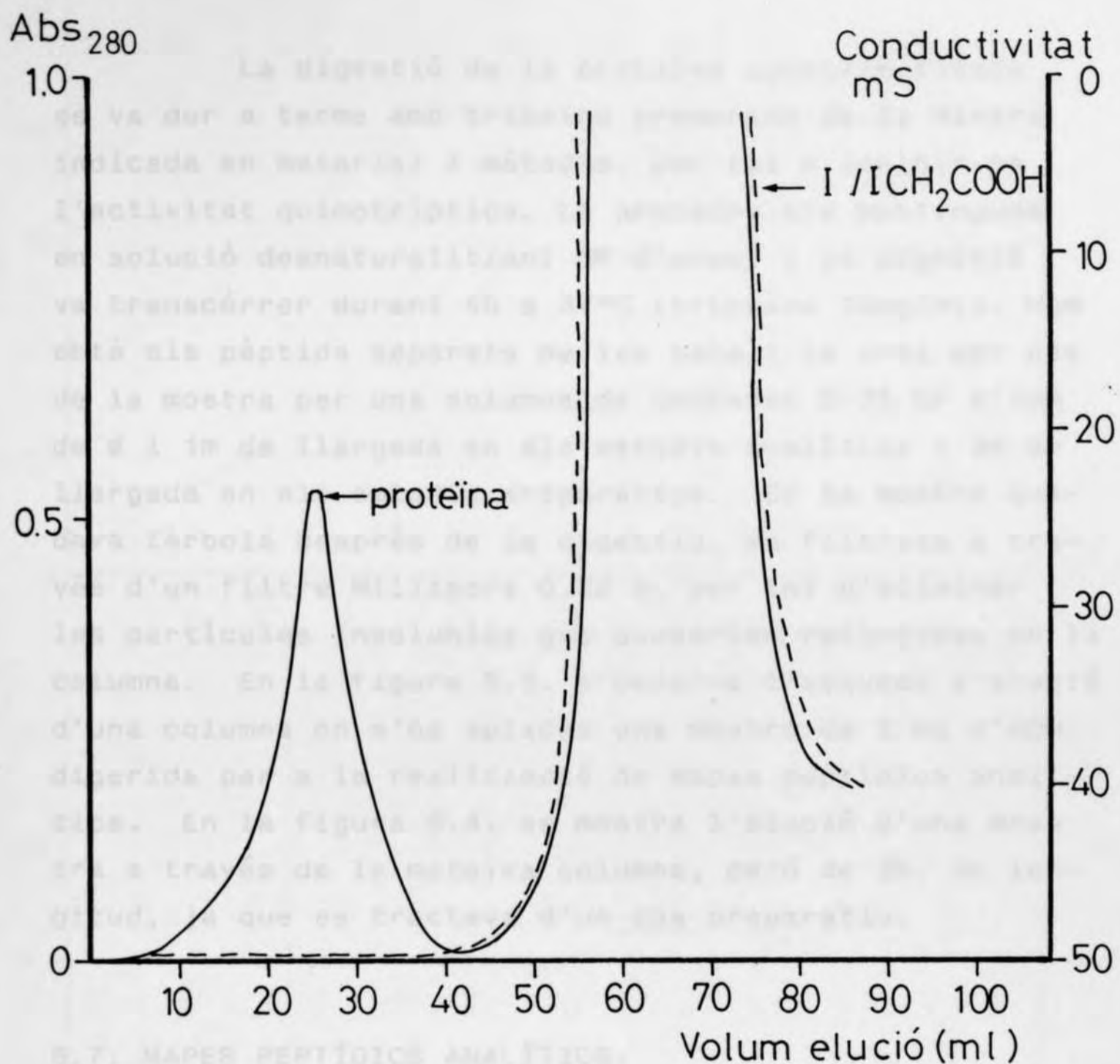
La proteïna destinada a posteriors estudis estructurals va ésser sotmesa a carboximetilació, segons el mètode de Crestfield i col. (1973), per assegurar la completa eliminació de qualsevol estructura espacial que dificultés l'accés dels posteriors agents hidrolítics. En la carboximetilació es va conservar durant tot el procés l'atmosfera reductora amb  $N_2$  gasos; l'hidroclorur de guanidina 6M com a agent desnaturalizant i àcid iodoacètic com donador de grups acetil bloquejants dels grups sulfhidril :



El iode i àcid iodoacètic excedents de la reacció eren separats de la proteïna mitjançant filtració en gel en una columna de Sephadex G-25 equilibrada amb àcid acètic al 50%. Les proteïnes carboximetilades mostren un alt grau d'insolubilitat, fet que aconsella de treballar sempre amb concentracions àcides tan elevades com l'abans esmentada. Les fraccions que presentaven absorció a 280nm eren reunides i sotmeses a diàlisi en front d'àcid acètic al 5% abans d'ésser liofilitzades. El control del procés s'efectuava mitjançant anàlisi d'aminoàcids de la proteïna carboximetilada i detecció de dos residus cisteïna com a carboximetilcisteïna. En algunes proves, el resultat de la carboximetilació semblava no exhaustiu, fet que concorda amb el coneixement d'un nucli de difícil accés en l'estructura terciària de l'enzim de D.melanogaster, i, per tant, de difícil desnaturalització.

Vegeu la figura 6.2., com a exemplificació de l'elució d'una columna de Sephadex G-25 on s'ha introduït la mescla de carboximetilació.

Columna SEPHADEX



— absorbància 280 nm

---- conductivitat

Elució de la proteïna ADH de D.hydei després de la carboximetilació

FIGURA 6.2.

## 6.6. DIGESTIÓ TRÍPTICA.

La digestió de la proteïna carboximetilada es va dur a terme amb tripsina preparada de la manera indicada en material i mètodes, per tal d'inhibir-ne l'activitat quimotríptica. La proteïna era mantinguda en solució desnaturalitzant 8M d'urea, i la digestió va transcórrer durant 4h a 37°C (tripsina 10mg/ml). Hom obté els pèptids separats de les sals i la urea per pas de la mostra per una columna de Sephadex G-25 SF d'1cm de  $\varnothing$  i 1m de llargada en els estudis analítics i 3m de llargada en els estudis preparatius. Si la mostra quedava tèrbola després de la digestió, es filtrava a través d'un filtre Millipore 0.22  $\mu$ m, per tal d'eliminar les partícules insolubles que quedarien retingudes en la columna. En la figura 6.3. s'observa l'esquema d'elució d'una columna on s'ha aplicat una mostra de 5 mg d'ADH digerida per a la realització de mapes peptídics analítics. En la figura 6.4. es mostra l'elució d'una mostra a través de la mateixa columna, però de 3m. de longitud, ja que es tractava d'un cas preparatiu.

## 6.7. MAPES PEPTÍDICS ANALÍTICS.

Per a la confecció dels mapes peptídics analítics del digerit tríptic de la proteïna, es reunien les fraccions de l'elució de la columna de Sephadex G-25 que mostraven absorbància a 280nm i es liofilitzaven. La mostra era després redissolta en piridina al 50% i aplicada directament sobre un paper Whatman 3MM. Els standards que es varen utilitzar en aquestes proves era l'anomenat "wondermix" i l'Orange G. Els mapes peptídics, tal i com s'ha explicat anteriorment, varen seguir l'esquema següent:



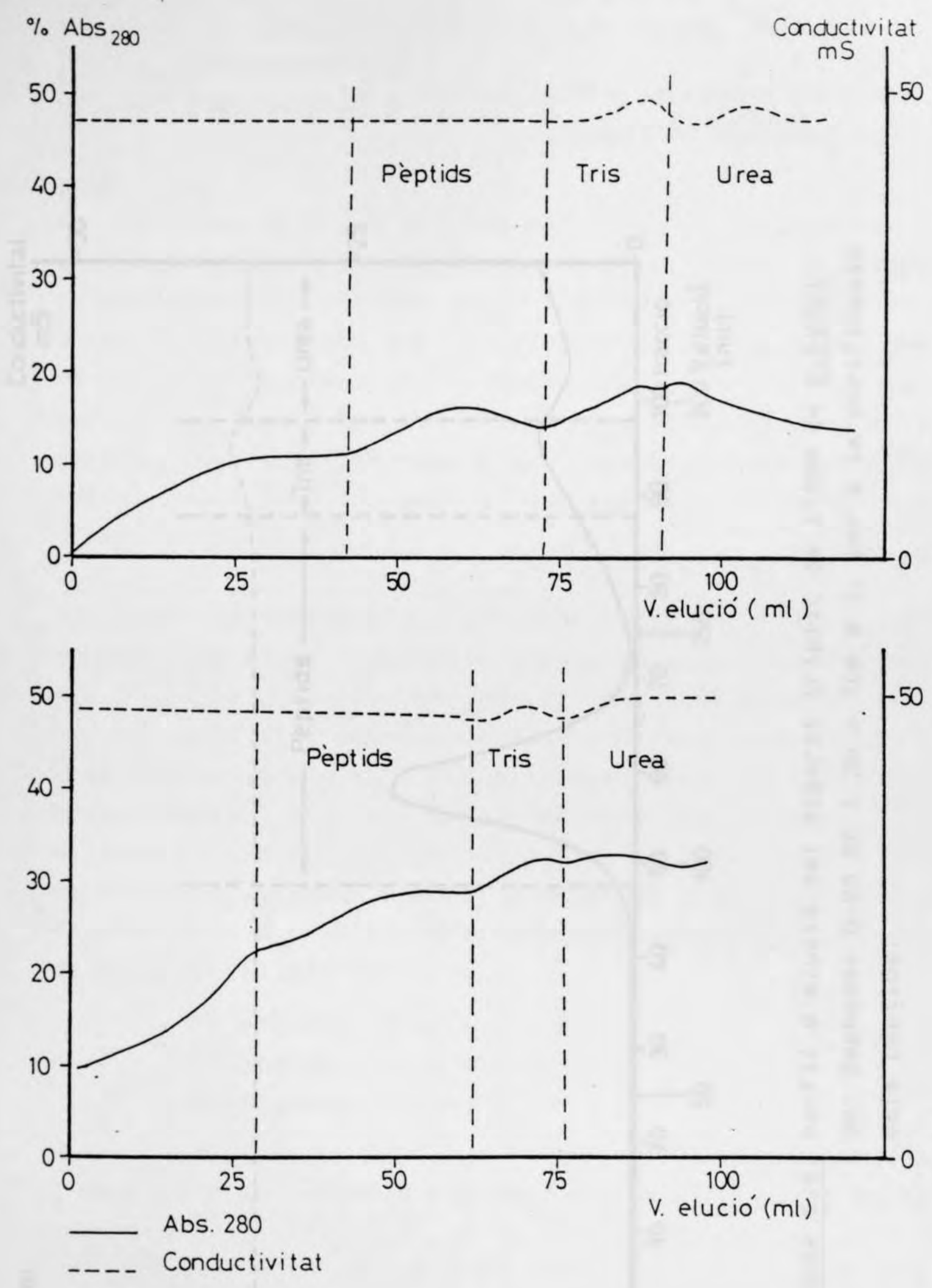


FIGURA 6.3. Perfil d'elució del digerit triptíc d'1mg d'ADH de D.hydei per Sephadex G-25 SF, per a la realització dels mapes analítics.

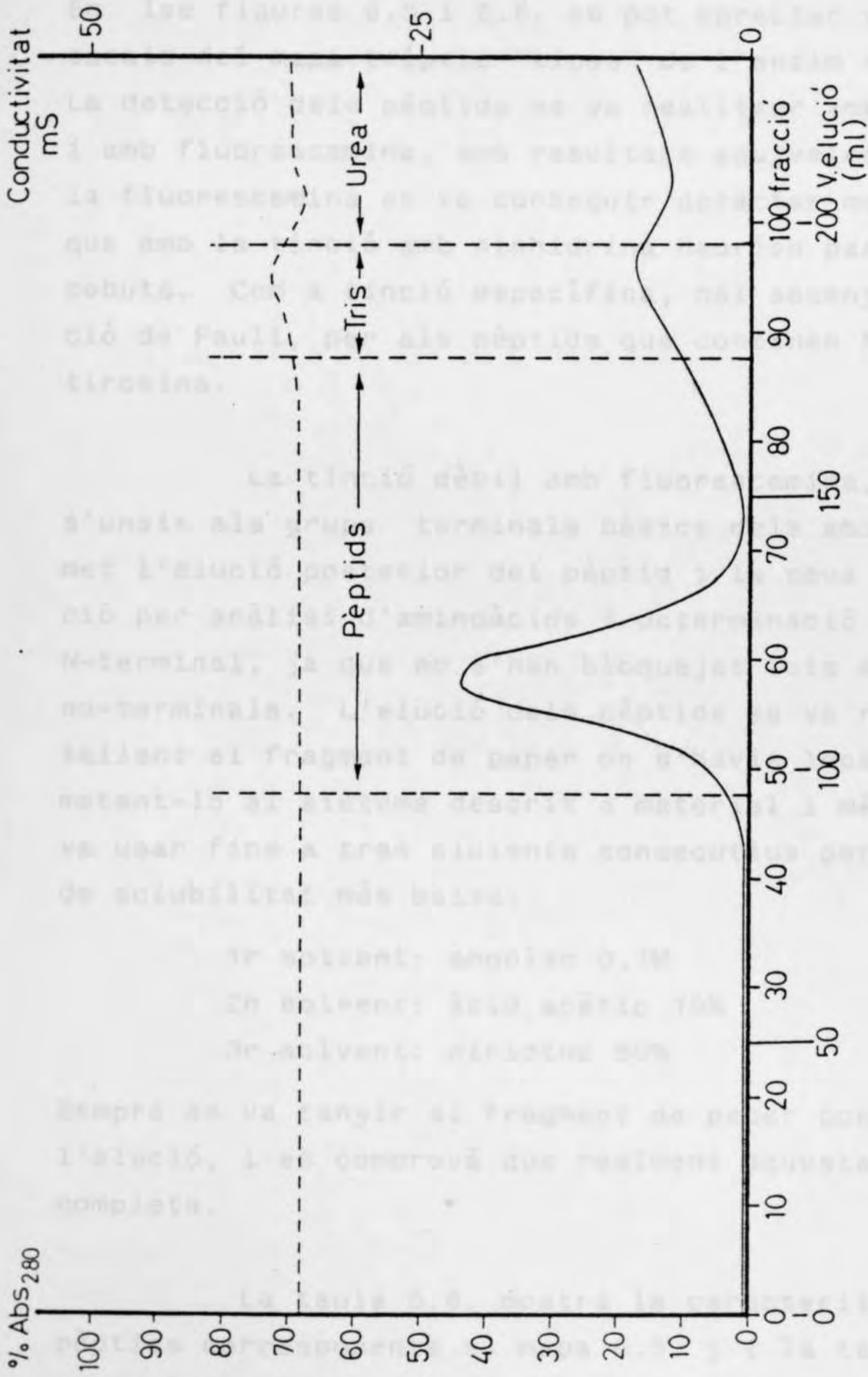


FIGURA 6.4. Perfil d'elució del digerit triptic de l'ADH de D. hydei per Sephedex G-25 SF ( 3m x 1cm  $\phi$  ), per a la purificació dels pèptids.

- 1ª dimensió : electroforesi 3000V, pH 6.5  
 2ª dimensió :  
 3ª dimensió : cromatografia ascendent 35:35:30  
                   alc.isoamílic:piridina:H<sub>2</sub>O

En les figures 6.5 i 6.6. es pot apreciar un esquema a escala del mapa tríptic "tipus" de l'enzim ADH de D.hydei. La detecció dels pèptids es va realitzar amb ninhidrina i amb fluoescamina, amb resultats equivalent, si bé amb la fluoescamina es va aconseguir detectar molts pèptids que amb la tinció amb ninhidrina haurien passat desapercibuts. Com a tinció específica, cal assenyalar la tinció de Pauli, per als pèptids que contenen histidina o tirosina.

La tinció dèbil amb fluoescamina, reactiu que s'uneix als grups terminals bàsics dels aminoàcids, permet l'elució posterior del pèptid i la seva caracterització per anàlisi d'aminoàcids i determinació del residu N-terminal, ja que no s'han bloquejat tots els grups amino-terminals. L'elució dels pèptids es va realitzar retallant el fragment de paper on s'havia localitzat i sotmetent-lo al sistema descrit a material i mètodes. Hom va usar fins a tres eluents consecutius per als pèptids de solubilitat més baixa:

- 1r solvent: amoníac 0.1M  
 2n solvent: àcid acètic 10%  
 3r solvent: piridina 50%

Sempre es va tenyir el fragment de paper posteriorment a l'elució, i es comprovà que realment aquesta havia estat completa.

La taula 6.6. mostra la caracterització dels pèptids corresponents al mapa 6.5. ; i la taula 6.7. la dels pèptids del mapa 6.6. Ambdós mapes, elaborats a partir de mostres diferents, que provenien a més a més de diferents purificacions, mostren on pot arribar el grau de resolució d'aquesta tècnica.

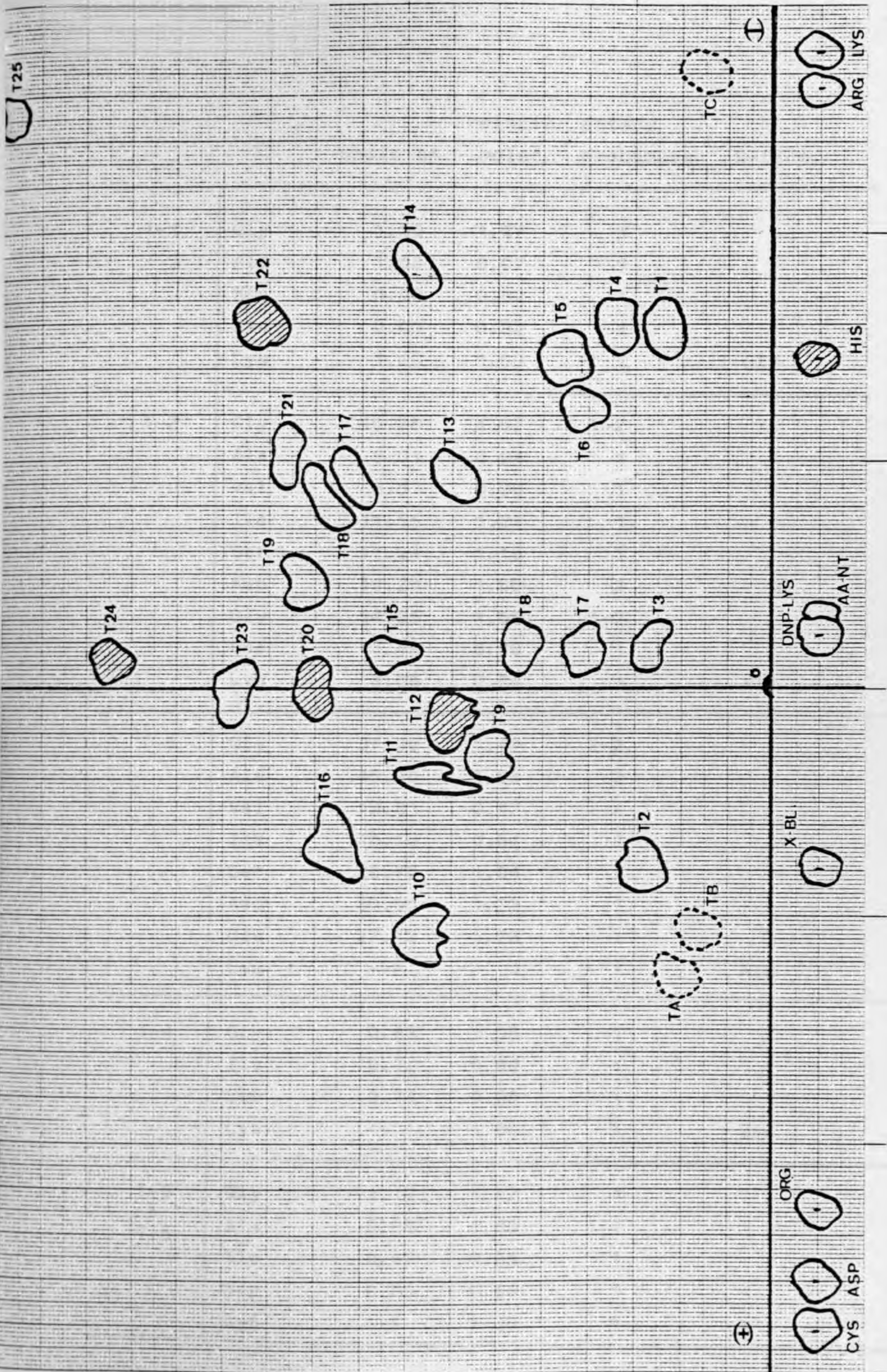


FIGURA 6.5. Mapa triptic analític de l'ADH de *D. hydei*. Tinció amb fluorescamina i tinció de Pauli (pèptids ratllats). Escala 1:1.33

|                 |     |          | relació | enters    |         |
|-----------------|-----|----------|---------|-----------|---------|
|                 |     | nmols AA | molar   | probables | N-term. |
| T-1             | Gly | 1.50     | 1.37    | 1         |         |
|                 | Ala | 1.06     | 0.97    | 1         |         |
|                 | Ser | 0.90     | 0.82    | 1         |         |
|                 | Glu | 0.90     | 0.82    | 1         |         |
|                 | Lys | 1.00     | 1.00    | 1         | Gly     |
| T-2             | Gly | 16.76    | 1.67    | 1-2       |         |
|                 | Ala | 9.01     | 0.94    | 1         |         |
|                 | Val | 8.51     | 0.89    | 1         |         |
|                 | Ile | 11.56    | 1.21    | 1         |         |
|                 | Ser | 11.04    | 1.15    | 1         |         |
|                 | Asp | 19.29    | 1.99    | 2         |         |
|                 | Glu | 14.85    | 1.55    | 1-2       |         |
|                 | Phe | 7.48     | 0.78    | 1         |         |
|                 | Lys | 8.06     | 0.84    | 1         | Ala     |
| T-3             | Gly | 37.99    | 1.47    | 1-2       |         |
|                 | Ala | 46.20    | 1.84    | 2         |         |
|                 | Val | 12.81    | 0.47    | -         |         |
|                 | Ile | 16.10    | 0.64    | 1         |         |
|                 | Ser | 26.76    | 1.04    | 1         |         |
|                 | Asp | 30.95    | 1.23    | 1         |         |
|                 | Glu | 27.12    | 1.08    | 1         |         |
|                 | Lys | ---      | 1       | 1         | Ala     |
| T-4             | Gly | 0.83     | 1.08    | 1         |         |
|                 | Ile | 0.72     | 0.94    | 1         |         |
|                 | Ser | 0.74     | 0.96    | 1         |         |
|                 | Lys | ---      | 1.00    | 1         | Ser     |
| T-5<br>+<br>T-6 | Gly | 1.12     | 1.42    | 1         |         |
|                 | Ala | 0.85     | 1.08    | 1         |         |
|                 | Ile | 0.67     | 0.85    | 1         |         |
|                 | Asp | 0.50     | 0.64    | 1         |         |
|                 | Lys | ---      | 1.00    | 1         | ---     |

|      |     |       |      |     |     |
|------|-----|-------|------|-----|-----|
| T-7  | Gly | 38.49 | 3.65 | 3   |     |
|      | Ala | 30.72 | 2.85 | 3   |     |
|      | Val | 10.82 | 1.02 | 1   |     |
|      | Leu | 11.92 | 1.13 | 1   |     |
|      | Ile | 12.47 | 1.17 | 1   |     |
|      | Ser | 37.07 | 3.51 | 3-4 |     |
|      | Thr | 10.24 | 0.97 | 1   |     |
|      | Asp | 10.84 | 1.91 | 2   |     |
|      | Glu | 20.50 | 1.94 | 2   |     |
|      | Lys | 11.50 | 1.09 | 1   | Thr |
| T-9  | Ala | 75.99 | 2.45 | 2-3 |     |
|      | Leu | 25.78 | 0.83 | 1   |     |
|      | Ile | 37.39 | 1.20 | 1   |     |
|      | Asp | 45.79 | 1.45 | 1-2 |     |
|      | Glu | 35.69 | 1.12 | 1   |     |
|      | Pro | 29.78 | 0.96 | 1   |     |
|      | Lys | 36.47 | 1.16 | 1   | Ile |
| T-10 | Gly | 25.03 | 1.84 | 2   |     |
|      | Ala | 15.20 | 1.12 | 1   |     |
|      | Val | 9.60  | 0.70 | 1   |     |
|      | Leu | 16.73 | 1.20 | 1   |     |
|      | Ile | 18.46 | 1.35 | 1   |     |
|      | Ser | 12.27 | 0.90 | 1   |     |
|      | Asp | 27.55 | 2.02 | 2   |     |
|      | Glu | 25.97 | 1.91 | 2   |     |
|      | Arg | 14.77 | 1.08 | 1   | --- |
| T-11 | Gly | 10.58 | 1.07 | 1   |     |
|      | Ala | 23.22 | 2.35 | 2   |     |
|      | Leu | 9.18  | 0.93 | 1   |     |
|      | Ile | 11.54 | 1.17 | 1   |     |
|      | Asp | 15.58 | 1.58 | 1-2 |     |
|      | Glu | 11.91 | 1.20 | 1   |     |
|      | Pro | 8.79  | 0.89 | 1   |     |
|      | Lys | 7.09  | 0.72 | 1   | Ile |

|      |      |        |       |      |         |
|------|------|--------|-------|------|---------|
| T-12 | Gly  | 34.31  | 1.32  | 1    |         |
|      | Ala  | 78.61  | 3.02  | 3    |         |
|      | Val  | 52.56  | 2.02  | 2    |         |
|      | Leu  | 113.06 | 4.35  | 4    |         |
|      | Ser  | 14.88  | 0.57  | 1(?) |         |
|      | Thr  | 74.23  | 2.85  | 3    |         |
|      | Asp  | 54.35  | 2.09  | 2    |         |
|      | Glu  | 121.66 | 4.65  | 4-5  |         |
|      | T-17 | Phe    | 21.48 | 0.82 | 1       |
| Pro  |      | 27.04  | 1.04  | 1    |         |
| His  |      | 14.51  | 0.56  | 1    |         |
| Lys  |      | 23.30  | 0.89  | 1    | Pro-Gly |
| T-13 | Gly  | 11.86  | 1.92  | 2    |         |
|      | Ser  | 11.89  | 1.93  | 2    |         |
| T-18 | Ala  | 6.99   | 1.13  | 1    | Ser     |
| T-14 | Leu  | 1.00   | 0.88  | 1    |         |
|      | Lys  | 1.28   | 1.13  | 1    | Leu     |
| T-15 | Gly  | 51.88  | 2.85  | 3    |         |
|      | Ala  | 37.96  | 2.07  | 2    |         |
|      | Val  | 24.46  | 1.34  | 1    |         |
|      | Leu  | 32.45  | 1.79  | 2    |         |
|      | Ile  | 23.82  | 1.28  | 1    |         |
|      | Ser  | 37.96  | 2.07  | 2    |         |
|      | Thr  | 26.01  | 1.45  | 1    |         |
|      | Asp  | 37.98  | 2.07  | 2    |         |
|      | Glu  | 28.78  | 1.56  | 1    |         |
|      | Phe  | 8.10   | 0.45  | 1(?) |         |
|      | Tyr  | 9.22   | 0.51  | 1(?) |         |
|      | Pro  | 16.97  | 0.94  | 1    |         |
|      | Lys  | 15.83  | 0.88  | 1    | Ala     |

|              |     |        |      |     |     |
|--------------|-----|--------|------|-----|-----|
| T-16<br>T-21 | Gly | 36.17  | 2.36 | 2   |     |
|              | Ala | 27.86  | 1.81 | 2   |     |
|              | Val | 64.48  | 4.18 | 4   |     |
|              | Ile | 57.07  | 3.70 | 4   |     |
|              | Thr | 15.88  | 1.03 | 1   |     |
|              | Asp | 79.49  | 5.13 | 5   |     |
|              | Glu | 42.15  | 2.72 | 3   |     |
|              | Tyr | 14.90  | 0.96 | 1   |     |
| T-22         | Arg | ---    | ---  | 1   | --- |
| T-17<br>T-23 | Ala | 16.59  | 1.11 | 1   |     |
|              | Ile | 23.47  | 1.57 | 2   |     |
|              | Ser | 13.59  | 0.91 | 1   |     |
|              | Thr | 12.82  | 0.86 | 1   |     |
|              | Asp | 15.32  | 1.02 | 1   |     |
|              | Lys | 15.31  | 1.02 | 1   | Thr |
| T-18<br>T-24 | Gly | 14.83  | 0.80 | 1   |     |
|              | Ala | 48.98  | 2.66 | 3   |     |
|              | Leu | 20.76  | 1.12 | 1   |     |
|              | Ser | 29.07  | 1.57 | 1-2 |     |
|              | Thr | 17.05  | 0.92 | 1   |     |
|              | Asp | 19.32  | 1.04 | 1   |     |
|              | Phe | 11.39  | 0.61 | 1   |     |
|              | Lys | 18.84  | 1.02 | 1   | Val |
| T-20         | Gly | 72.94  |      |     |     |
|              | Ala | 64.46  |      |     |     |
|              | Val | 133.69 |      |     |     |
|              | Leu | 38.26  |      |     |     |
|              | Ile | 59.60  |      |     |     |
|              | Ser | 74.63  |      |     |     |
|              | Thr | 119.70 |      |     |     |
|              | Asp | 62.48  |      |     |     |
|              | Glu | 50.19  |      |     |     |
|              | Phe | 34.38  |      |     |     |
|              | Tyr | 39.56  |      |     |     |
|              | Pro | 39.06  |      |     |     |
|              | Lys | 31.69  |      |     |     |
|              | Arg | 19.50  |      |     | Pro |



|      |     |       |      |     |         |
|------|-----|-------|------|-----|---------|
| T-21 | Gly | 9.05  | 1.05 | 1   |         |
|      | Ala | 14.10 | 1.64 | 1-2 |         |
|      | Leu | 7.79  | 0.90 | 1   |         |
|      | Ser | 10.33 | 1.20 | 1   |         |
|      | Asp | 8.87  | 1.03 | 1   |         |
|      | Lys | 8.91  | 1.03 | 1   | Ala-Ser |
| T-22 | Val | 5.58  | 1.26 | 1   |         |
|      | Leu | 6.67  | 1.50 | 1   |         |
|      | Thr | 9.05  | 2.03 | 2   |         |
|      | Lys | ---   | ---  | 1   |         |
|      | His | 3.27  | 0.74 | 1   | Thr     |
| T-23 | Gly | 22.22 | 1.65 | 1   |         |
|      | Ala | 15.70 | 1.16 | 1   |         |
|      | Leu | 11.66 | 0.86 | 1   |         |
|      | Ser | 13.30 | 0.99 | 1   |         |
|      | Asp | 11.25 | 0.83 | 1   |         |
|      | Lys | 15.61 | 1.16 | 1   | ---     |
| T-24 | Gly | 16.09 | 1.02 | 1   |         |
|      | Ala | 17.31 | 1.09 | 1   |         |
|      | Val | 11.02 | 0.70 | 1   |         |
|      | Thr | 12.12 | 0.77 | 1   |         |
|      | Pro | 10.83 | 0.65 | 1   |         |
|      | Lys | 15.39 | 0.97 | 1   | Tyr(?)  |

TAULA 6.6. Anàlisi d'aminoàcids i N-terminal detectats en els pèptids eluits del mapa 6.5. En els casos dels pèptids on s'ha detectat lisina i arginina, ja no s'han calculat les relacions molars.

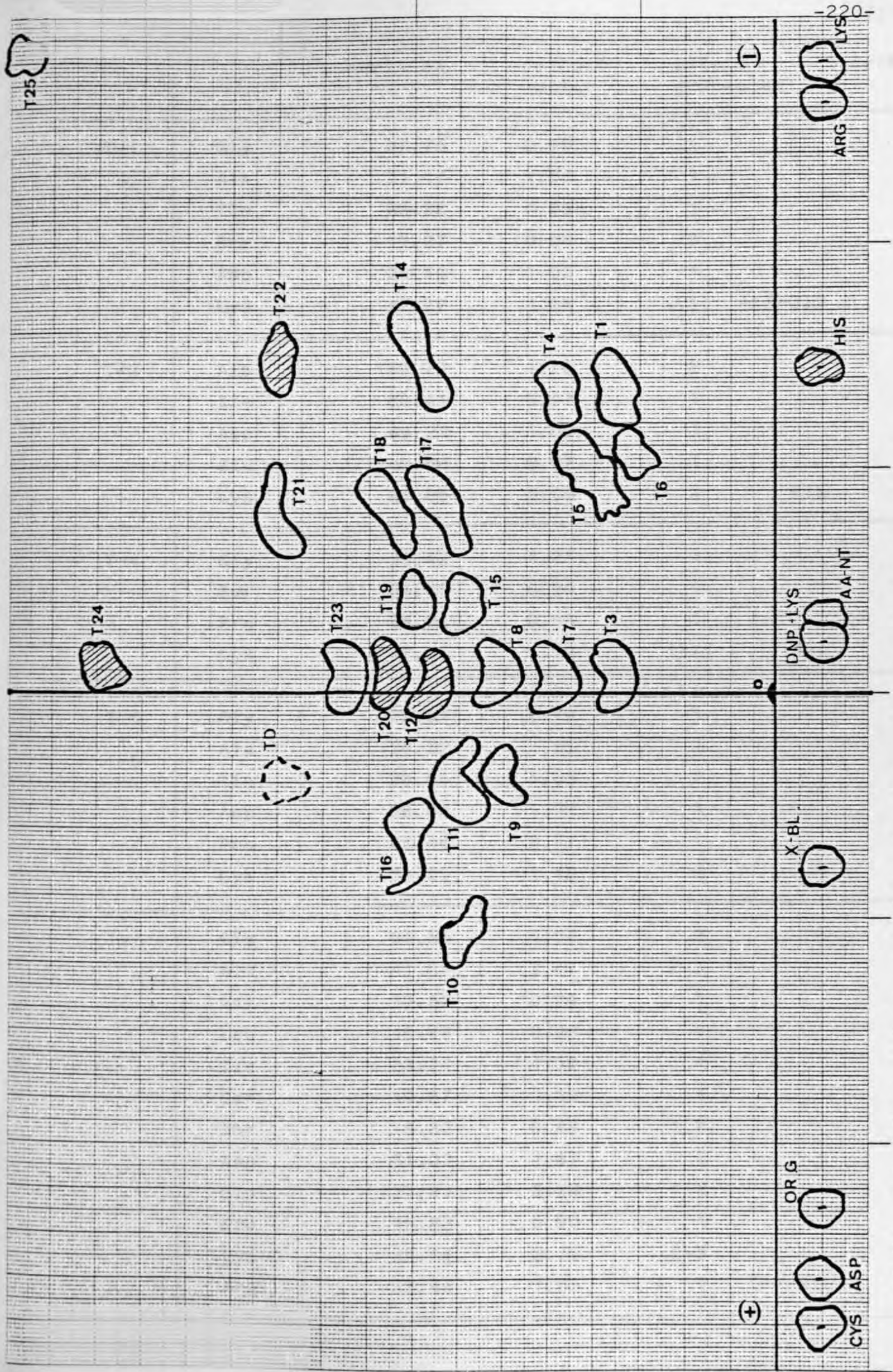


FIGURA 6.6. Mapa triptico analítico de l'ADH de *D. hydei*. Escala 1:1.33.

|                 |     | nmols AA | relació<br>molar | enters<br>probables | N-term  |
|-----------------|-----|----------|------------------|---------------------|---------|
| T-1             | Gly | 27.76    | 0.96             | 1                   |         |
|                 | Ala | 31.17    | 1.08             | 1                   |         |
|                 | Ile | 25.58    | 0.89             | 1                   |         |
|                 | Ser | 17.27    | 0.60             | 1                   |         |
|                 | Asp | 30.10    | 1.05             | 1                   |         |
|                 | Lys | 47.27    | 1.64             | 1(?)                | Ala-Gly |
| T-3             | Ala | 159.72   | 1.76             | 2                   |         |
|                 | Ile | 88.41    | 0.97             | 1                   |         |
|                 | Asp | 99.21    | 1.09             | 1                   |         |
|                 | Glu | 88.68    | 0.97             | 1                   |         |
|                 | Lys | 86.89    | 0.95             | 1                   | Ala     |
| T-4             | Gly | 33.42    | 1.21             | 1                   |         |
|                 | Ser | 24.80    | 0.90             | 1                   |         |
|                 | Pro | 24.25    | 0.88             | 1                   |         |
|                 | Lys | 47.02    | 1.70             | 1(?)                | Ser     |
| T-5<br>+<br>T-6 | Gly | 22.81    | 0.79             | 1                   |         |
|                 | Ala | 36.22    | 1.25             | 1                   |         |
|                 | Ile | 29.95    | 1.03             | 1                   |         |
|                 | Asp | 38.03    | 1.31             | 1                   |         |
|                 | Pro | 22.49    | 0.77             | 1                   |         |
|                 | Lys | 34.25    | 1.18             | 1                   | ---     |
| T-7             | Gly | 34.36    | 2.07             | 2                   |         |
|                 | Ala | 41.61    | 2.47             | 2-3                 |         |
|                 | Val | 15.62    | 0.94             | 1                   |         |
|                 | Leu | 15.47    | 0.93             | 1                   |         |
|                 | Ile | 23.24    | 1.39             | 1                   |         |
|                 | Ser | 19.87    | 1.19             | 1                   |         |
|                 | Thr | 8.32     | 0.48             | 1(?)                |         |
|                 | Asp | 31.03    | 1.87             | 2                   |         |
|                 | Glu | 37.91    | 2.29             | 2                   |         |
|                 | Pro | 15.83    | 0.90             | 1                   |         |
|                 | Lys | 45.54    | 2.72             | 2-3                 |         |
|                 | Arg | 17.46    | 1.05             | 1                   | Thr-Glu |

|      |     |        |      |      |     |
|------|-----|--------|------|------|-----|
| T-8  | Ile | 52.12  | 0.76 | 1    |     |
|      | Glu | 74.68  | 1.08 | 1    |     |
|      | Lys | 79.80  | 1.15 | 1    | Glu |
| T-9  | Gly | 20.73  | 0.99 | 1    |     |
|      | Ala | 19.43  | 0.93 | 1    |     |
|      | Leu | 19.50  | 0.93 | 1    |     |
|      | Ile | 10.27  | 0.49 | 1(?) |     |
|      | Asp | 31.24  | 1.50 | 1-2  |     |
|      | Glu | 30.09  | 1.40 | 1    |     |
|      | Pro | ?      | ?    | ?    |     |
|      | Lys | 22.18  | 1.05 | 1    | Ile |
| T-10 | Gly | 38.55  | 1.72 | 2    |     |
|      | Ala | 28.75  | 1.28 | 1    |     |
|      | Val | 18.86  | 0.83 | 1    |     |
|      | Leu | 43.03  | 1.92 | 2    |     |
|      | Ile | 42.69  | 1.90 | 2    |     |
|      | Asp | 63.52  | 2.83 | 3    |     |
|      | Glu | 46.65  | 2.08 | 2    |     |
|      | Arg | 20.52  | 0.91 | 1    | --- |
| T-11 | Ala | 209.40 | 1.70 | 2    |     |
|      | Leu | 104.82 | 0.85 | 1    |     |
|      | Ile | 144.33 | 1.17 | 1    |     |
|      | Asp | 166.72 | 1.36 | 1-2  |     |
|      | Glu | 106.08 | 0.86 | 1    |     |
|      | Lys | 157.93 | 1.28 | 1    | Ile |
| T-14 | Leu | 43.88  | 1.00 | 1    |     |
|      | Lys | 43.22  | 0.99 | 1    | Leu |
| T-15 | Gly | 43.88  | ---  | -    |     |
|      | Ala | 221.25 | 2.71 | 3    |     |
|      | Leu | 124.83 | 1.53 | 1-2  |     |
|      | Ser | 135.69 | 1.65 | 2    |     |
|      | Thr | 83.69  | 1.03 | 1    |     |
|      | Asp | 107.19 | 1.31 | 1    |     |
|      | Phe | 72.25  | 0.88 | 1    |     |
|      | Tyr | ?      | ?    | ?    |     |

|      |     |        |      |     |         |
|------|-----|--------|------|-----|---------|
| T-15 | Pro | 28.93  | ?    | ?   |         |
|      | Lys | 88.37  | 1.08 | 1   | Ala     |
| T-16 | Gly | 99.53  | 2.18 | 2   |         |
|      | Ala | 79.34  | 1.74 | 2   |         |
|      | Val | 43.86  | 0.96 | 1   |         |
|      | Leu | 139.01 | 3.05 | 3   |         |
|      | Ile | 130.17 | 2.85 | 3   |         |
|      | Thr | 45.06  | 0.99 | 1   |         |
|      | Asp | 190.41 | 4.17 | 4   |         |
|      | Glu | 101.69 | 2.22 | 2   |         |
|      | Tyr | 31.19  | 0.68 | 1   |         |
|      | Arg | 47.56  | 1.03 | 1   | ---     |
| T-17 | Gly | 96.09  | 1.39 | 1   |         |
|      | Ala | 44.96  | 0.63 | 1   |         |
|      | Ile | 139.55 | 2.01 | 2   |         |
|      | Ser | 68.05  | 0.98 | 1   |         |
|      | Thr | 85.56  | 1.23 | 1   |         |
|      | Asp | 92.65  | 1.33 | 1   |         |
|      | Pro | 60.37  | 0.87 | 1   |         |
|      | Lys | 67.13  | 0.97 | 1   | Ser     |
| T-18 | Gly | 94.66  |      |     |         |
|      | Ala | 221.89 |      |     |         |
|      | Val | 52.17  |      |     |         |
|      | Leu | 118.80 |      |     |         |
|      | Ile | 131.65 |      |     |         |
|      | Ser | 46.65  |      |     |         |
|      | Thr | 82.28  |      |     |         |
|      | Asp | 165.75 |      |     |         |
|      | Glu | 120.80 |      |     |         |
|      | Pro | 40.85  |      |     |         |
|      | Lys | 86.34  |      |     |         |
|      | Arg | 24.83  |      |     | Val-Ala |
| T-21 | Gly | 26.08  | ---  | --- |         |
|      | Leu | 49.86  | 1.05 | 1   |         |
|      | Ser | 27.31  | ---  | --- |         |
|      | Lys | 44.60  | 0.94 | 1   | Ser     |

|      |        |        |      |         |
|------|--------|--------|------|---------|
| T-23 | Gly    | 155.8  |      |         |
|      | Ala    | 170.65 |      |         |
|      | Val    | 271.60 |      |         |
|      | Leu    | 222.66 |      |         |
|      | Ile    | 167.03 |      |         |
|      | Ser    | 203.01 |      |         |
|      | Thr    | 245.27 |      |         |
|      | Asp    | 300.01 |      |         |
|      | Glu    | 177.55 |      |         |
|      | Phe    | 156.24 |      |         |
|      | Tyr    | 54.56  |      |         |
|      | Pro    | 104.53 |      |         |
|      | Lys    | 79.20  |      |         |
| Arg  | 116.24 | Val    |      |         |
| T-24 | Gly    | 102.30 | 1.20 | 1       |
|      | Ala    | 171.51 | 2.02 | 2       |
|      | Val    | 88.92  | 1.04 | 1       |
|      | Ile    | 77.65  | 0.91 | 1       |
|      | Thr    | 150.16 | 1.77 | 2       |
|      | Tyr    | 57.36  | 0.67 | 1       |
|      | Pro    | 98.37  | 1.15 | 1       |
|      | Lys    | 91.40  | 1.07 | 1       |
|      |        |        |      | Asp-Leu |

TAULA 6.7. Anàlisi d'aminoàcids i N-terminal detectats en els pèptids eluits del mapa representat en la figura 6.6. En els casos dels pèptids on s'ha detectat lisina i arginina, ja no s'han calculat les relacions molars.

Per tinció de Pauli varen donar reacció positiva els pèptids  $T_{12}$ ,  $T_{20}$ ,  $T_{22}$ , i  $T_{24}$ . Amb les dades presentades hom va obtenir una estimació global de la composició del pèptid, interferida notablement per la inexactitud a l'hora de retallar el pèptid del paper i la reproduïbilitat del propi sistema. La mostra més clara d'impuresa d'un pèptid és l'aparició de diferents residus N-terminal, d'arginina i lisina plegades en l'anàlisi d'aminoàcids i, secundàriament, l'allunyament dels valors de relació molar de les unitats enteres de residus d'aminoàcids.

#### 6.8. MAPES PEPTÍDICS PREPARATIUS.

La proteïna carboximetilada era introduïda a la columna descrita de 3 m de longitud, equilibrada amb àcid fòrmic al 5% -en realitat es treballava amb tres columnes d'1m connectades amb sèrie- i amb control de fluxe pre-columna a 10ml/h amb bomba peristàltica. L'elució de la mostra durava més de 12h, i s'obtenien fraccions de 2.5ml. A la fracció 44, hom va detectar la primera pujada d'absorbància 280nm, que arribava al màxim a la fracció 55-57, per anar davallant gradulament. La columna de tres metres hauria d'haver facilitat teòricament una certa separació entre els diferents pèptids, combinant criteris de pes molecular i hidrofobicitat. En aquest cas, la separació no va reeixir gaire, tal com s'observa en el perfil d'elució presentat en la figura 6.4. Els darrers pics corresponen sempre al Tris i la urea que contenien la mostra, substàncies que es detecten per les alteracions que provoquen en la conductivitat. Per al correcte fraccionament de la mostra hom va realitzar un mapa electroforètic a pH 6.5 amb un alíquot de 20 $\mu$ l de cada una de les fraccions. L'esquema que s'obté apareix en la figura 6.7.:s'hi indiquen les fraccions d'inici i acabament de cada un dels pèptids localitzats.

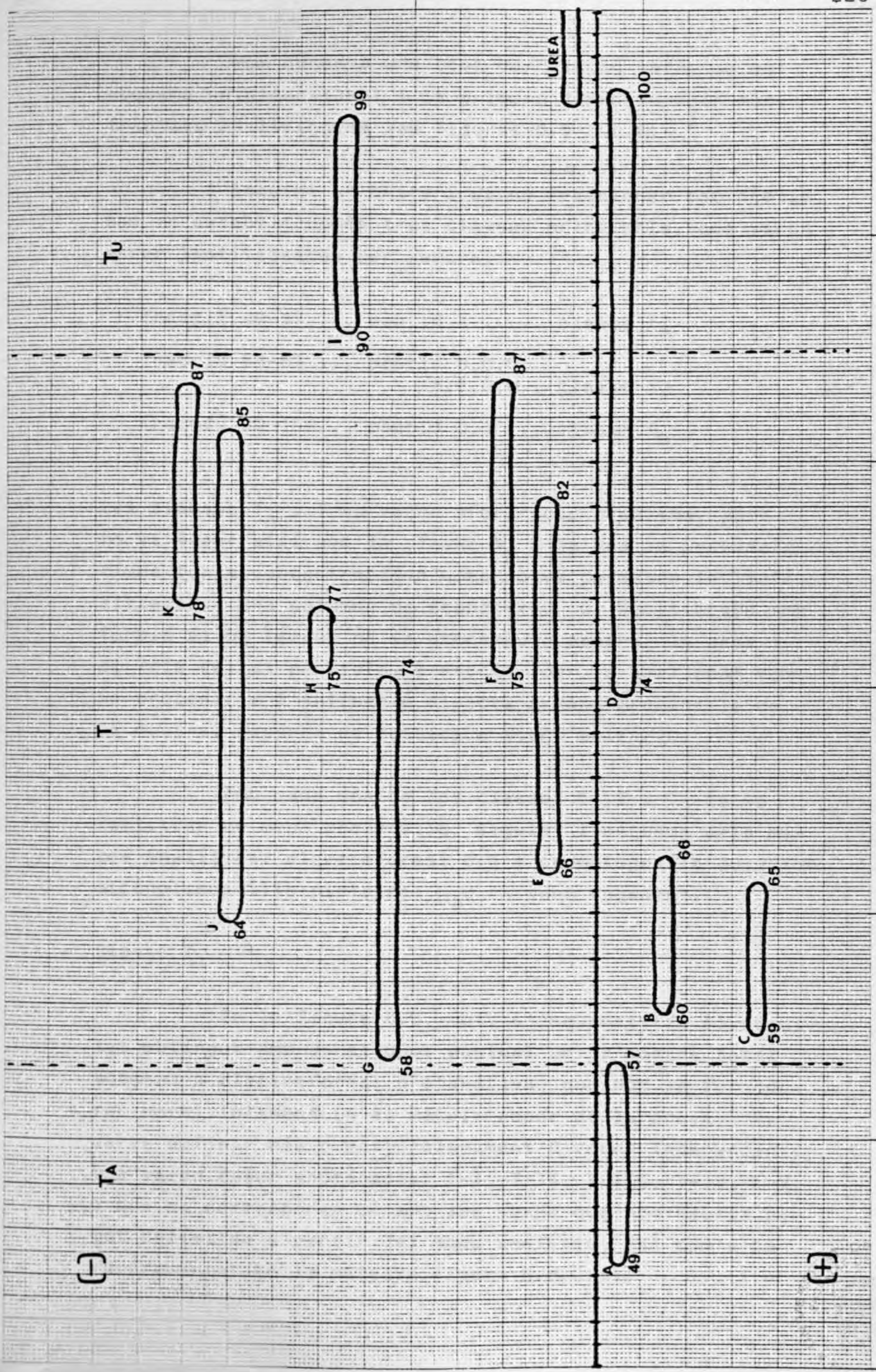


FIGURA 6.7. Electroforesi 6.5 de cada fracció de la columna de Sephadex G-25 SF





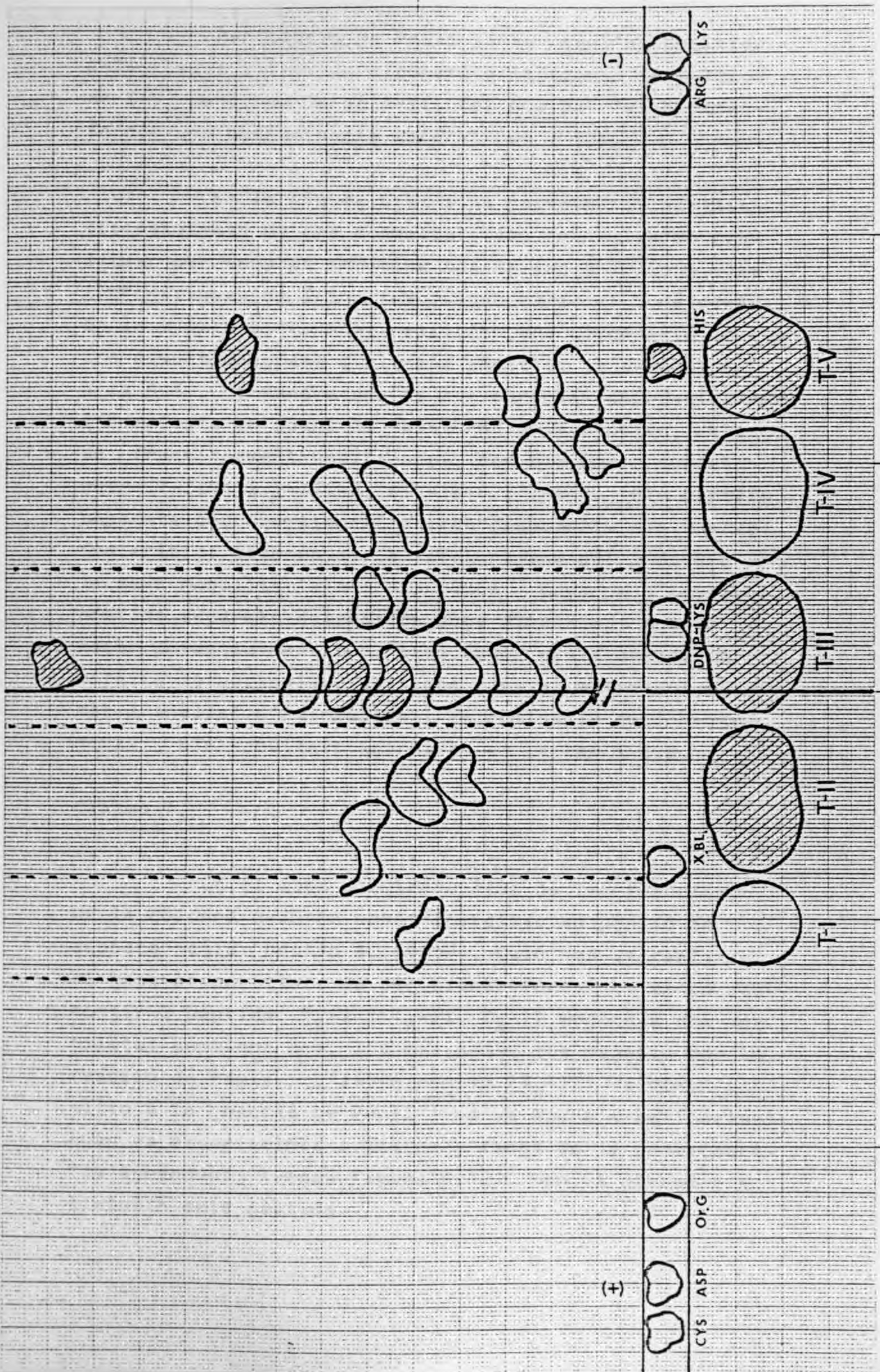


FIGURA 6.8. Fraccionament per electroforesi preparativa del subgrup T en T-I a T-V. Comparació amb el mapa preparatiu mostrat en la figura 6.5.

Per tinció de Pauli varen resultar positius T-II, T-III i T-V. Ja s'esperava la tinció de T-III i de T-V, però no la de T-II, fet que pot interpretar-se com una contaminació lateral per T-III.

En la figura 6.9. s'ha representat plegats els resultats de les cromatografies que es varen realitzar per separat amb cada una de les fraccions electroforètiques de T-I a T-V (vegeu material i mètodes). En la figura 6.12. s'ha realitzat una composició entre aquest diagrama i el mapa analític ja presentat a la 6.5., de manera que es pot apreciar claríssimament l'homologia en quant al "pattern" dels pèptids, malgrat un fraccionament horitzontal, com pot haver succeït entre T-II-1 i T-III-3, o T-IV-1 i T-V-1. Els pèptids separats per cromatografia eren denominats amb una xifra aràbiga després de la xifra romana que indicava la seva mobilitat electroforètica. Cada un d'aquests pèptids separats després de dues dimensions podria ésser potencialment pur, i va ésser eluït segons la mateixa metodologia utilitzada fins al moment, i sotmés a anàlisi d'aminoàcids i determinació de l'N-terminal. Els resultats apareixen en la taula 6.8.

#### Classe T<sub>A</sub>

En el mapa electroforètic de les fraccions de la columna G-25-SF només apareixia un pèptid en aquesta regió: pèptid A (49-57). Quan hom va realitzar el mapa preparatiu, ja per electroforesi es varen distingir 2 pèptids: T<sub>A</sub>-I i T<sub>A</sub>-II. T<sub>A</sub>-II mostrava una mobilitat semblant a A, i a més a més era negatiu per la reacció de Pauli. L'altre pèptid (T<sub>A</sub>-I) va donar positiu a la reacció de Pauli i no va moure's de l'origen quan va ésser sotmés a les dues fases de la cromatografia ascendent. (vegeu figura 6.10). Hom va procedir a l'elució dels pèptids.

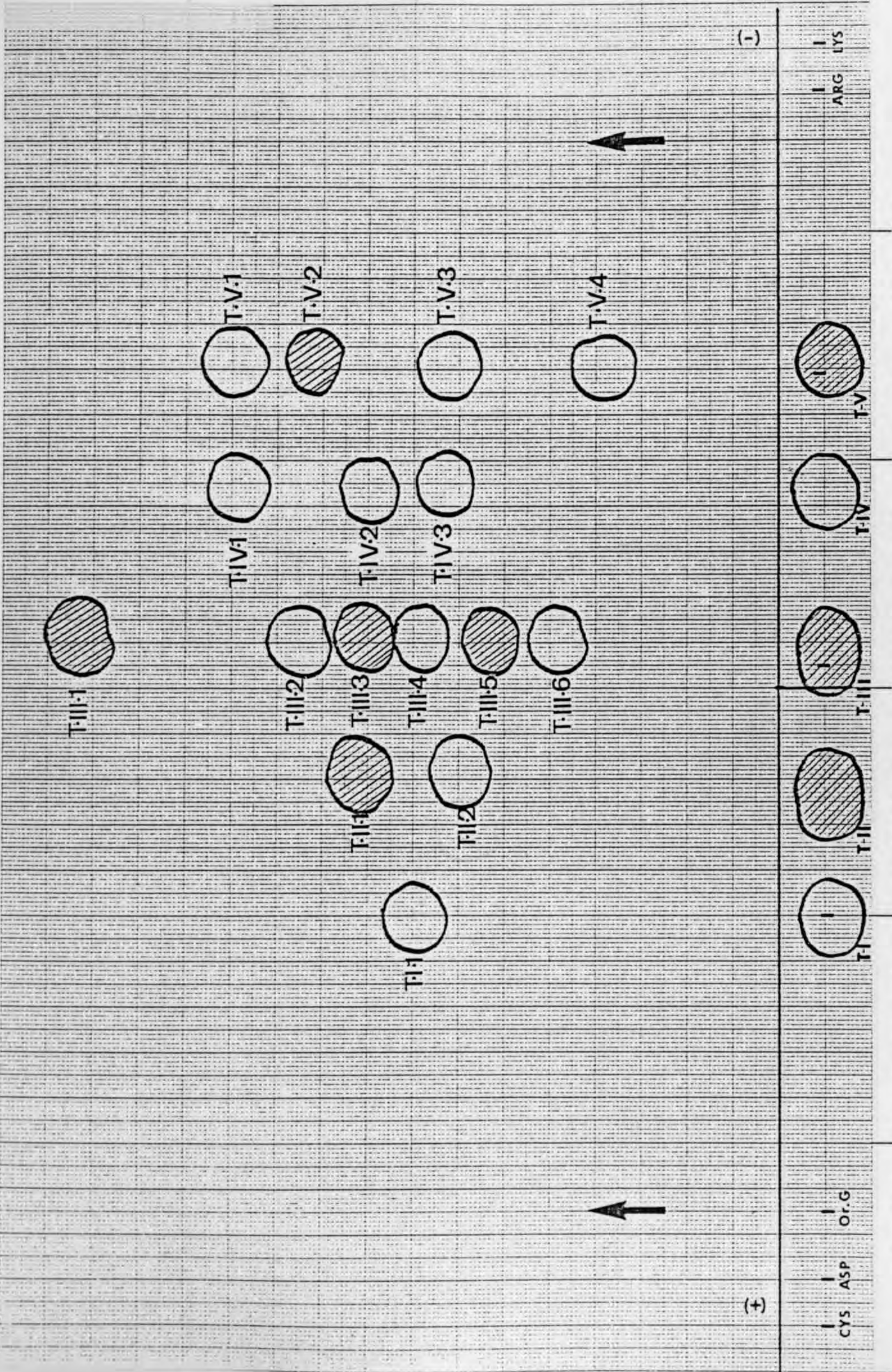


FIGURA 6.9. Desdoblament per cromatografia ascendent de cada una de les subfraccions electroforètiques representat en un sol esquema.

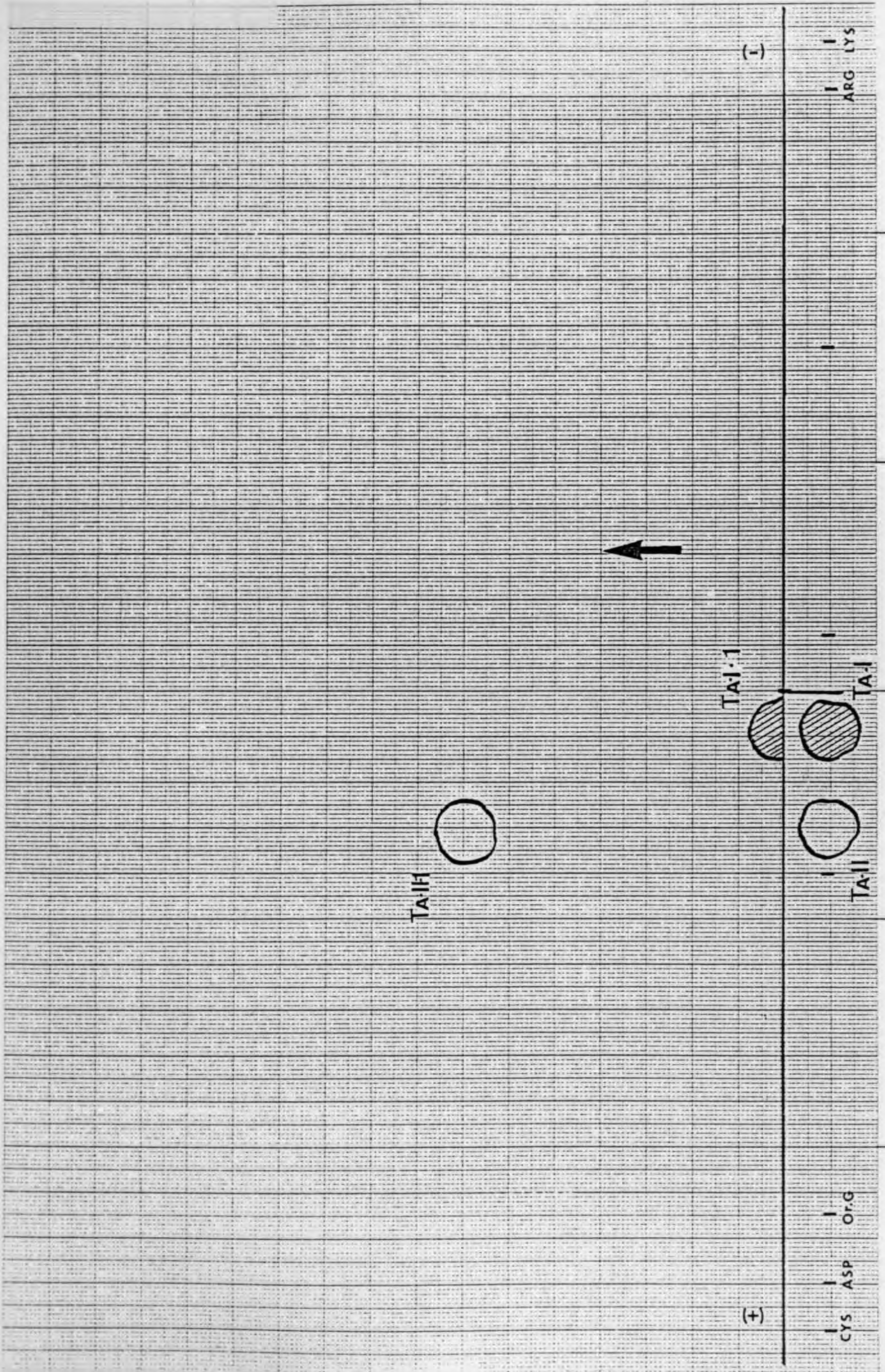


FIGURA 6.10. Electroforesi 6.5 i Cromatografia ascendent de T<sub>A</sub>.

(-)



Tu-1



(+)

|        |        | nmols AA | relació<br>molar | enters<br>probables | N-term.  |  |
|--------|--------|----------|------------------|---------------------|----------|--|
| T-II-1 | Gly    | 65.80    | 2.03             | 2                   |          |  |
|        | Ala    | 50.49    | 1.56             | 1-2                 |          |  |
|        | Val    | 33.30    | 1.02             | 1                   |          |  |
|        | Leu    | 82.29    | 2.50             | 2-3                 |          |  |
|        | Ile    | 79.88    | 2.46             | 2-3                 |          |  |
|        | Ser    | 16.61    | ---              | -                   |          |  |
|        | Thr    | 35.73    | 1.10             | 1                   |          |  |
|        | Asp    | 113.24   | 3.50             | 3-4                 |          |  |
|        | Glu    | 68.24    | 2.10             | 2                   |          |  |
|        | Tyr    | 28.43    | 0.88             | 1                   |          |  |
|        | Arg    | 20.27    | 0.93             | 1                   | Thr T-10 |  |
|        | T-II-1 | Gly      | 164.95           | 3.32                | 3        |  |
|        |        | Ala      | 102.86           | 2.07                | 2        |  |
|        |        | Val      | 185.22           | 3.72                | 4        |  |
| Leu    |        | 125.59   | 2.52             | 2-3                 |          |  |
| Ile    |        | 128.57   | 2.58             | 2-3                 |          |  |
| Ser    |        | 129.32   | 2.60             | 2-3                 |          |  |
| Thr    |        | 203.59   | 4.09             | 4                   |          |  |
| Asp    |        | 163.90   | 3.29             | 3                   |          |  |
| Glu    |        | 70.27    | 1.41             | 1-2                 |          |  |
| Phe    |        | 85.37    | 1.71             | 2                   |          |  |
| Tyr    |        | 66.52    | 1.40             | 1-2                 |          |  |
| Pro    |        | 39.59    | 0.79             | 1                   |          |  |
| Lys    |        | 41.48    | 0.83             | 1                   | Ala T-11 |  |
| Arg    |        | 57.87    | 1.16             | 1                   | Val T-16 |  |
| T-II-2 | Ala    | 107.81   | 1.83             | 2                   |          |  |
|        | Leu    | 65.90    | 1.12             | 1                   |          |  |
|        | Ile    | 78.92    | 1.34             | 1                   |          |  |
|        | Asp    | 99.43    | 1.68             | 1-2                 |          |  |
|        | Glu    | 67.10    | 1.14             | 1                   |          |  |
|        | Pro    | 54.54    | 0.92             | 1                   |          |  |
|        | Lys    | 42.95    | 0.73             | 1                   | Ile T-9  |  |

|         |         |        |       |      |        |      |  |
|---------|---------|--------|-------|------|--------|------|--|
| T-III-1 | Gly     | 93.52  | 1.17  | 1    |        |      |  |
|         | Ala     | 152.36 | 1.92  | 2    |        |      |  |
|         | Val     | 73.87  | 0.93  | 1    |        |      |  |
|         | Leu     | 72.50  | 0.91  | 1    |        |      |  |
|         | Ile     | 77.64  | 0.97  | 1    |        |      |  |
|         | Thr     | 124.21 | 1.56  | 1-2  |        |      |  |
|         | Tyr     | ?      | ?     | ?    |        |      |  |
|         | Pro     | 89.22  | 1.12  | 1    |        |      |  |
|         | His     | 79.04  | 0.99  | 1    | Leu    | T-24 |  |
| T-III-2 | Gly     | 46.07  | 0.93  | 1    |        |      |  |
|         | Ala     | 39.42  | 0.80  | 1    |        |      |  |
|         | Val     | 59.44  | 1.20  | 1    |        |      |  |
|         | Leu     | 131.37 | 2.67  | 2-3  |        |      |  |
|         | Ile     | 48.32  | 0.98  | 1    |        |      |  |
|         | Ser     | 49.63  | 1.00  | 1    |        |      |  |
|         | Thr     | 29.40  | 0.59  | -    |        |      |  |
|         | Asp     | 160.22 | 3.25  | 1    |        |      |  |
|         | Glu     | 25.48  | 0.51  | -    |        |      |  |
|         | Phe     | 48.83  | 0.99  | 1    |        |      |  |
|         | Tyr     | 9.19   | 0.18  | -    |        |      |  |
|         | Lys     | 34.31  | 0.69  | 1    | Phe    | T-20 |  |
|         | Arg     | 73.40  | 1.49  | 1-2  | altres | T-23 |  |
|         | T-III-2 | Gly    | 66.93 | 1.65 | 1-2    |      |  |
|         |         | Ala    | 92.30 | 2.28 | 2      |      |  |
| Val     |         | 22.71  | 0.56  | -    |        |      |  |
| Leu     |         | 101.85 | 2.51  | 2-3  |        |      |  |
| Ile     |         | 50.29  | 1.23  | 1    |        |      |  |
| Ser     |         | 35.67  | 0.88  | 1    |        |      |  |
| Thr     |         | 30.67  | 0.76  | 1    |        |      |  |
| Asp     |         | 102.29 | 2.52  | 2-3  |        |      |  |
| Glu     |         | 29.24  | 0.73  | 1    |        |      |  |
| Phe     |         | 8.44   | ---   | -    |        |      |  |
| Pro     |         | 34.38  | 0.85  | 1    |        |      |  |
| Lys     |         | 39.69  | 0.98  | 1    | Leu    | T-20 |  |
| Arg     |         | 47.26  | 1.16  | 1    | altres | T-15 |  |



|         |       |        |      |     |     |      |
|---------|-------|--------|------|-----|-----|------|
| T-III-4 | Gly   | 38.83  | 0.80 | 1   |     |      |
|         | Ala   | 73.58  | 1.53 | 1-2 |     |      |
|         | Val   | 24.70  | 0.51 | -   |     |      |
|         | Leu   | 48.28  | 1.00 | 1   |     |      |
|         | Ile   | 47.79  | 0.99 | 1   |     |      |
|         | Ser   | 40.00  | 0.83 | 1   |     |      |
|         | Thr   | 37.86  | 0.78 | 1   |     |      |
|         | Asp   | 69.74  | 1.45 | 1-2 |     |      |
|         | Glu   | 57.56  | 1.19 | 1   |     |      |
|         | Pro   | 47.62  | 0.99 | 1   | Ile |      |
| Lys     | 48.55 | 1.00   | 1    | Leu | T-8 |      |
| T-III-5 | Gly   | 39.88  | 1.16 | 1   |     |      |
|         | Ala   | 142.85 | 4.16 | 4   |     |      |
|         | Val   | 52.09  | 1.51 | 1-2 |     |      |
|         | Leu   | 78.58  | 2.28 | 2   |     |      |
|         | Ile   | 110.33 | 3.21 | 3   |     |      |
|         | Ser   | 32.65  | 0.95 | 1   |     |      |
|         | Thr   | 37.68  | 1.09 | 1   |     |      |
|         | Asp   | 107.27 | 3.12 | 3   |     |      |
|         | Glu   | 172.36 | 5.02 | 5   |     |      |
|         | Met   | 30.45  | 0.88 | 1   | Val |      |
|         | Lys   | 36.75  | 1.04 | 1   | Glu | T-12 |
| T-III-6 | Gly   | 31.95  | 0.52 | -   |     |      |
|         | Ala   | 151.49 | 2.46 | 2-3 |     |      |
|         | Val   | 16.41  | 0.26 | -   |     |      |
|         | Leu   | 17.47  | 0.28 | -   |     |      |
|         | Ile   | 76.10  | 1.24 | 1   |     |      |
|         | Ser   | 23.52  | 0.38 | -   |     |      |
|         | Thr   | 17.34  | 0.28 | -   |     |      |
|         | Asp   | 90.95  | 1.48 | 1-2 |     |      |
|         | Glu   | 102.08 | 1.66 | 1-2 |     |      |
|         | Pro   | 32.34  | 0.52 | -   |     |      |
|         | Lys   | 61.35  | 1.0  | 1   | Ala |      |
| T-IV-1  | Gly   | 19.74  | 1.48 | 1-2 |     |      |
|         | Ala   | 31.80  | 2.33 | 2   |     |      |
|         | Val   | 11.32  | 0.85 | 1   |     |      |
|         | Leu   | 34.05  | 2.56 | 2-3 |     |      |

|        |     |        |       |     |     |      |
|--------|-----|--------|-------|-----|-----|------|
|        | Ile | 11.08  | 0.83  | 1   |     |      |
|        | Ser | 18.75  | 1.41  | 1-2 |     |      |
|        | Asp | 14.75  | 1.10- | 1   |     |      |
|        | Pro | 11.55  | 0.87  | 1   | Leu |      |
|        | Lys | 15.50  | 1.16  | 1   | Ile | T-21 |
| T-IV-2 | Ala | 174.93 | 3.37  | 3   |     |      |
|        | Leu | 106.27 | 2.04  | 2   |     |      |
|        | Ser | 116.15 | 2.23  | 2   |     |      |
|        | Thr | 59.89  | 1.15  | 1   |     |      |
|        | Asp | 74.18  | 1.43  | 1-2 |     |      |
|        | Phe | 56.11  | 1.08  | 1   |     |      |
|        | Pro | 46.93  | 0.90  | 1   |     |      |
|        | Lys | 44.25  | 0.85  | 1   | Ala | T-18 |
| T-IV-3 | Gly | 29.12  | 1.09  | 1   |     |      |
|        | Ala | 26.94  | 1.01  | 1   |     |      |
|        | Ile | 47.14  | 1.77  | 2   |     |      |
|        | Ser | 37.47  | 1.39  | 1-2 |     |      |
|        | Thr | 29.31  | 1.10  | 1   |     |      |
|        | Asp | 31.90  | 1.20  | 1   |     |      |
|        | Pro | 31.32  | 1.17  | 1   |     |      |
|        | Lys | 18.81  | 0.70  | 1   | Ser | T-17 |
| T-V-1  | Leu | 49.25  | 2.23  | 2   |     |      |
|        | Lys | 16.74  | 0.76  | 1   | Leu |      |
| T-V-2  | Val | 39.45  | 1.08  | 1   |     |      |
|        | Leu | 84.13  | 2.37  | 2   |     |      |
|        | Thr | 77.55  | 2.13  | 2   |     |      |
|        | Lys | 40.88  | 1.12  | 1   |     |      |
|        | His | t28.82 | 0.80  | 1   | Thr | T-22 |
| T-V-3  | Gly | 18.88  | 1.25  | 1   |     |      |
|        | Ala | 17.56  | 1.16  | 1   |     |      |
|        | Val | 17.79  | 0.85  | 1   |     |      |
|        | Leu | 22.94  | 1.52  | 1-2 |     |      |
|        | Ile | 10.86  | 0.72  | 1   |     |      |
|        | Ser | 15.42  | 1.02  | 1   |     |      |
|        | Thr | 15.72  | 1.05  | 1   |     |      |

|                     |     |        |      |      |     |
|---------------------|-----|--------|------|------|-----|
|                     | Asp | 14.03  | 0.93 | 1    |     |
|                     | Pro | 18.68  | 1.24 | 1    | Ser |
|                     | Lys | 42.03  | 2.79 | 2-3  | Ala |
| T-V-4               | Gly | 58.14  | 1.70 | 2    |     |
|                     | Ala | 38.20  | 1.11 | 1    |     |
|                     | Ile | 26.26  | 0.77 | 1    |     |
|                     | Ser | 54.65  | 1.60 | 2    |     |
|                     | Asp | 37.36  | 1.09 | 1    |     |
|                     | Pro | 32.44  | 0.95 | 1    |     |
|                     | Lys | 32.74  | 0.95 | 1    | Ala |
| T <sub>A</sub> -I-1 | Gly | 34.33  | 1.08 | 1    |     |
|                     | Ala | 71.93  | 2.26 | 2    |     |
|                     | Val | 56.62  | 1.78 | 2    |     |
|                     | Leu | 127.28 | 4.00 | 4    |     |
|                     | Thr | 97.95  | 3.08 | 3    |     |
|                     | Asp | 54.17  | 1.70 | 2    |     |
|                     | Glu | 161.43 | 5.07 | 5    |     |
|                     | Phe | 31.46  | 0.99 | 1    |     |
|                     | Cys | 18.28  | 0.57 | 1(?) |     |
|                     | Pro | 28.05  | 0.88 | 1    |     |
|                     | Lys | 40.57  | 1.27 | 1    | Ala |

TAULA 6.8. Anàlisi d'aminoàcids i N-terminal detectats en els pèptids eluits del mapa preparatiu (fig. 6.9).

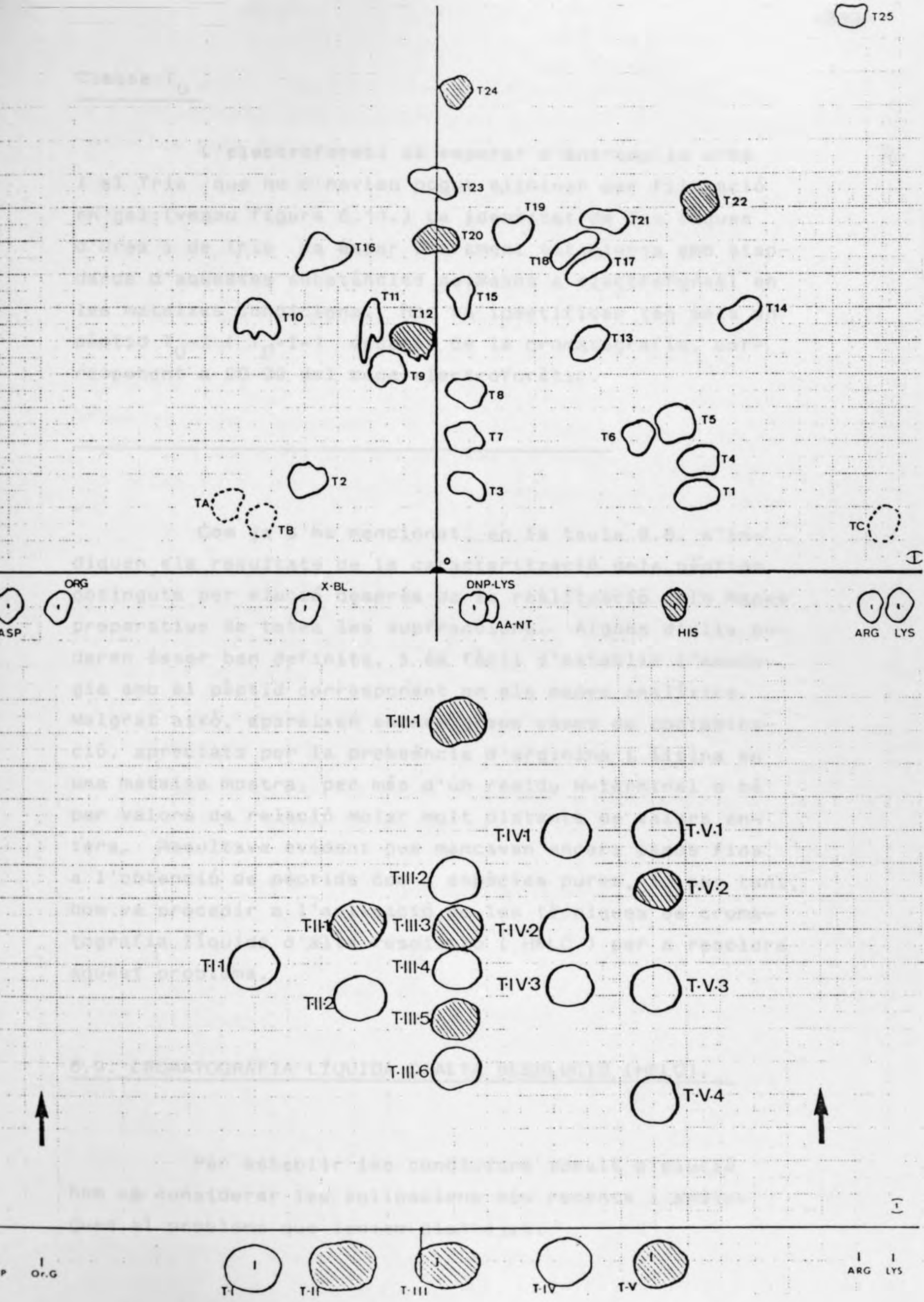


FIGURA 6.12. Comparació del mapa tríptic analític amb la composició de cada una de les fraccions ob-

## Classe T<sub>U</sub>

L'electroforesi va separar d'entrada la urea i el Tris que no s'havien pogut eliminar per filtració en gel:(vegeu figura 6.11.) La identitat de les taques d'urea i de Tris va ésser clarament establerta amb standards d'aquestes substàncies sotmesos a electroforesi en les mateixes condicions. Hom va identificar tan sols un pèptid T<sub>U</sub>-I ( T<sub>U</sub>-I-1 després de la cromatografia, corresponent a 90-99 del mapa electroforètic.

---

Com ja s'ha mencionat, en la taula 6.8. s'indiquen els resultats de la caracterització dels pèptids obtinguts per elució després de la realització dels mapes preparatius de totes les subfraccions. Alguns d'ells poderen ésser ben definits, i és fàcil d'establir l'analogia amb el pèptid corresponent en els mapes analítics. Malgrat això, apareixen encara greus casos de contaminació, apreciats per la preseència d'arginina i lisina en una mateixa mostra, per més d'un residu N-terminal o bé per valors de relació molar molt distants de valors enters. Resultava evident que mancaven encara passos fins a l'obtenció de pèptids com a espècies pures, i, per tant, hom va procedir a l'aplicació de les tècniques de cromatografia líquida d'alta resolució ( HPLC ) per a resoldre aquest problema.

### 6.9. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ (HPLC).

Per establir les condicions ideals d'elució hom va considerar les aplicacions més recents i anàlogues al problema que teniem plantejat:

-Strydom, D.J. i Vallee, B.L. (1982) apliquen l'HPLC per a l'estudi dels pèptids obtinguts a partir de la digestió trípica dels diferents isozims de l'ADH humana.

-Oray, B i col (1982) realitzen un estudi comparatiu del mètode clàssic de purificació de pèptids per electroforesi/cromatografia en 2 dimensions i la purificació dels pèptids per HPLC, en vistes a la seva posterior caracterització. El treball es realitzà amb l'enzim triosa-fosfat-isomerasa humana, sotmesa a digestió trípica.

-Anderson, J.K. i Mole, J.E. (1982) realitzen un estudi comparatiu de l'aplicació de dos sistemes d'elució en HPLC per a la separació de pèptids obtinguts de digestió trípica d'una glucoproteïna plasmàtica-el component P<sub>2</sub>.

En tots els casos, s'utilitzava una columna de fase reversa, C8 o C18. Vallee, per l'ADH humana, utilitza un sistema de detecció a 206nm, i el següent sistema de solvents:

- (A) àc. perclòric 0.1M o àc. o-fosfòric 0.1% pH 2.2
- (B) acetonitril al 75% en A.

El fluxe que utilitza és d'1ml/min, amb un gradient de 5 a 85% de B en pendents variables.

Oray, per la triosa-fosfat-isomerasa, utilitza un sistema de detecció a 220nm, i una elució en columna de:

- (A) acetat amònic 10mM, pH 4.5
- (B) acetonitril

El fluxe era d'1ml/min i el gradient de 10 a 60% d'acetonitril.

Anderson, en el seu estudi comparatiu, estableix les diferències en els dos sistemes següents:

- (1) Solvents ... A) 0.1% ac. trifluoracètic pH 2.5
- B) Acetonitril

(2) Solvents ... A) 0.1% Acetat amònic

B) Acetonitril

Aquests eren els solvents presents, si recordem, en els treballs de Vallee i Oray. El component apolar és indiscutiblement, l'acetonitril, obligat per la longitud d'ona a la qual s'ha de treballar per detectar enllaços peptídics ( 200-230nm ). La diferència s'estableix en l'ús com a fase polar d'una solució diluïda d'àcid inorgànic (TFA, perclòric) o d'una sal (acetat amònic, fosfats) La resolució és millor amb l'ús de l'àcid trifluoracètic ja que alguns pics obtinguts amb el sistema de solvents (2) es desdobra en el sistema (1). Un altre avantatge adicional de l'ús d'àcids és la menor interferència en el tractament posterior de la mostra, ja que són generalment volàtils i poden ésser eliminats per dessecació en buit , mentre que hom requereix un procés de desalinització : (diàlisi, filtració en gel) si s'ha utilitzat el sistema (2).

Per tot això, hom va triar com a condicions ideals de separació i elució de pèptids les esmentades en el capítol de material i mètodes:

Fluxe: 1.5ml/min

Temperatura: ambient

Detecció: 230nm

Solvents: (I) H<sub>2</sub>O + 0.05% TFA

(II) Acetonitril

Columna: C<sub>8</sub> (Perkin-Elmer), 25cm x 4.6mm  
partícules de 10 μm

Les mostres es van redissoldre en 20 de la composició inicial de l'eluent: 20% acetonitril i 80 % d'H<sub>2</sub>O amb un 0.05% TFA (v/v).

Normalment, es va procedir a recollir cada un dels pics i hom neutralitzava amb unes gotes d'amoniac 0.1N per tal d'obtenir un pH proper a 7.0.

Les gràfiques 6.13. reproduïxen els cromatogrames de cada un dels pèptids aïllats pels mètodes clàssics d'electroforesi/cromatografia en paper. Es varen denominar per lletres cada un dels pics, per a procedir a la seva anàlisi i caracterització. L'examen per HPLC va posar de manifest la quantitat de substàncies que contenia cada mostra. Per a la seva anàlisi, cada fracció es va dessecar sobre NaOH, i un alíquot es va sotmetre a anàlisi d'aminoàcids i determinació de l'N-terminal. En cada un dels cromatogrames, s'ha indicat quins van ésser els pics analitzats i quins varen resultar ésser pèptids. En la taula 6.9. es presenten els resultats d'aquestes caracteritzacions. Hom pot apreciar com s'ha reduït la imprecissió respecte la tanda anterior (taula 6.8.) per valors molt propers a les unitats, i com en alguns casos s'han diferenciat més d'un pèptid a partir d'una mateixa mostra inicial.



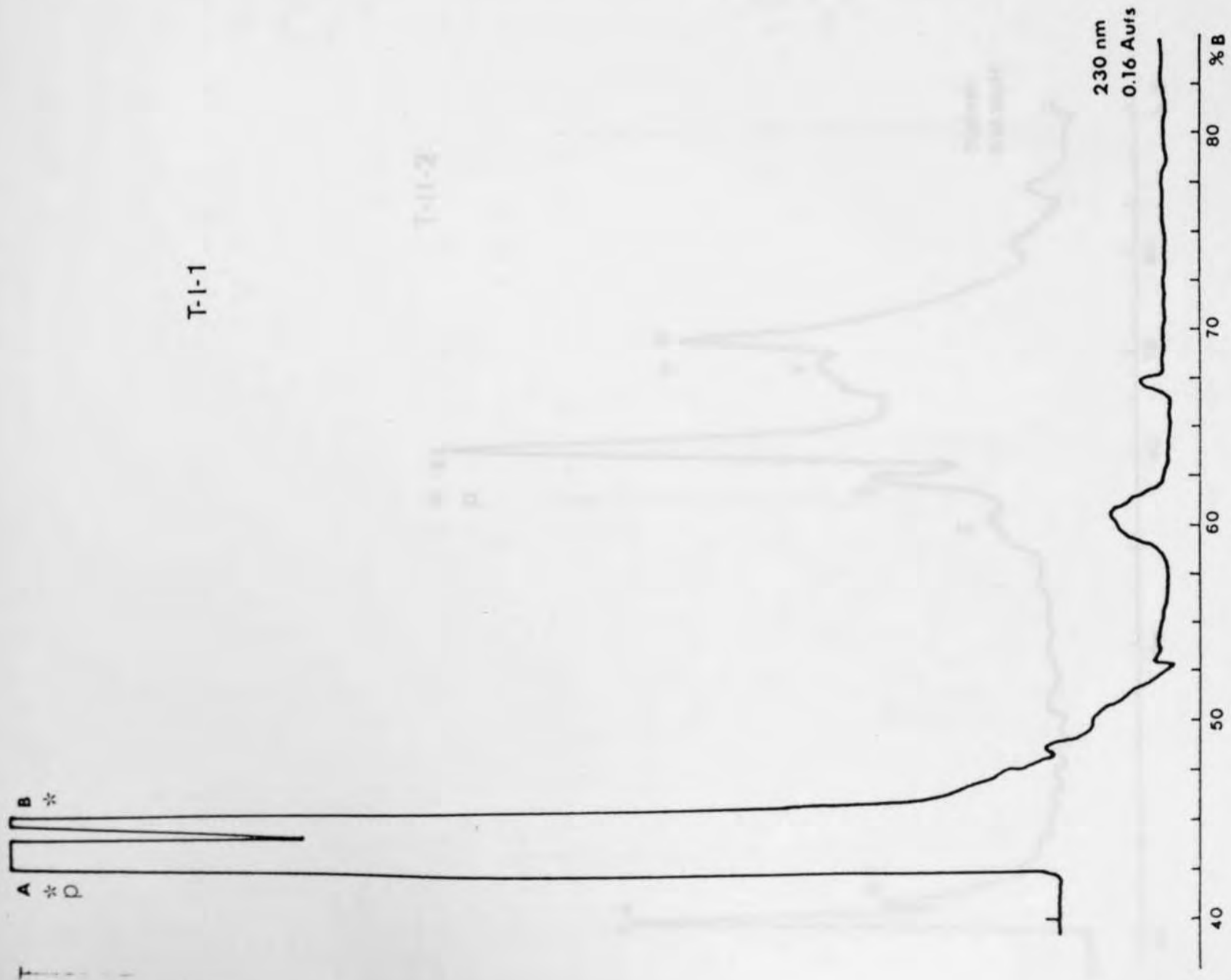


T11-1

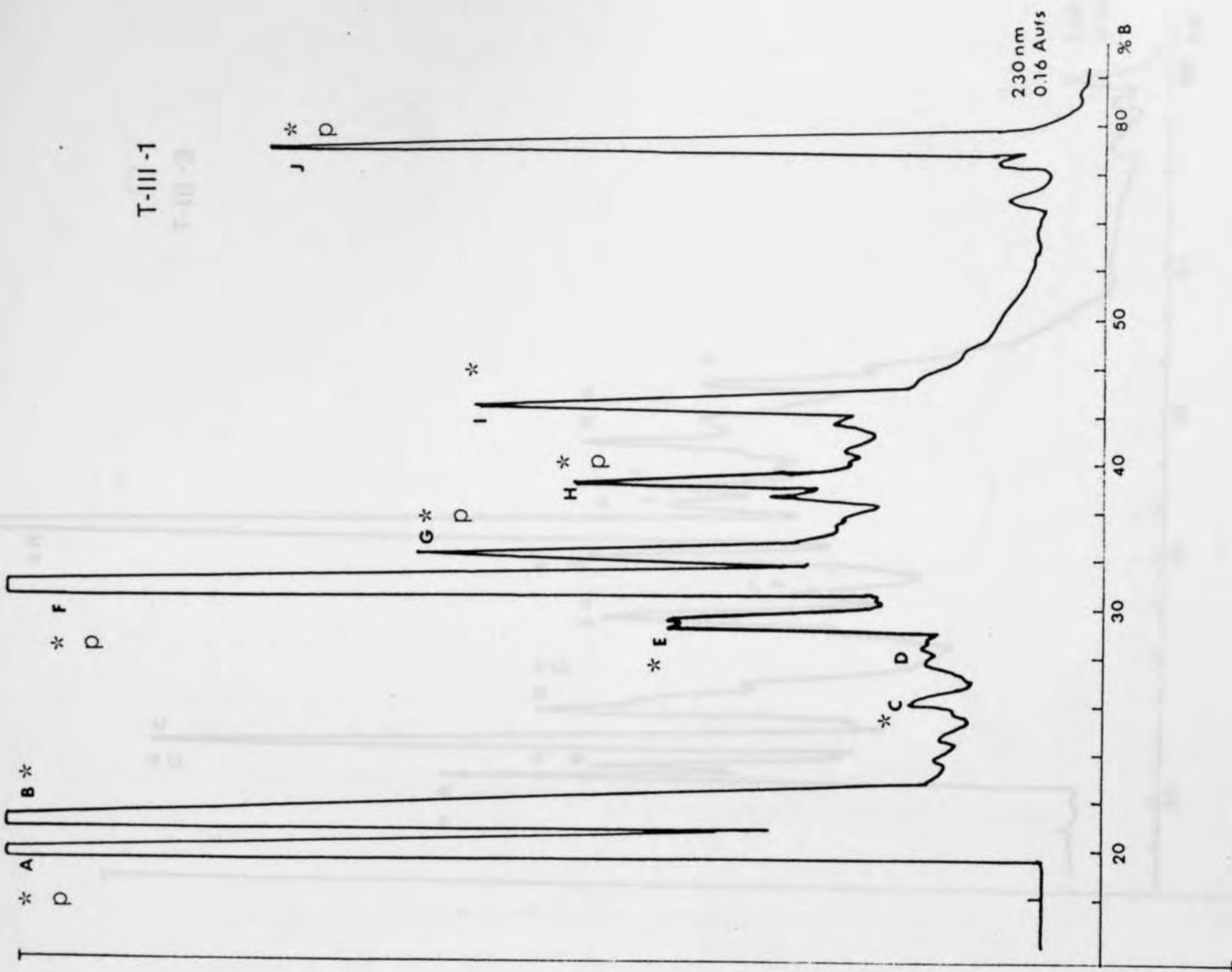
226 min  
0.16 AU

FIGURA 6.13. Cromatogrames de cada una de les fraccions obtingudes del mapa preparatiu del digerit tríptic de l'ADH de D.hydei sotmeses a HPLC.

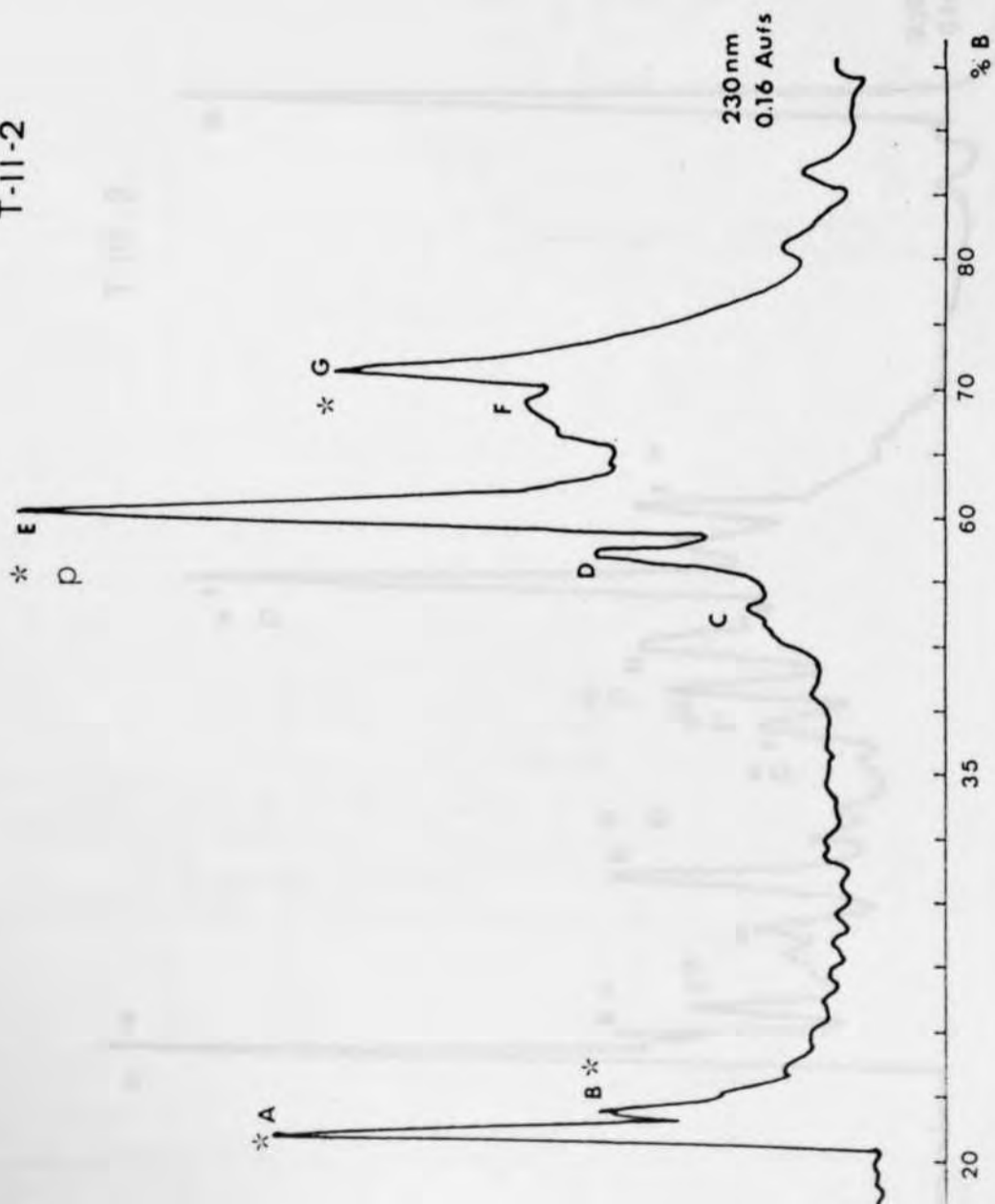
S'indica per(\*)tots els pics analitzats  
(p)els pics que són pèptid.



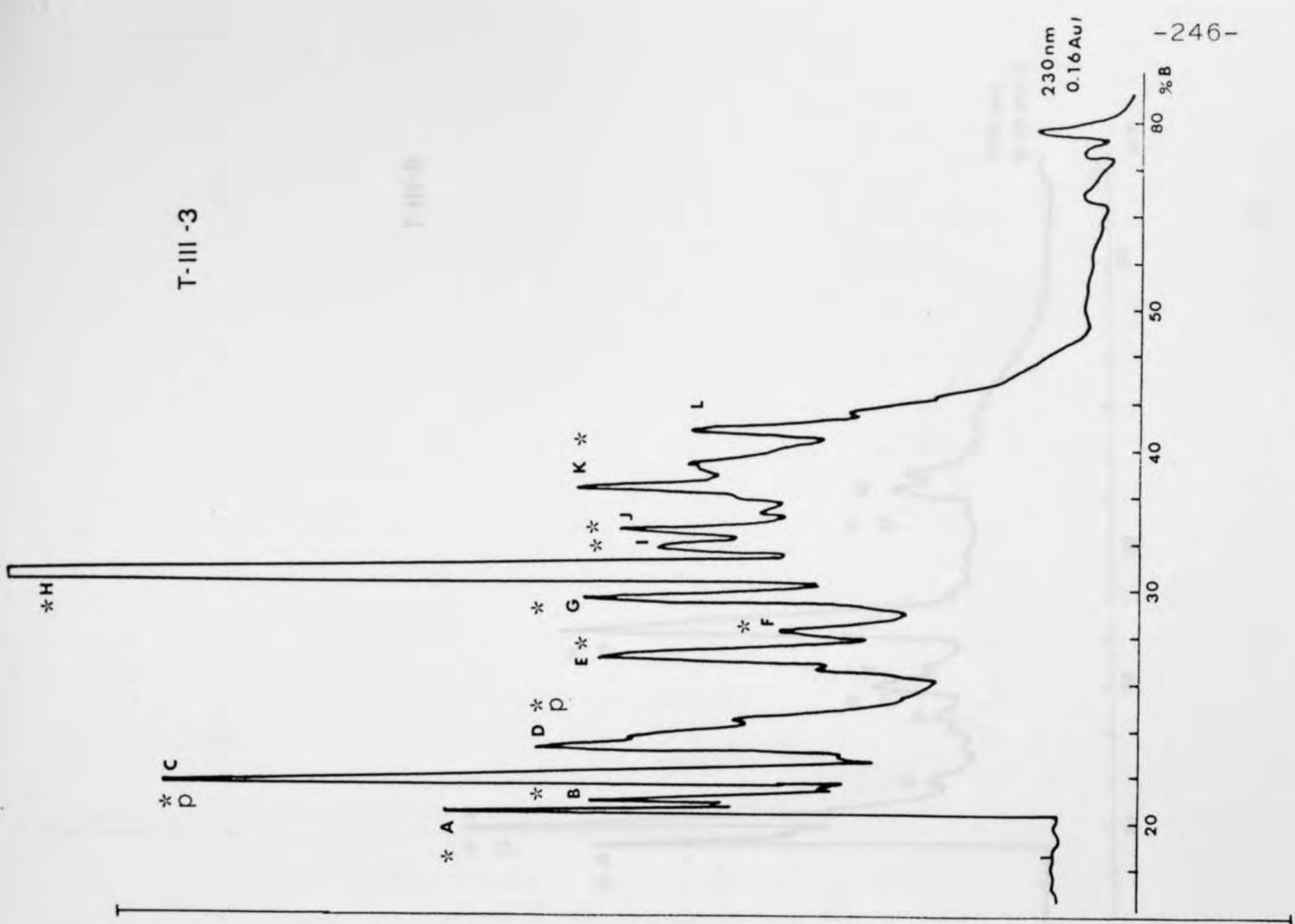
T-III-1



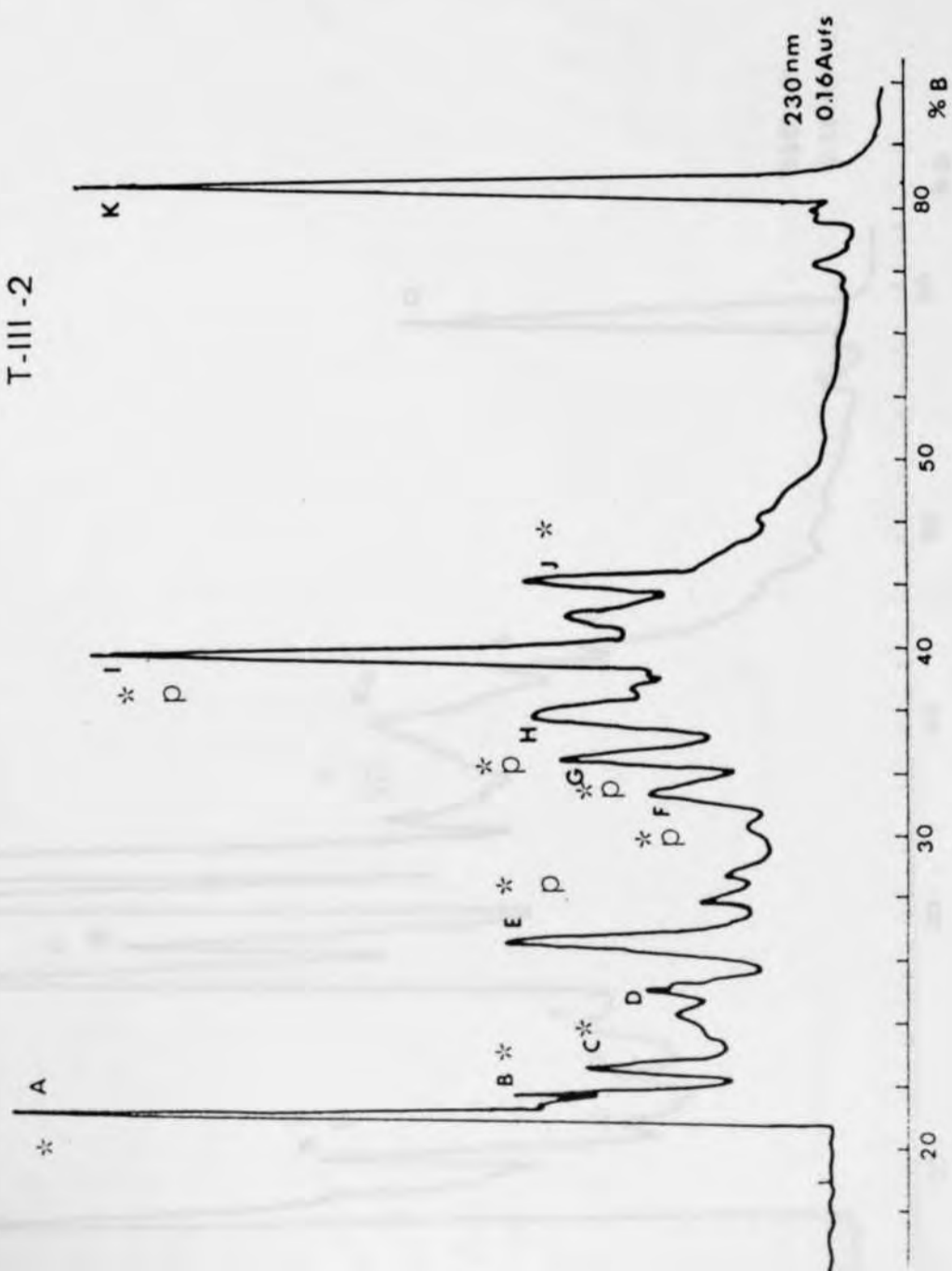
T-III-2



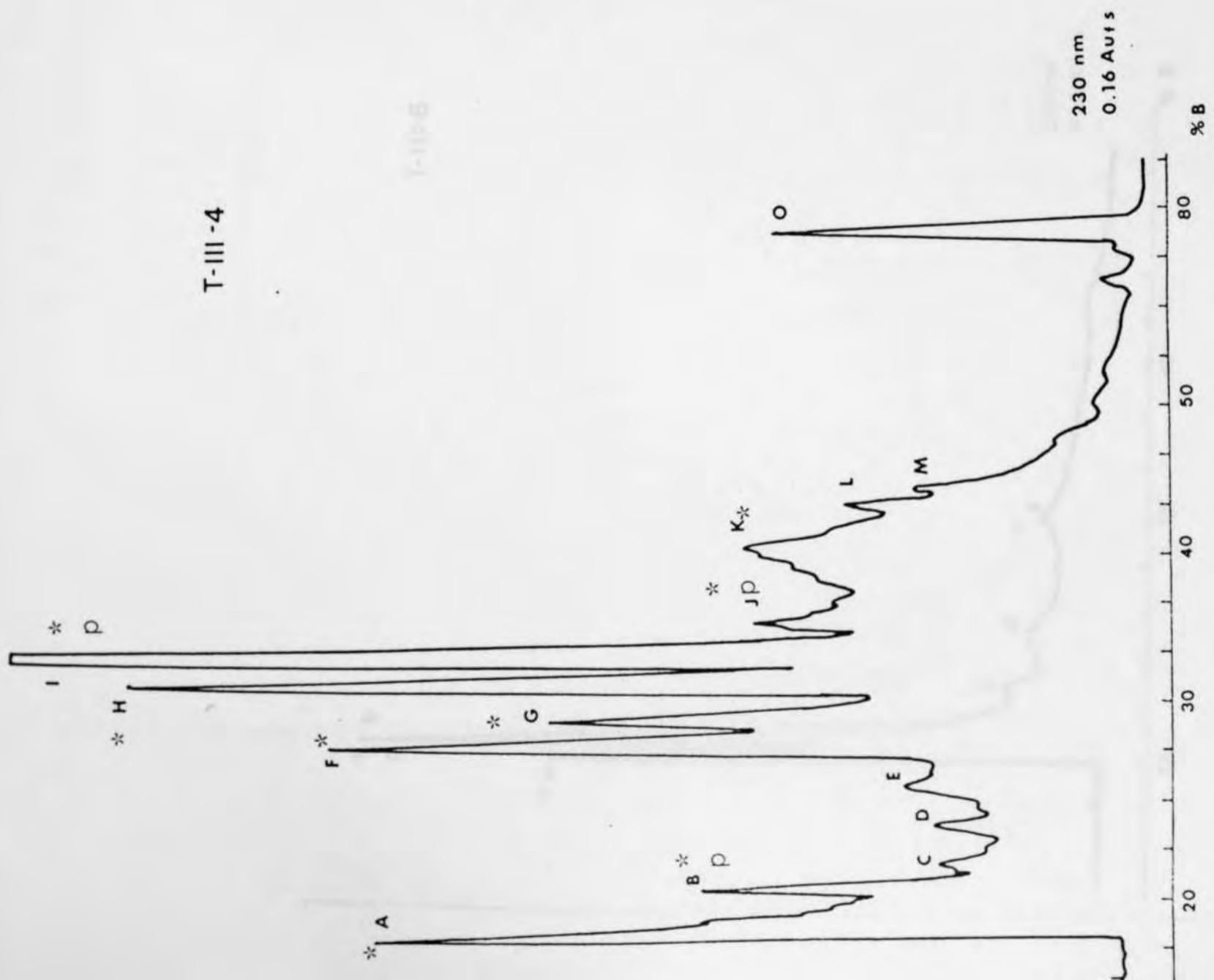
T-III -3



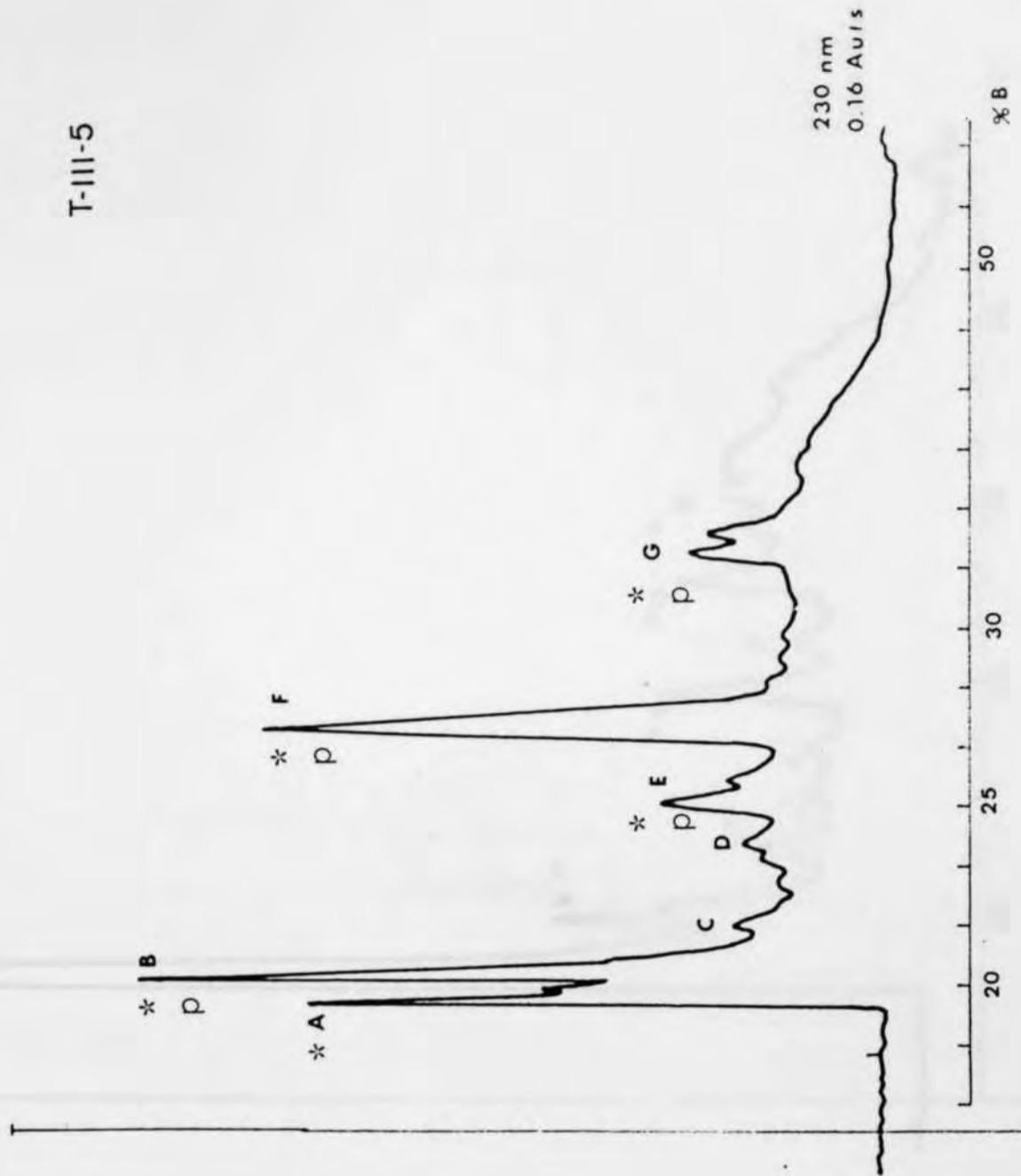
T-III -2



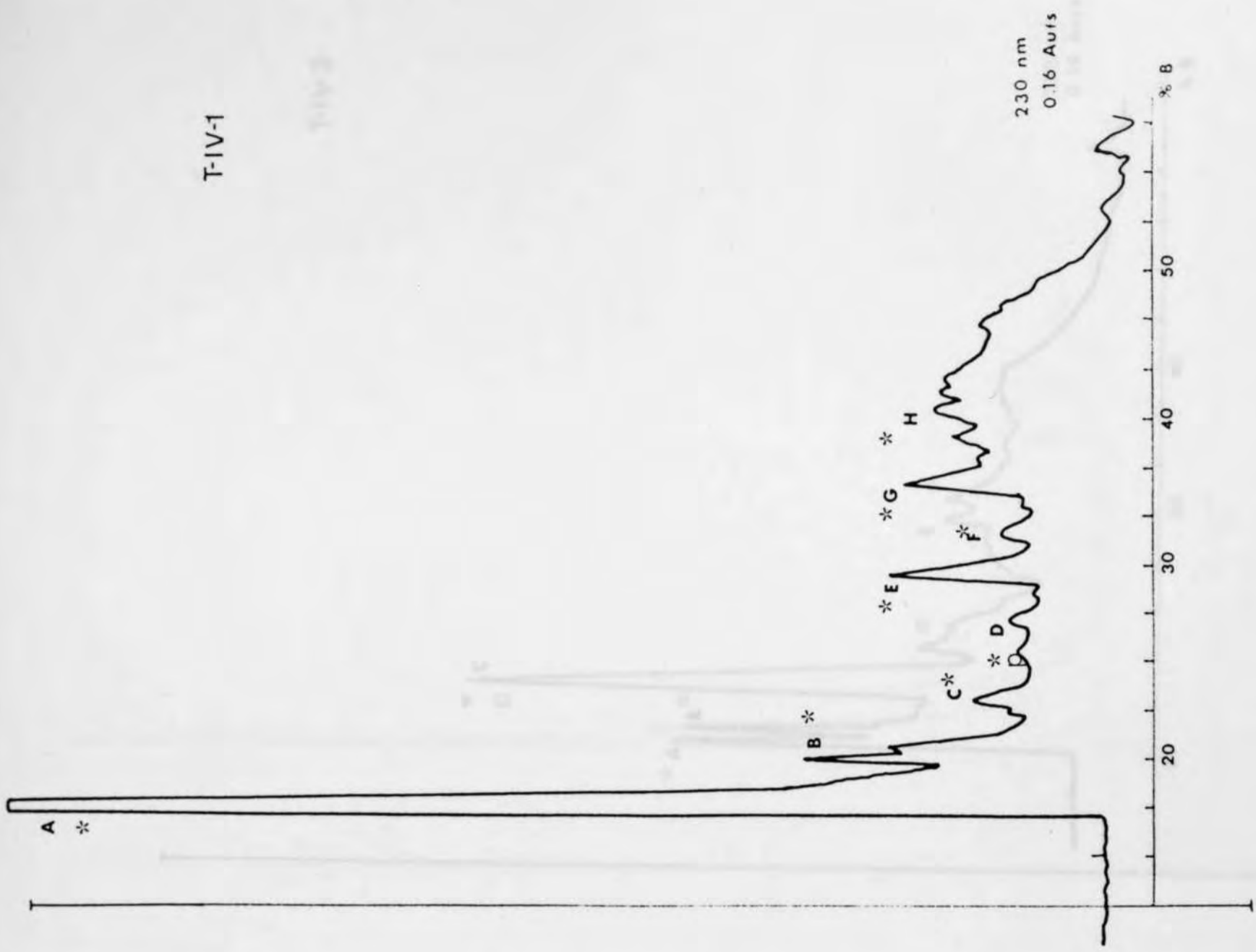
T-III-4



T-III-5

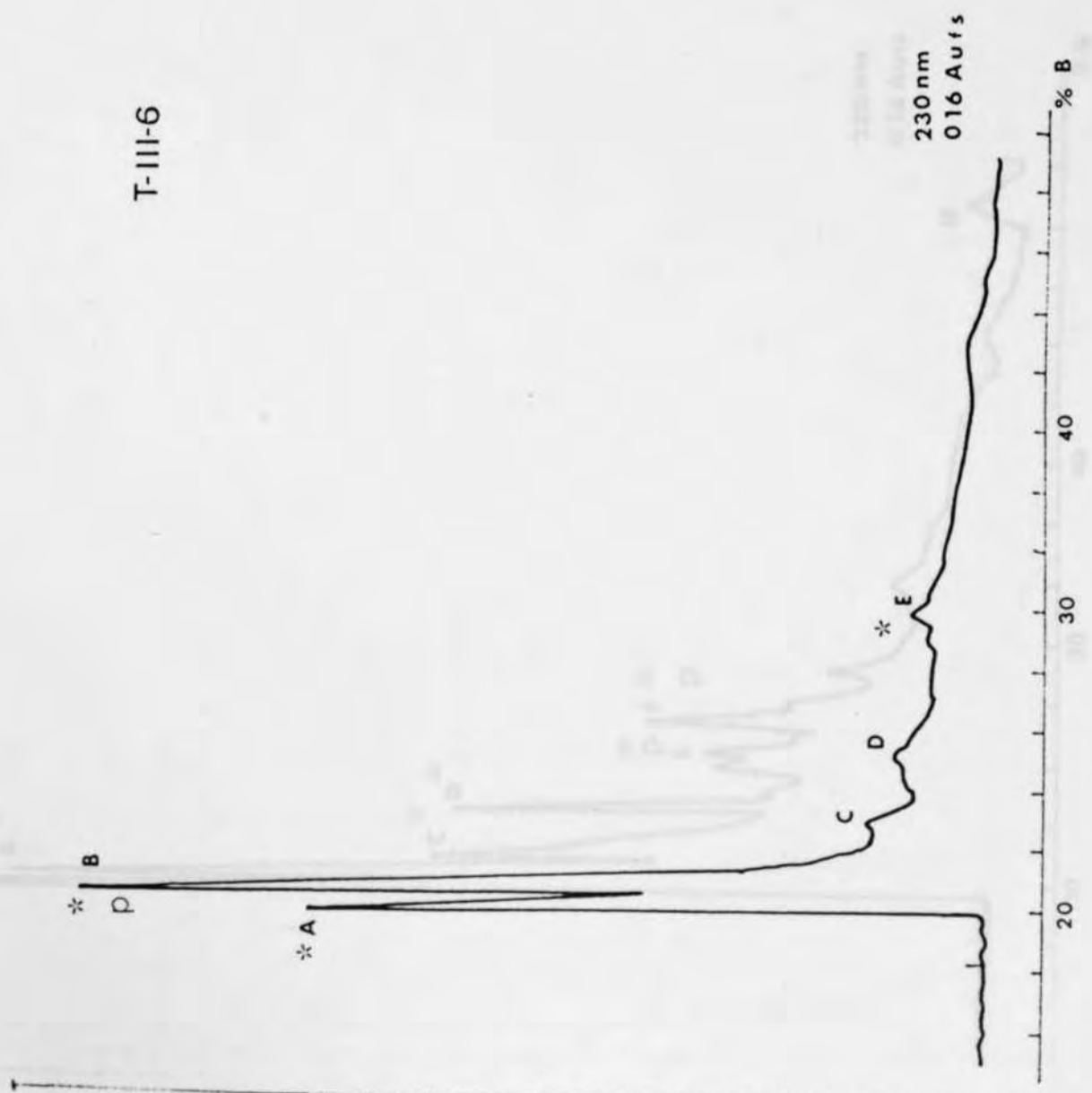


T-IV-1

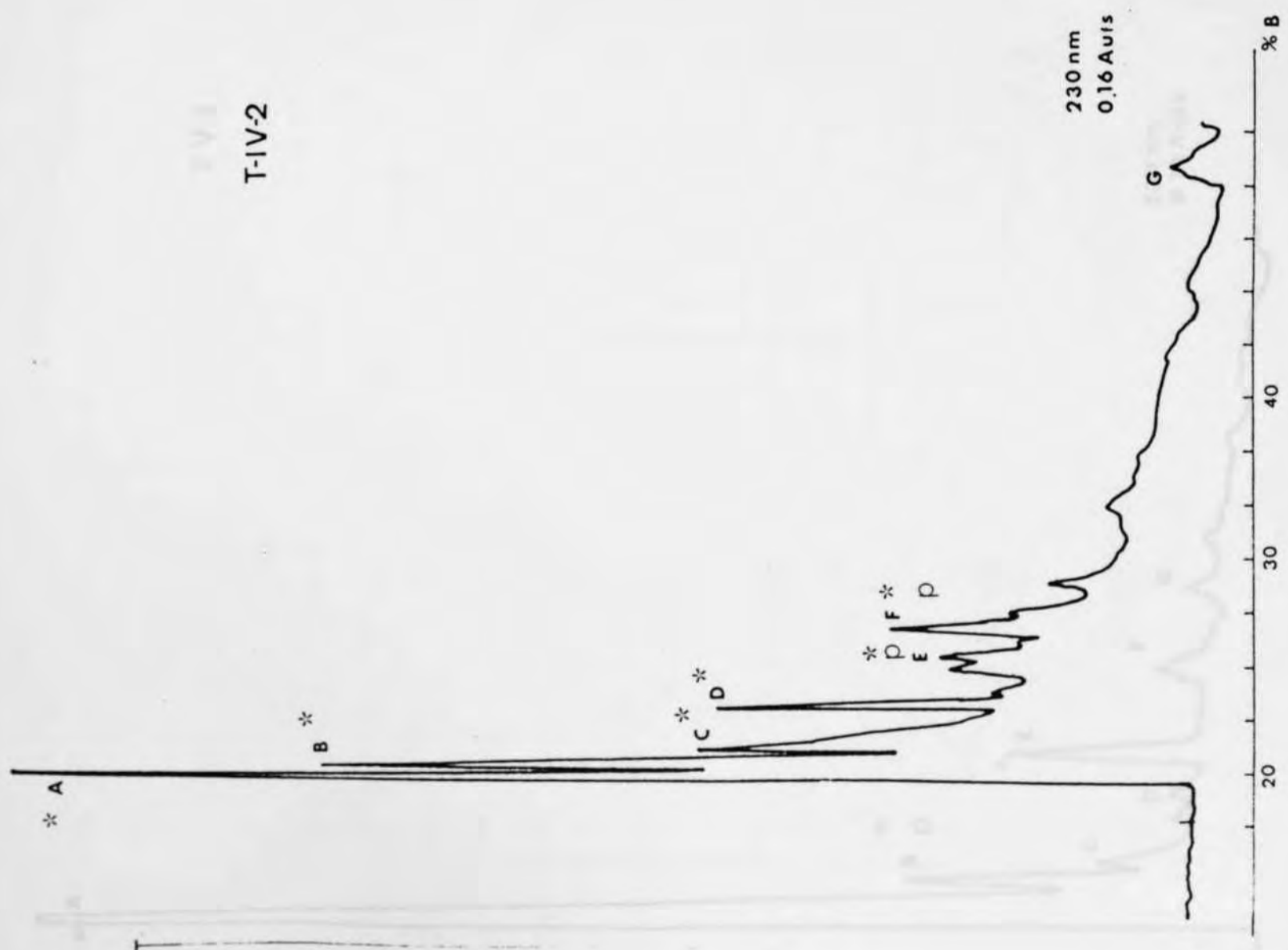


T-IV-2

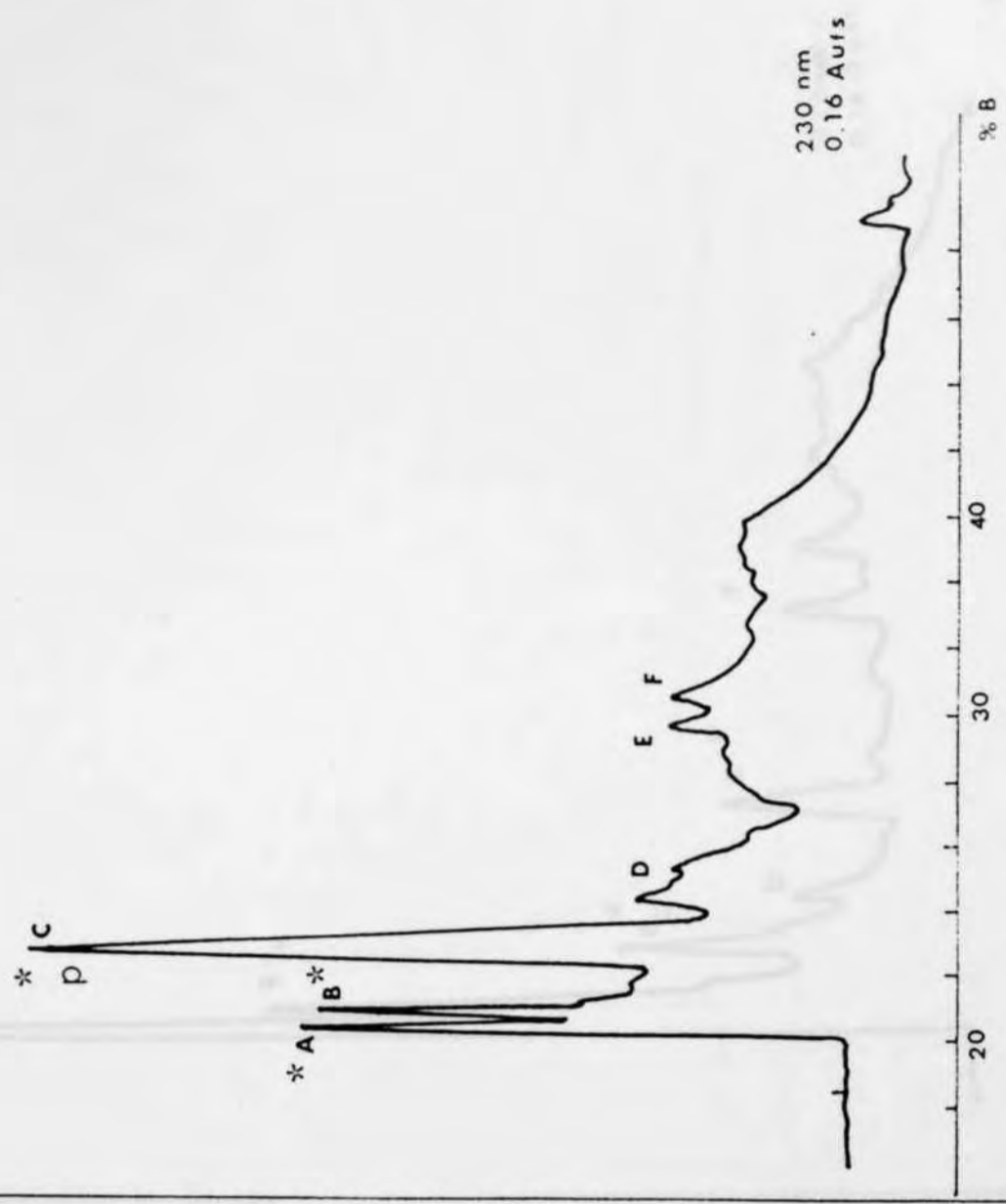
T-III-6



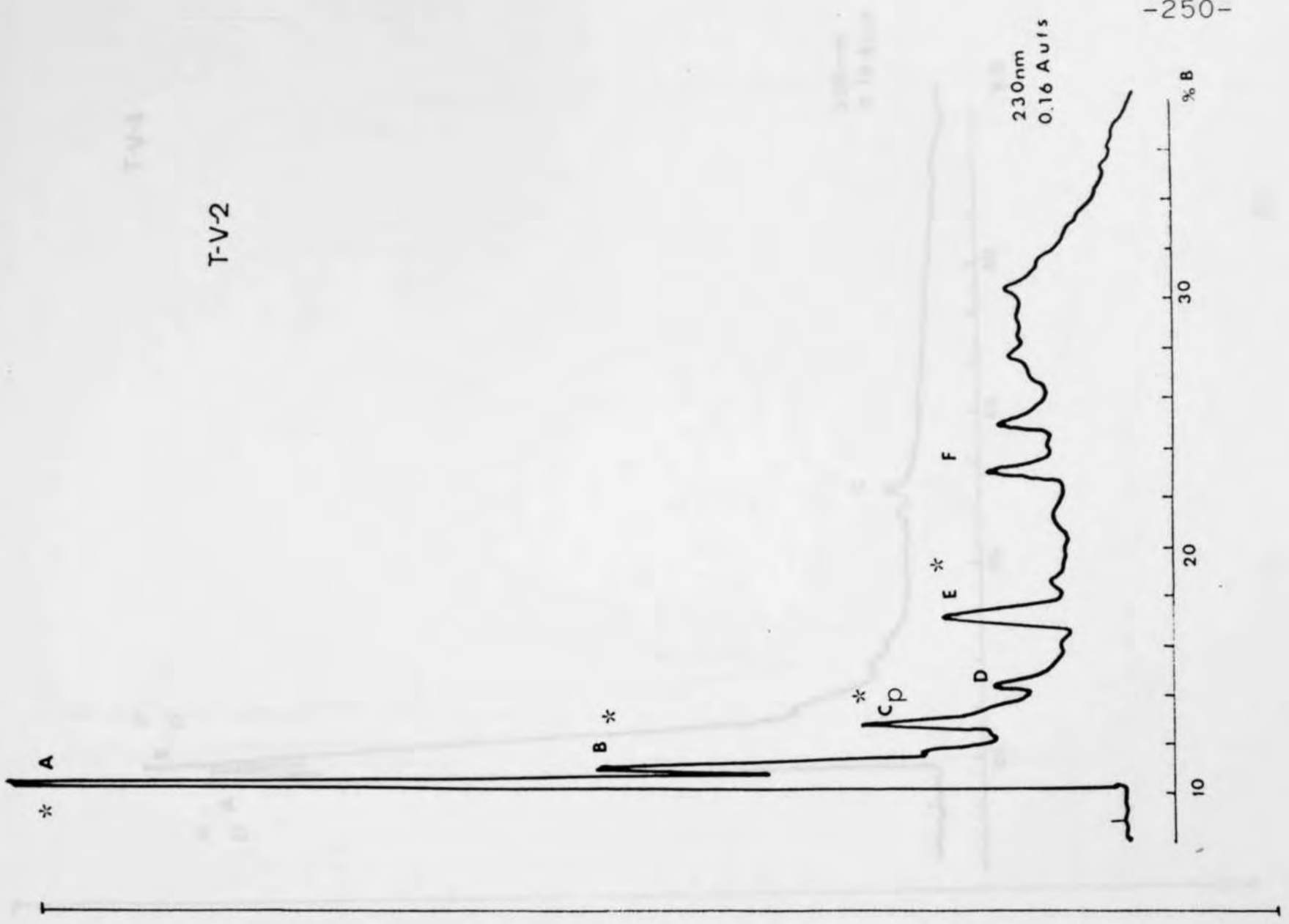
T-IV-2



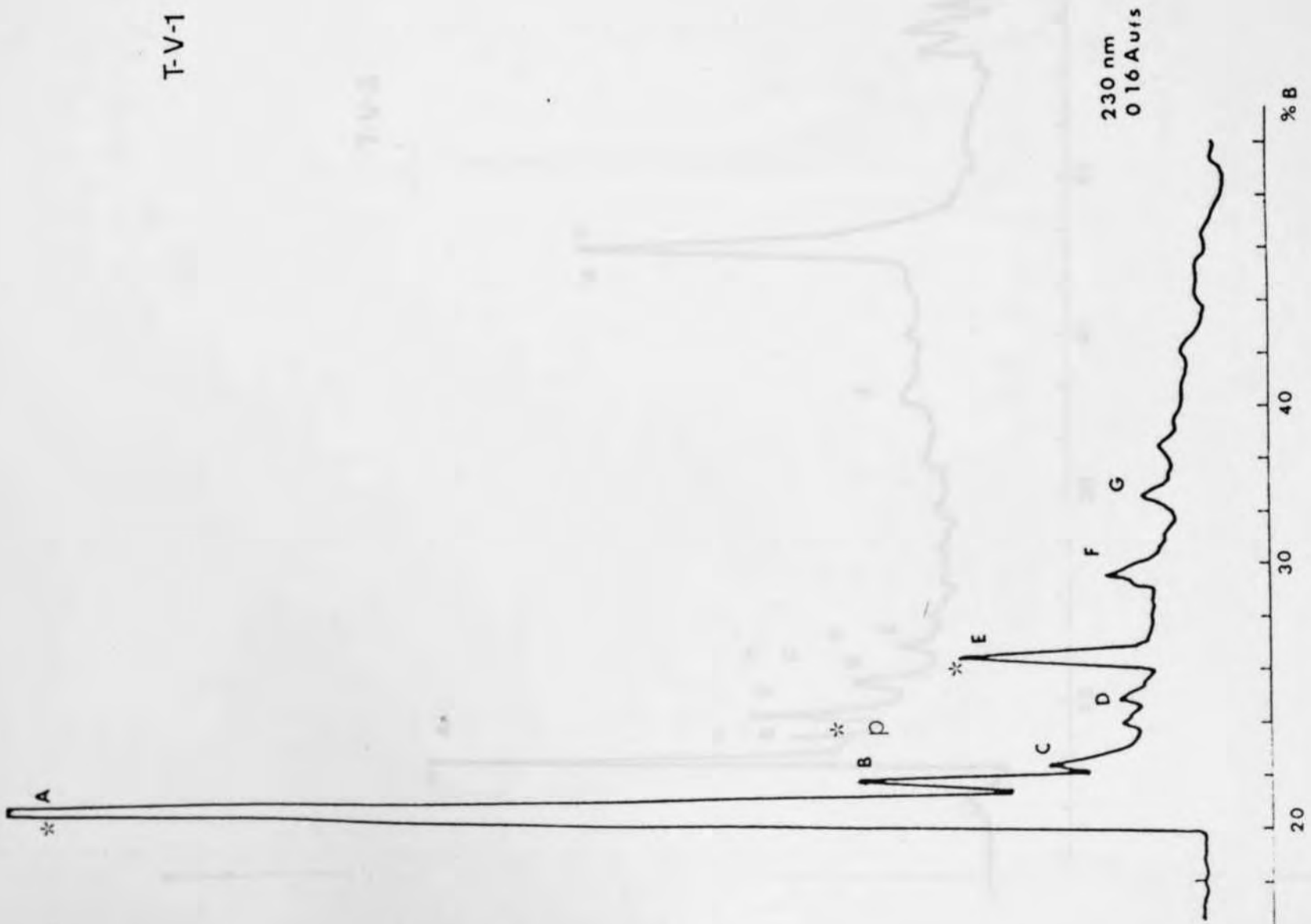
T-IV-3



T-V-2

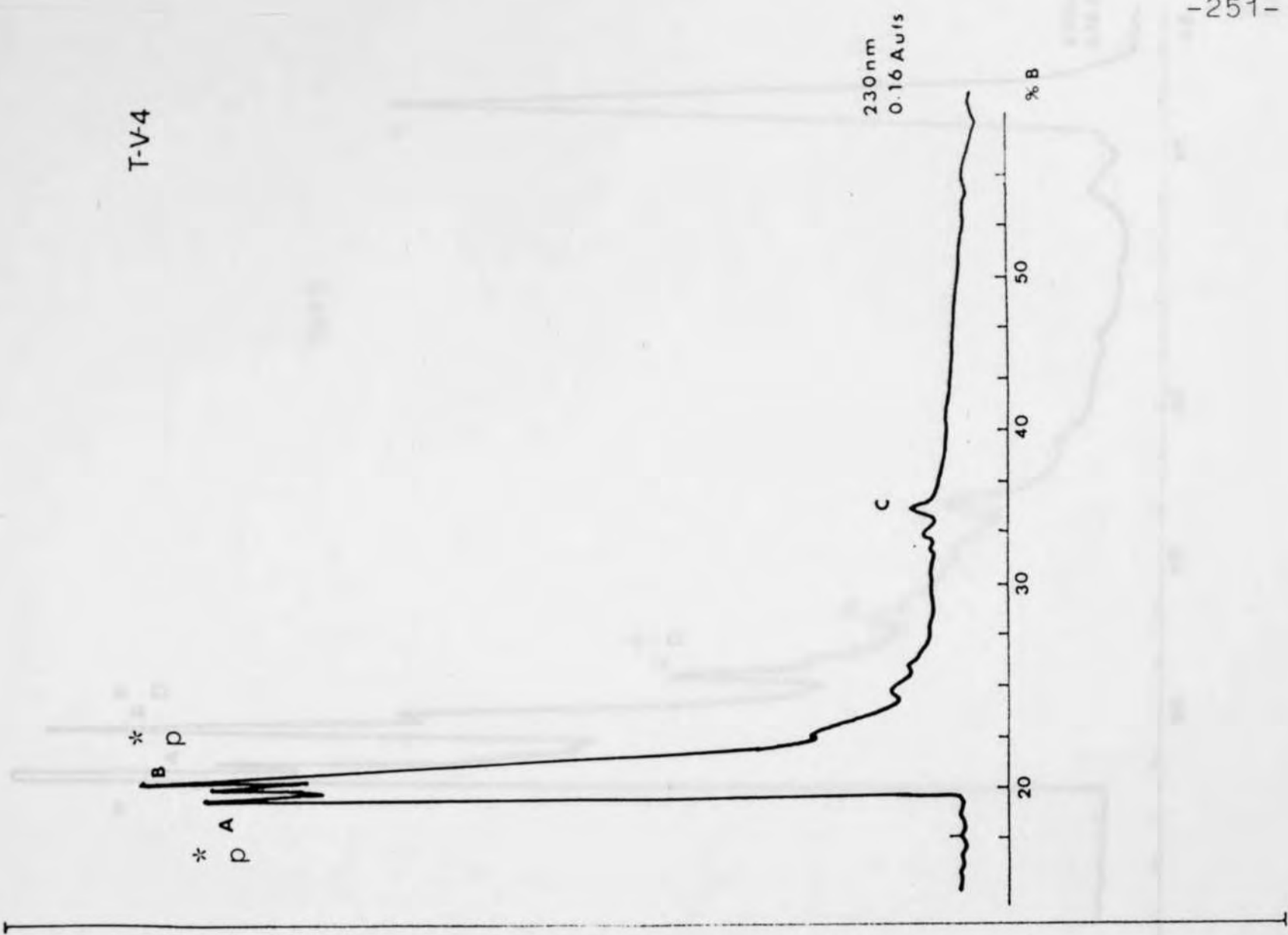


T-V-1

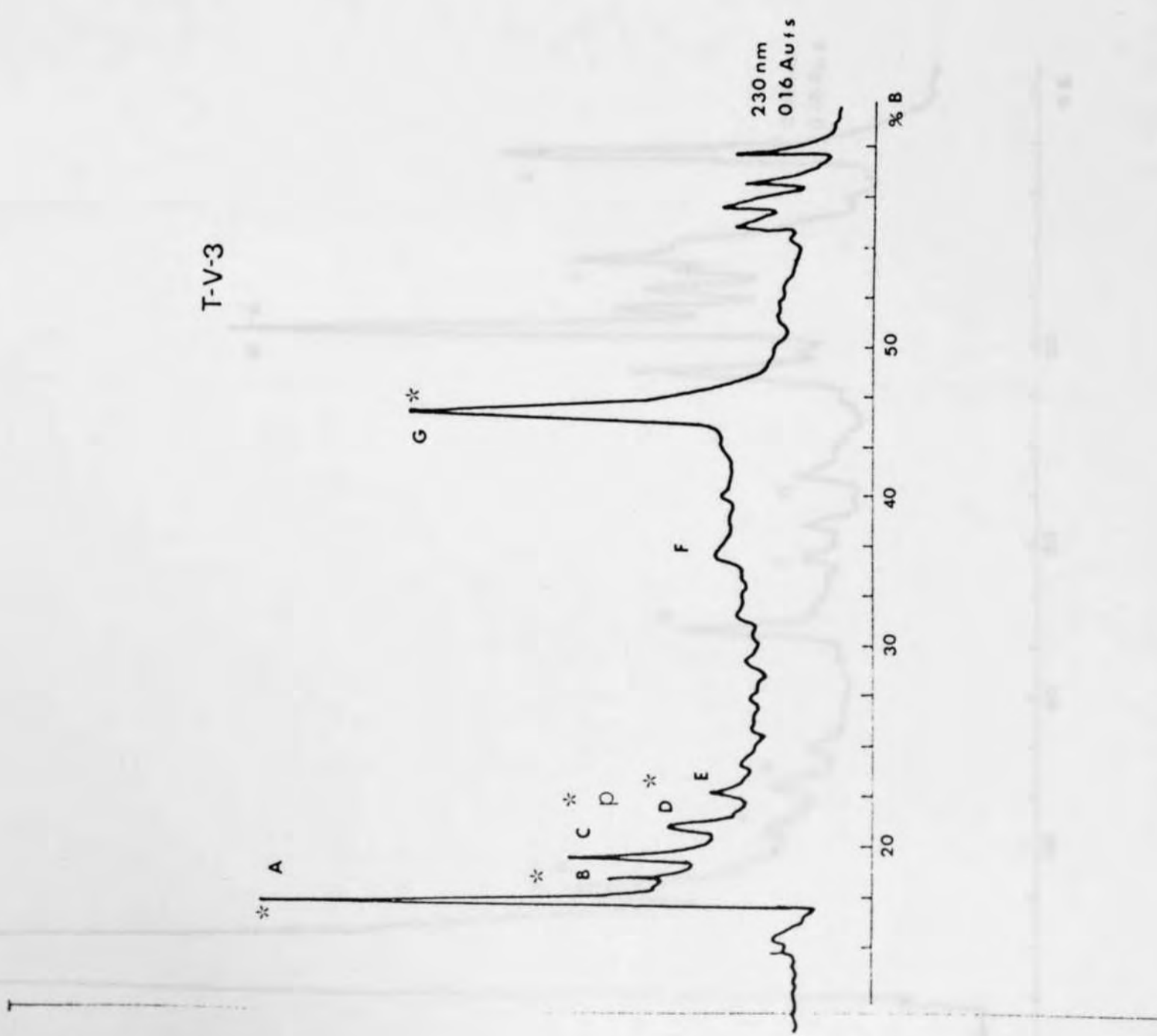


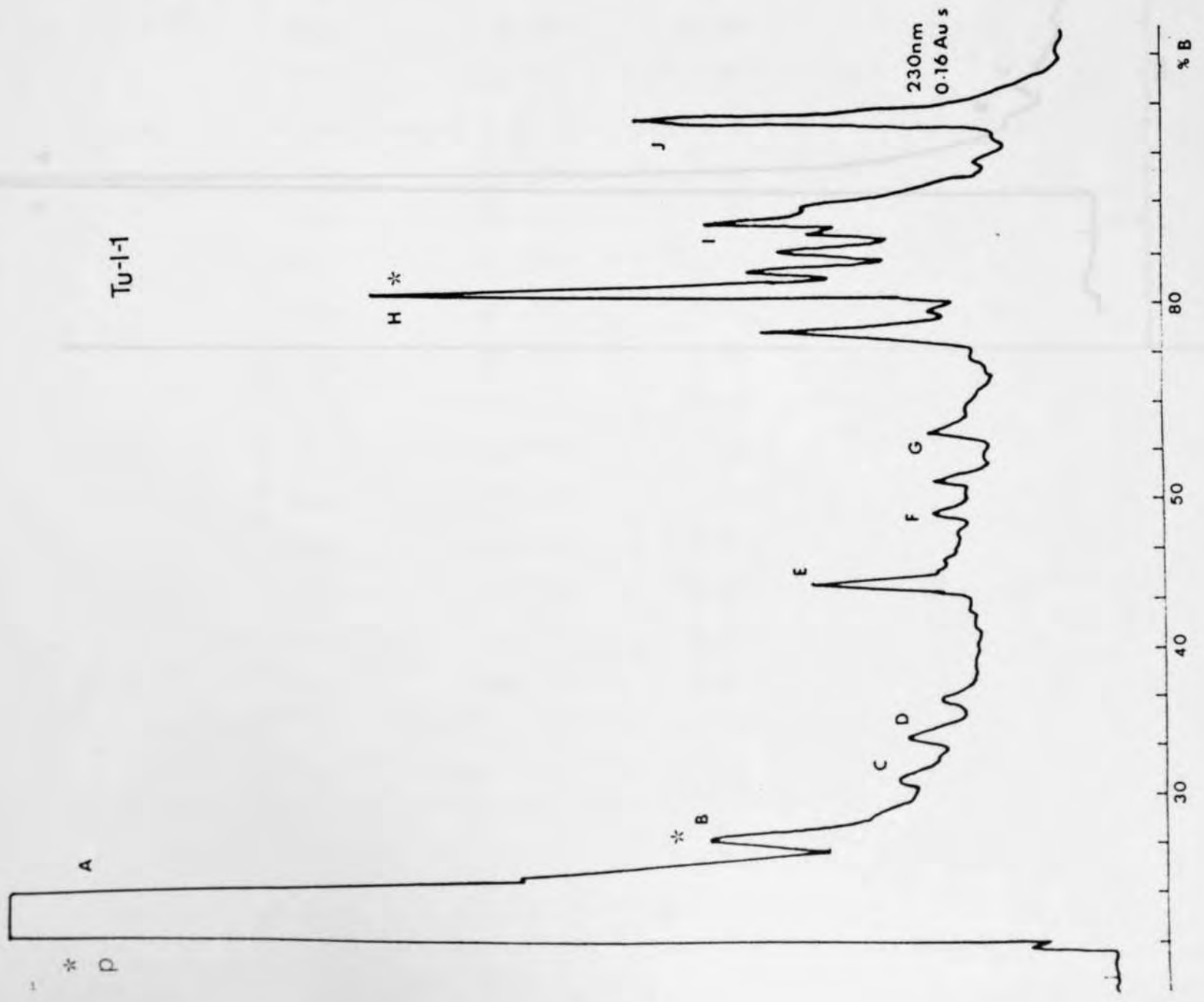
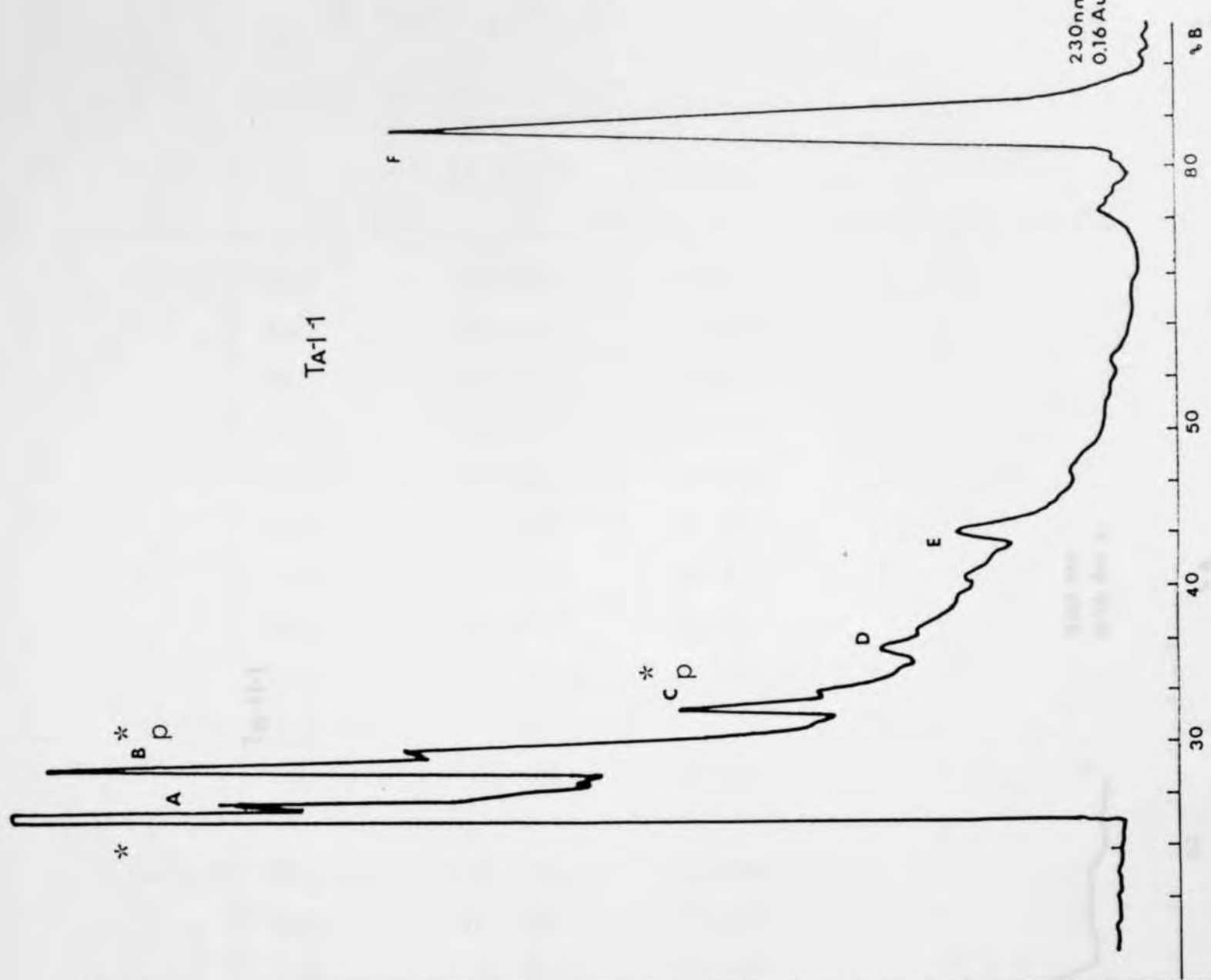


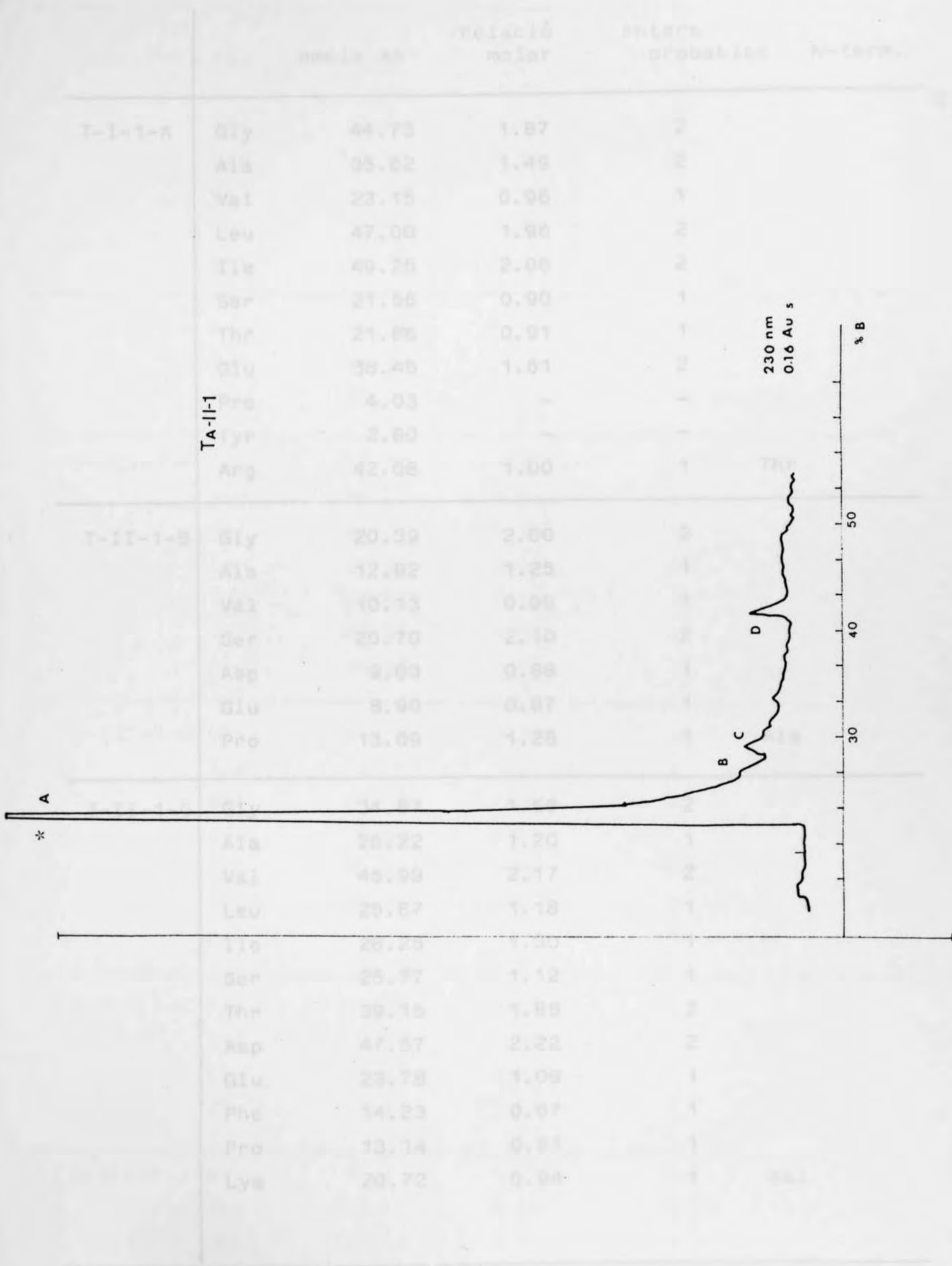
T-V-4



T-V-3







|          | Ala | nmols AA | relació<br>molar | enters<br>probables | N-term. |
|----------|-----|----------|------------------|---------------------|---------|
| T-I-1-A  | Gly | 44.73    | 1.87             | 2                   |         |
|          | Ala | 35.62    | 1.49             | 2                   |         |
|          | Val | 23.15    | 0.96             | 1                   |         |
|          | Leu | 47.00    | 1.96             | 2                   |         |
|          | Ile | 49.25    | 2.06             | 2                   |         |
|          | Ser | 21.56    | 0.90             | 1                   |         |
|          | Thr | 21.86    | 0.91             | 1                   |         |
|          | Glu | 38.45    | 1.61             | 2                   |         |
|          | Pro | 4.03     | -                | -                   |         |
|          | Tyr | 2.80     | -                | -                   |         |
|          | Arg | 42.08    | 1.00             | 1                   | Thr     |
| T-II-1-B | Gly | 20.39    | 2.00             | 2                   |         |
|          | Ala | 12.92    | 1.25             | 1                   |         |
|          | Val | 10.13    | 0.99             | 1                   |         |
|          | Ser | 20.70    | 2.10             | 2                   |         |
|          | Asp | 9.03     | 0.88             | 1                   |         |
|          | Glu | 8.90     | 0.87             | 1                   |         |
|          | Pro | 13.09    | 1.28             | 1                   | Ala     |
| T-II-1-G | Gly | 34.87    | 1.65             | 2                   |         |
|          | Ala | 26.22    | 1.20             | 1                   |         |
|          | Val | 45.99    | 2.17             | 2                   |         |
|          | Leu | 25.87    | 1.18             | 1                   |         |
|          | Ile | 28.25    | 1.30             | 1                   |         |
|          | Ser | 25.77    | 1.12             | 1                   |         |
|          | Thr | 39.15    | 1.85             | 2                   |         |
|          | Asp | 47.57    | 2.22             | 2                   |         |
|          | Glu | 23.78    | 1.08             | 1                   |         |
|          | Phe | 14.23    | 0.67             | 1                   |         |
|          | Pro | 13.14    | 0.61             | 1                   |         |
|          | Lys | 20.72    | 0.94             | 1                   | Val     |

|           |     |       |      |      |        |
|-----------|-----|-------|------|------|--------|
| T-II-2-E  | Ala | 44.32 | 2.50 | 3    |        |
|           | Leu | 19.10 | 1.03 | 1    |        |
|           | Ile | 31.34 | 1.70 | 2    |        |
|           | Asp | 34.93 | 1.89 | 2    |        |
|           | Glu | 17.74 | 0.96 | 1    |        |
|           | Pro | 12.65 | 0.68 | 1    |        |
|           | His | 11.12 | 0.60 | 1    | Ile    |
| T-III-1-A | Gly | 16.02 |      | ?    |        |
|           | Ser | 14.13 |      | ?    |        |
|           | His | 52.90 |      | 1(?) | bàsics |
| T-III-1-F | Gly | 37.66 | 1.22 | 1    |        |
|           | Ala | 66.25 | 2.15 | 2    |        |
|           | Val | 34.07 | 1.11 | 1    |        |
|           | Leu | 27.02 | 0.88 | 1    |        |
|           | Ile | 27.31 | 0.89 | 1    |        |
|           | Thr | 59.21 | 1.92 | 2    |        |
|           | Pro | 40.43 | 1.00 | 1    | Leu    |
| T-III-1-G | Gly | 13.15 | 1.14 | 1    |        |
|           | Ala | 18.76 | 1.62 | 2    |        |
|           | Val | 12.96 | 1.12 | 1    |        |
|           | Leu | 9.92  | 0.85 | 1    |        |
|           | Ile | 10.27 | 0.89 | 1    |        |
|           | Thr | 18.44 | 1.59 | 2    |        |
|           | Pro | 7.67  | 0.66 | 1    | Leu    |
| T-III-1-H | Ala | 15.89 | 1.84 | 2    |        |
|           | Val | 9.50  | 1.10 | 1    |        |
|           | Leu | 7.54  | 0.87 | 1    |        |
|           | Ile | 8.81  | 1.02 | 1    | Leu    |
| T-III-1-J | Gly | 15.02 | 1.07 | 1    |        |
|           | Ala | 10.41 | 0.74 | 1    |        |
|           | Val | 15.93 | 1.13 | 1    |        |
|           | Ser | 14.36 | 1.02 | 1    |        |
|           | Glu | 14.61 | 1.04 | 1    |        |
|           | Pro | 22.04 | 1.57 | 1-2  |        |

|           |             |       |      |   |     |
|-----------|-------------|-------|------|---|-----|
|           | His         | 9.50  | 0.67 | 1 |     |
|           | Lys         | 12.95 | 0.92 | 1 | --- |
| T-III-2-E | Gly         | 11.74 | 1.00 | 1 |     |
|           | Val         | 10.65 | 0.90 | 1 |     |
|           | Leu         | 12.81 | 1.09 | 1 |     |
|           | Ile         | 12.22 | 1.04 | 1 |     |
|           | Asp         | 37.49 | 3.10 | 3 |     |
|           | Phe         | 22.22 | 1.89 | 2 |     |
|           | Lys         | T     | T    | 1 | Phe |
| T-III-2-F | Gly         | 13.19 | 1.00 | 1 |     |
|           | Asp         | 14.80 | 1.13 | 1 |     |
|           | Glu         | 11.30 | 0.86 | 1 |     |
|           | Lys         | 14.37 | 1.09 | 1 | --- |
| T-III-2-G | Leu         | 15.69 | 0.96 | 1 |     |
|           | Asp         | 33.01 | 2.03 | 2 |     |
|           | Lys         | T     | T    | 1 | Asp |
| T-III-2-H | Gly         | 13.32 | 1.14 | 1 |     |
|           | Ala         | 9.72  | 0.83 | 1 |     |
|           | Val         | 10.02 | 0.85 | 1 |     |
|           | Leu         | 10.65 | 0.91 | 1 |     |
|           | Ile         | 9.99  | 0.85 | 1 |     |
|           | Ser         | 10.49 | 0.89 | 1 |     |
|           | Asp         | 25.55 | 2.19 | 2 |     |
|           | Glu         | 10.27 | 0.88 | 1 | Val |
|           | Lys         | T     | T    | T | Asp |
| T-III-2-I | = T-III-2-H |       |      |   |     |
| T-III-3-C | Gly         | 98.99 | 4.90 | 5 |     |
|           | Ile         | 42.20 | 2.09 | 2 |     |
|           | Asp         | 75.51 | 3.74 | 4 |     |
|           | Pro         | 18.34 | 0.90 | 1 | Gly |

|           |     |       |      |      |     |
|-----------|-----|-------|------|------|-----|
| T-III-3-D | Gly | 47.74 | 1.23 | 1    |     |
|           | Leu | 70.38 | 1.82 | 2    |     |
|           | Asp | 74.74 | 1.92 | 2    |     |
|           | Pro | ?     | ?    | 1(?) |     |
|           | Arg | 41.10 | 0.93 | 1    | Asp |
| T-III-4-B | Gly | 20.21 | 0.92 | 1    |     |
|           | Ala | 39.86 | 1.78 | 2    |     |
|           | Ile | 18.94 | 0.86 | 1    |     |
|           | Ser | 26.10 | 1.19 | 1    |     |
|           | Asp | 25.03 | 1.14 | 1    |     |
|           | His | 18.88 | 0.86 | 1    |     |
| T-III-4-I | Ala | 16.34 | 1.23 | 1    |     |
|           | Leu | 12.44 | 0.93 | 1    |     |
|           | Ile | 10.84 | 0.81 | 1    |     |
|           | Thr | 10.20 | 0.76 | 1    |     |
|           | Asp | 18.22 | 1.37 | 1    |     |
|           | Glu | 11.93 | 0.89 | 1    |     |
|           | Lys | 9.80  | 1    | 1    | Ile |
| T-III-4-J | Gly | 12.85 | 1.13 | 1    |     |
|           | Ala | 11.23 | 0.99 | 1    |     |
|           | Ser | 13.39 | 1.18 | 1    |     |
|           | Asp | 12.78 | 1.12 | 1    |     |
|           | Glu | 9.83  | 0.86 | 1    | Ala |
| T-III-5-B | Val | 34.45 | 0.93 | 1    |     |
|           | Ile | 37.97 | 1.02 | 1    |     |
|           | Glu | 75.19 | 2.03 | 2    |     |
|           | Lys | 1     | 1    | 1    | Glu |
| T-III-5-E | Gly | 17.02 | 1.15 | 1    |     |
|           | Ala | 14.32 | 0.96 | 1    |     |
|           | Ser | 14.34 | 0.97 | 1    |     |
|           | Asp | 15.65 | 1.05 | 1    |     |
|           | Glu | 18.53 | 1.25 | 1    |     |
|           | Lys | 11.97 | 0.81 | 1    |     |
|           | Phe | ?     | ?    | 1(?) |     |

|           |            |        |      |     |     |
|-----------|------------|--------|------|-----|-----|
| T-III-5-F | Ala        | 81.27  | 2.66 | 3   |     |
|           | Leu        | 27.73  | 0.90 | 1   |     |
|           | Ile        | 49.26  | 1.61 | 2   |     |
|           | Asp        | 65.03  | 2.12 | 2   |     |
|           | Glu        | 33.37  | 1.09 | 1   |     |
|           | Pro        | 31.65  | 1.03 | 1   |     |
|           | Lys        | 30.43  | 0.99 | 1   | Ile |
| T-III-5-G | Ala        | 13.05  | 0.99 | 1   |     |
|           | Leu        | 11.37  | 0.84 | 1   |     |
|           | Glu        | 15.69  | 1.15 | 1   |     |
|           | Lys        | T      | T    | 1   | Glu |
| T-III-6-B | Ala        | 114.77 | 1.93 | 2   |     |
|           | Ile        | 63.37  | 1.06 | 1   |     |
|           | Asp        | 64.53  | 1.08 | 1   |     |
|           | Glu        | 55.47  | 0.93 | 1   |     |
|           | Lys        | 39.73  | 0.66 | 1   | Ala |
| T-IV-1-D  | Gly        | 19.18  | 2.02 | 2   |     |
|           | Ala        | 17.97  | 1.90 | 2   |     |
|           | Ser        | 33.72  | 3.56 | 3-4 |     |
|           | Asp        | 11.75  | 1.24 | 1   |     |
|           | Glu        | 8.32   | 0.88 | 1   |     |
|           | Lys        | 8.28   | 0.87 | 1   |     |
| T-IV-2-F  | Ala        | 43.77  | 3.46 | 3-4 |     |
|           | Leu        | 22.27  | 1.60 | 2   |     |
|           | Ser        | 26.67  | 1.92 | 2   |     |
|           | Thr        | 12.52  | 0.90 | 1   |     |
|           | Asp        | 14.70  | 1.06 | 1   |     |
|           | Phe        | 11.35  | 0.82 | 1   |     |
|           | Lys        | 16.64  | 1.20 | 1   | Ala |
| T-IV-2-E  | = T-IV-2-F |        |      |     |     |
| T-IV-3-C  | Gly        | 22.04  | 1.38 | 1   |     |
|           | Ile        | 32.27  | 2.03 | 2   |     |
|           | Ser        | 17.48  | 1.09 | 1   |     |
|           | Thr        | 14.35  | 0.90 | 1   |     |

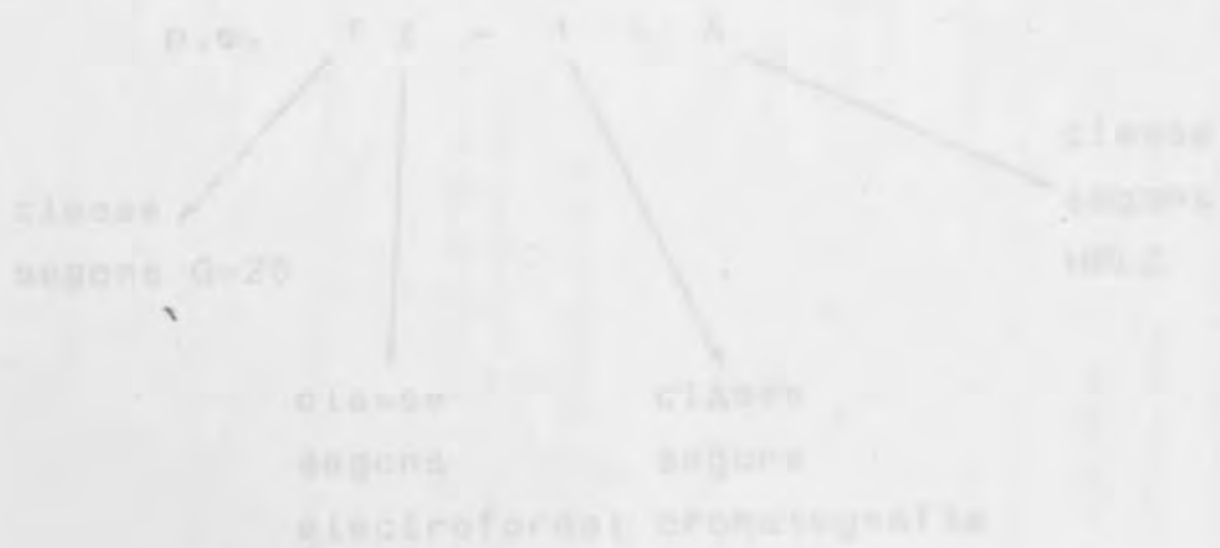


|                        |     |       |      |     |          |
|------------------------|-----|-------|------|-----|----------|
|                        | Asp | 19.34 | 1.21 | 1   |          |
|                        | Pro | 18.07 | 1.13 | 1   |          |
|                        | Lys | 13.38 | 0.84 | 1   | Ser      |
| T-V-1-B                | Leu | 9.35  | 1.70 | 2   |          |
|                        | Lys | 5.49  | 1    | 1   | Leu      |
| T-V-2-C                | Val | 9.75  | 1.01 | 1   |          |
|                        | Leu | 12.33 | 1.28 | 1   |          |
|                        | Thr | 19.07 | 1.98 | 2   |          |
|                        | Lys | 8.27  | 0.86 | 1   |          |
|                        | His | 8.40  | 0.87 | 1   | Thr      |
| T-V-4-A                | Gly | 52.87 | 1.06 | 1   |          |
|                        | Ser | 49.06 | 0.98 | 1   |          |
|                        | Pro | 40.97 | 0.82 | 1   |          |
|                        | Lys | 55.87 | 1.12 | 1   |          |
| T-V-4-B                | Gly | 31.97 | 0.92 | 1   |          |
|                        | Ala | 29.18 | 0.84 | 1   |          |
|                        | Ile | 16.45 | ---  | -   |          |
|                        | Ser | 22.55 | 0.65 | 1   |          |
|                        | Asp | 17.78 | ---  | -   |          |
|                        | Pro | 38.94 | 1.13 | 1   |          |
|                        | Lys | 39.58 | 1.15 | 1   | Pro(Gly) |
| T <sub>A</sub> -II-1-B | Val | 16.33 | 0.91 | 1   |          |
|                        | Leu | 28.43 | 1.64 | 1-2 |          |
|                        | Thr | 25.81 | 1.44 | 1   |          |
|                        | His | ---   | ---  | 1   | Thr      |
| T <sub>A</sub> -II-1-C | Val | 13.33 | 1.02 | 1   |          |
|                        | Leu | 18.27 | 1.40 | 1   |          |
|                        | Thr | 20.98 | 1.61 | 2   |          |
|                        | His | 12.60 | 0.97 | 1   | Thr      |

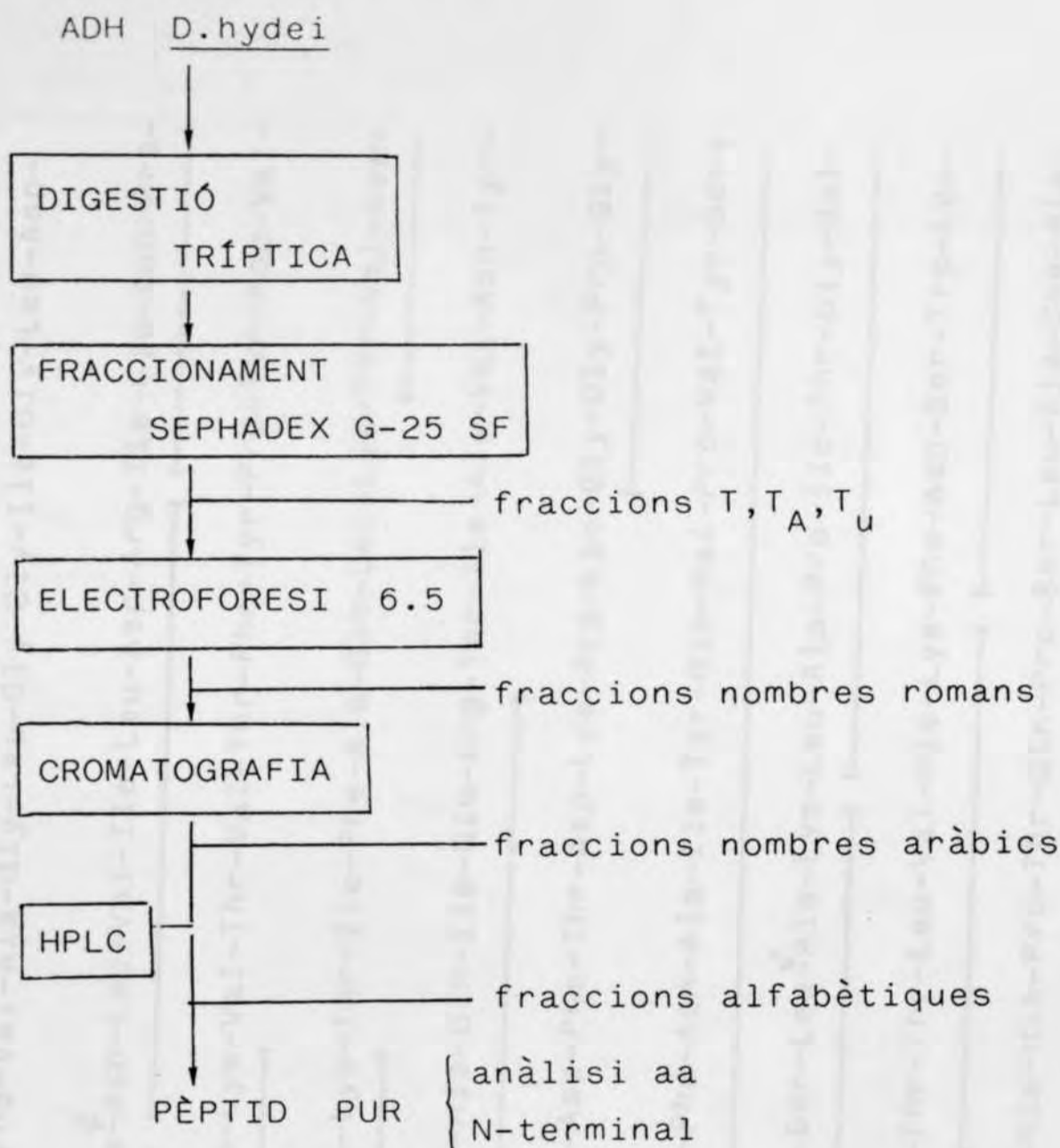
|                       |     |       |      |      |     |
|-----------------------|-----|-------|------|------|-----|
| T <sub>U</sub> -I-1-A | Gly | 35.09 | 2.59 | 2-3  |     |
|                       | Ala | 15.32 | 1.13 | 1    |     |
|                       | Ser | 12.54 | 0.92 | 1    |     |
|                       | Asp | 15.33 | 1.13 | 1    |     |
|                       | Glu | 11.01 | 0.81 | 1    |     |
|                       | Pro | 7.66  | 0.56 | 1    |     |
|                       | Lys | 8.91  | 0.65 | 1    |     |
|                       | Cys | ?     | ?    | 1(?) | Glu |

TAULA 6.9. Anàlisi d'aminoàcids i N-terminal detectats en els pèptids obtinguts després de cromatografia HPLC, il·lustrats en els cromatogrames de la figura 6.9.

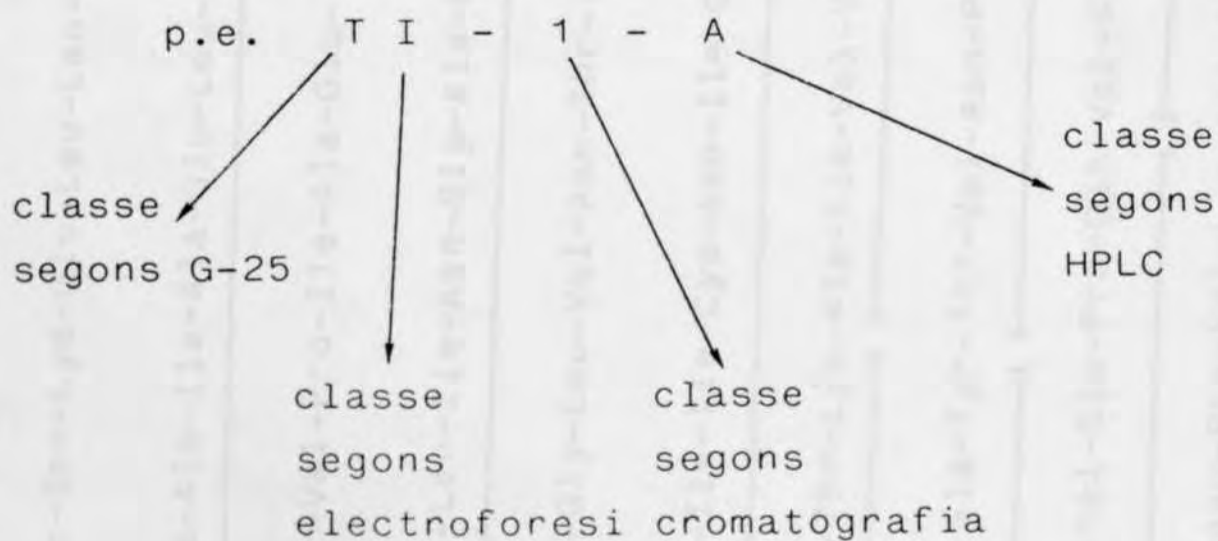
Per tant, la nomenclatura del pèptid s'ha d'interpretar



TAULA 6.10. Esquema dels mètodes de fraccionament aplicats per a l'obtenció dels pèptids purificats.



Així doncs, la nomenclatura del pèptid s'ha d'interpretar:



TAULA 6.10. Esquema dels mètodes de fraccionament seguits per a l'obtenció dels pèptids purs.

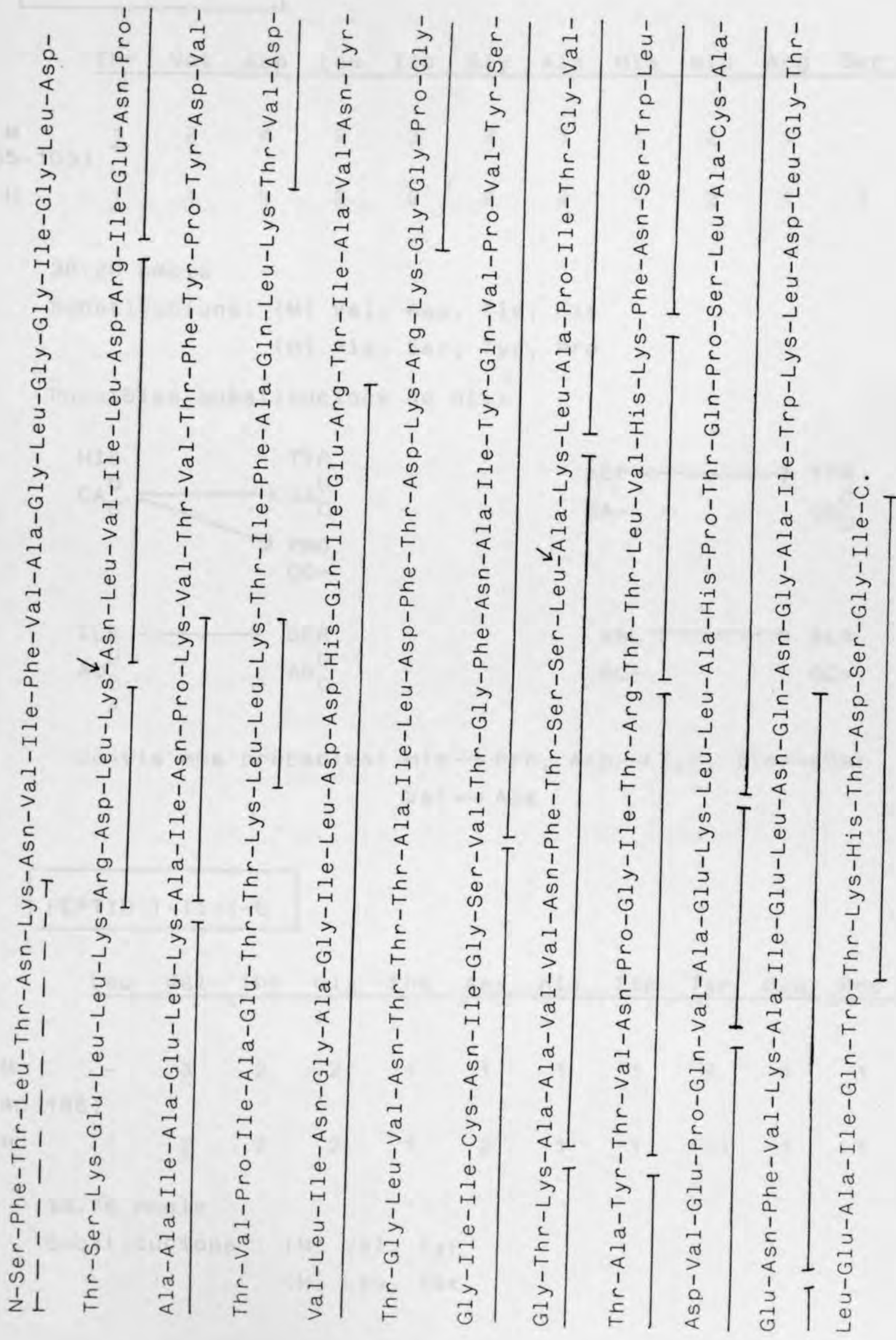


FIGURA 6.11. Seqüència de l'ADH de D.melanogaster<sup>s</sup> (Thatcher, 1980). S'hi han indicat els pèptids localitzats a D.hydei.

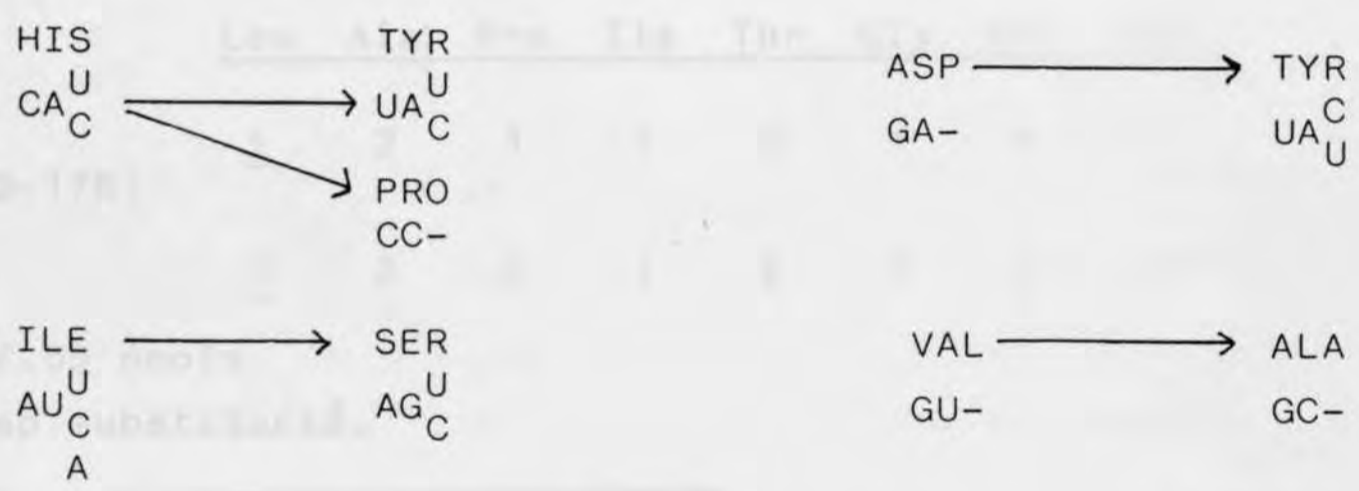
PÈPTID T-I-1-A

|               | Thr      | Val | Asp | Leu | Ile | Gly | Ala | His | Glu | Arg | Ser | Tyr | Pro |
|---------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| M<br>(85-103) | <u>1</u> | 2   | 4   | 2   | 3   | 2   | 1   | 1   | 2   | 1   | -   | -   | -   |
| H             | <u>1</u> | 1   | 3   | 2   | 2   | 2   | 2   | -   | 2   | 1   | 1   | 1   | 1   |

38.20 nmols

Substitucions: (M) Val, Asp, Ile, His  
 (H) Ala, Ser, Tyr, Pro

Possibles substitucions de nt.:



Canvis més probables: His → Pro, Asp → Tyr, Ile → Ser  
 Val → Ala

PÈPTID T-II-1-G

|                | Leu | Val      | Thr | Gly | Phe | Asx | Ala | Ile | Tyr | Glu | Pro | Ser | Lys |
|----------------|-----|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| M<br>(140-156) | -   | <u>3</u> | 2   | 2   | 1   | 1   | 1   | 1   | 2   | 1   | 1   | 1   | 1   |
| H              | 1   | <u>2</u> | 2   | 2   | 1   | 2   | 1   | 1   | (1) | 1   | 1   | 1   | 1   |

33.76 nmols

Substitucions : (M) Val, Tyr  
 (H) Leu, Asx

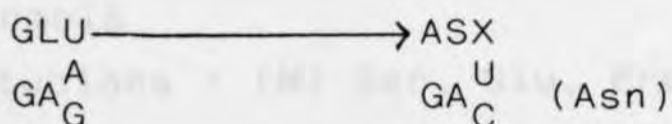


PÈPTID T-II-2-E = T-III-5-F

|              | Ile      | Glx | Asx | Pro | Ala | Leu | Lys |
|--------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| M<br>(40-50) | <u>2</u> | 2   | 1   | 1   | 3   | 1   | 1   |
| H            | <u>2</u> | 1   | 2   | 1   | 3   | 1   | 1   |

29.47 nmols

Substitucions: (M) Glu, (H) Asx



PÈPTID T-III-1-F = T-III-1-G

|                | Leu      | Ala | Pro | Ile | Thr | Gly | Val | Tyr |
|----------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| M<br>(169-178) | <u>1</u> | 2   | 1   | 1   | 2   | 1   | 1   | 1   |
| H              | <u>1</u> | 2   | 1   | 1   | 2   | 1   | 1   | 1   |

67.55 nmols

Cap substitució.

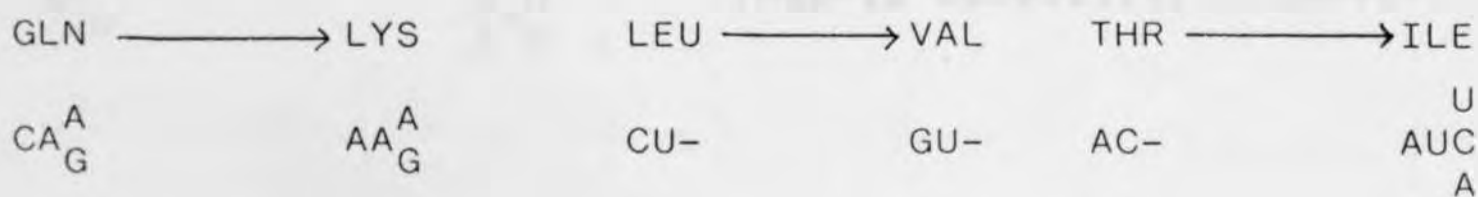
PÈPTID T-III-1-H = T-III-1-J

|                | Leu      | Ala | His | Pro | Thr | Glx | Ser | Cys | Lys | Val | Ile | Gly |
|----------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| M<br>(207-220) | <u>3</u> | 3   | 1   | 2   | 1   | 2   | 1   | 1   | -   | -   | -   | -   |
| H              | <u>1</u> | 3   | 1   | 2   | -   | 1   | 1   | (?) | 1   | 2   | 1   | 1   |

24.03 nmols

Substitucions: (M) : Leu (x2), Thr, Gln

(H) : Lys, Val, Ile, Gly



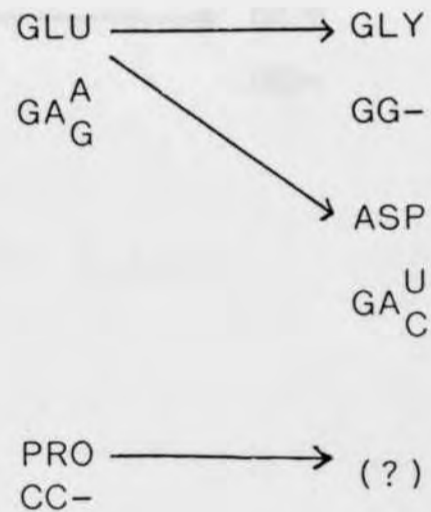
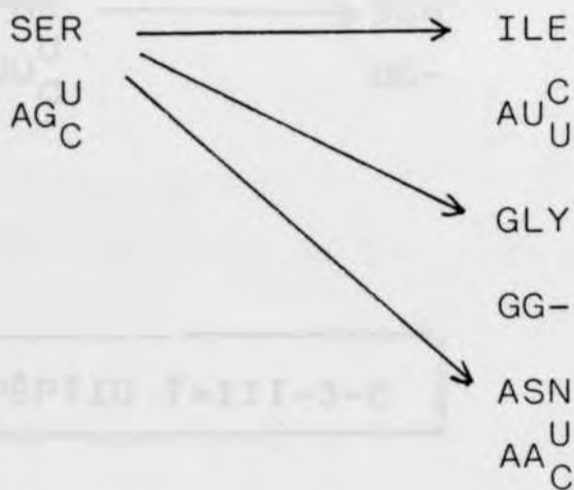
**PÈPTID T-III-2-E**

|                | Phe      | Asx | Ser | Trp | Leu | Val | Glu | Pro | Lys | Gly | Ile |
|----------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| M<br>(193-203) | <u>1</u> | 2   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | -   | -   |
| H              | <u>1</u> | 3   | -   | ?   | 1   | 1   | -   | -   | 1   | 1   | 1   |

20.91 nmols

Substitucions : (M) Ser, Glu, Pro

(H) Asx, Gly, Ile



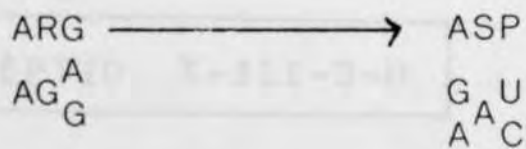
**PÈPTID T-III-3-C**

**PÈPTID T-III-2-G**

|              | Asp      | Leu | Lys | Arg |
|--------------|----------|-----|-----|-----|
| M<br>(29-33) | <u>1</u> | 1   | 1   | 1   |
| H            | <u>2</u> | 1   | 1   | -   |

26 nmols:

Substitucions: (M) Arg, (H) Asp



(Hauria necessitat 2 canvis.)

**PÈPTID T-III-2-H**

Asx Phe Val Lys Ala Ile Glu Leu Gly Ser

|                |          |   |   |    |   |   |   |   |   |   |
|----------------|----------|---|---|----|---|---|---|---|---|---|
| M<br>(221-230) | <u>2</u> | 1 | 1 | 1  | 1 | 1 | 2 | 1 | - | - |
| H              | <u>2</u> | - | 1 | 1≠ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

**PÈPTID T-III-2-B**

18.56 nmols

Substitucions: (M) Phe, Glu  
(H) Gly, Ser ( Lys Glu)



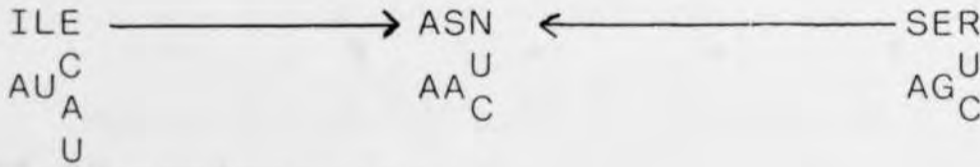
**PÈPTID T-III-3-C**

Gly Pro Ile Cys Asp Ser

|                |          |   |   |      |   |   |
|----------------|----------|---|---|------|---|---|
| M<br>(128-139) | <u>5</u> | 1 | 3 | 1    | 1 | 1 |
| H              | <u>5</u> | 1 | 2 | 1(?) | 3 | - |

32.28 nmols

Substitucions: (M) Ile, Ser (H) Asx



**PÈPTID T-III-3-D**

Asx Leu Val Ile Arg Gly Pro

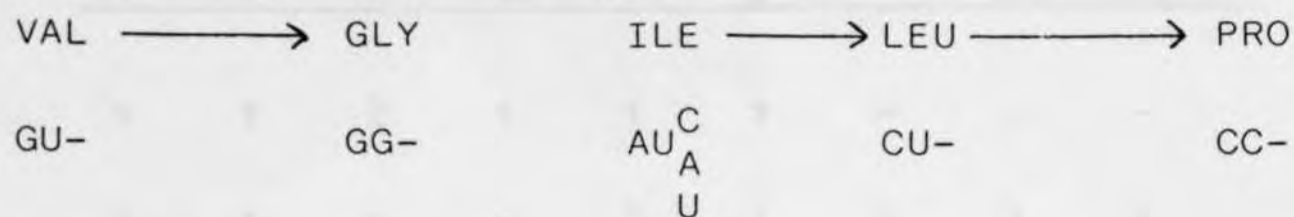
|              |          |   |   |   |   |   |   |
|--------------|----------|---|---|---|---|---|---|
| M<br>(33-39) | <u>2</u> | 2 | 1 | 1 | 1 | - | - |
| H            | <u>2</u> | 2 | - | - | 1 | 1 | 1 |

61.71 nmols





Substitucions: (M) Val, Ile (H) Gly, Pro



**PÈPTID T-III-4-B**

Ile Gly Ser Asp Trp His Lys Thr Ala

M (248-254)

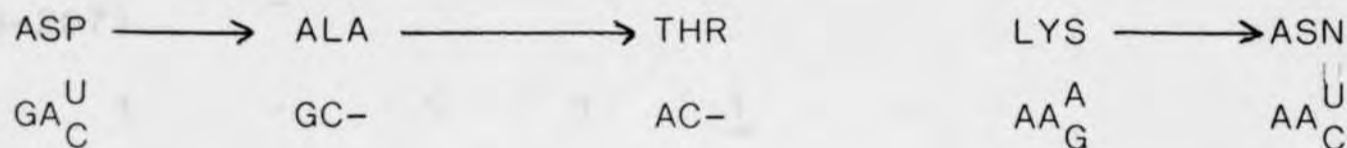
1 1 1 1 1 1 1 1 1 -

H 1 1 1 1 ? 1 - - 2

31.58 nmols

Per anàlisi de C-terminal de l'ADH de D.hydei :

Ile--Gly--Ser-- Ala--



**PÈPTID T-III-5-B**

Ala Ile Asp Pro Lys Glu Val

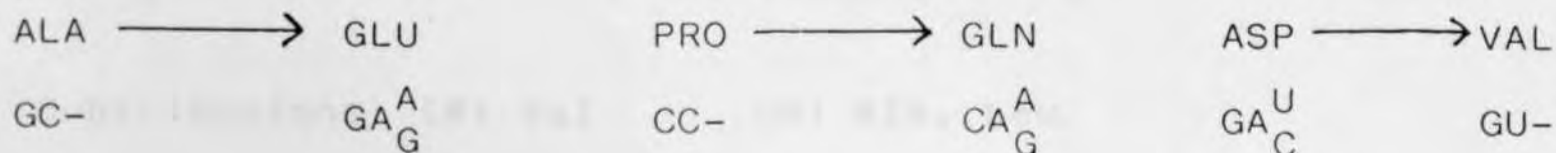
M (51-55) 1 1 1 1 1 - -

H - 1 - - 1 2 1

57.93 nmols

Substitucions: (M) Ala, Asp, pro

(H) Val, Glu (x2)



PÈPTID T-III-5-E

|         | Ser | Phe | Thr | Leu | Asn | Lys | Glu | Ala | Gly |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| M (1-7) | 1   | 1   | 2   | 1   | 1   | 1   | -   | -   | -   |
| H       | 1   | 1   | -   | -   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   |

Substitucions: (M) Thr (x2), Leu

(H) Glu, Ala, Gly

THR → ALA  
AC- → GC-

LEU → GLN  
CU- → CA<sup>A</sup><sub>G</sub>

PÈPTID T-III-5-G

|             | Glu | Val | Lys | Ala | Leu |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| M (203-207) | 1   | 1   | 1   | 1   | -   |
| H           | 1   | -   | 1   | 1   | 1   |

21.64 nmols

Substitució : (M) Val (H) Leu

VAL → LEU  
GU- → CU-

PÈPTID T-IV-2-E = T-IV-2-F

|             | Ala | Val | Asn | Phe | Thr | Ser | Leu | Lys |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| M (156-168) | 3   | 2   | 1   | 1   | 1   | 2   | 1   | 1   |
| H           | 4   | -   | 1   | 1   | 1   | 2   | 2   | 1   |

Substitucions: (M) Val (H) Ala, Leu

VAL → ALA → LEU  
GU- → GC- → CU-

**PÈPTID T-IV-3-C**

Thr Val Asn Pro Gly Ile Arg Lys Ser

|                |          |   |   |   |   |   |   |   |          |
|----------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|----------|
| M<br>(179-186) | <u>2</u> | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | -        |
| H              | 1        | - | 1 | 1 | 1 | 2 | - | 1 | <u>1</u> |

25.45 nmols

Substitucions: (M) Thr, Val, Arg

(H) Ile, Lys, Ser

THR → SER      ARG → LYS      VAL → ILE

AC-      UC-      AG<sup>A</sup><sub>G</sub>      AA<sup>A</sup><sub>C</sub>      GU-      CU-

**PÈPTID T-V-1-B**

Leu Lys

|              |          |   |
|--------------|----------|---|
| M<br>(75-77) | <u>2</u> | 1 |
| H            | <u>2</u> | 1 |

24.78 nmols

Cap substitució

**PÈPTID T-V-2-C**

Thr Leu Val His His Lys

|                |   |   |   |   |   |   |
|----------------|---|---|---|---|---|---|
| M<br>(187-192) | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| H              | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

15.36 nmols

Cap substitució

Els pèptids T<sub>A</sub>-II-1 , B i C semblen aquest mateix pèptid degradat.

PÈPTIDS NO LOCALITZATS

|                       |     |        |        |         |     |     |     |            |
|-----------------------|-----|--------|--------|---------|-----|-----|-----|------------|
| T-II-1-B              |     | Gly(2) | Asp    | Glu     | Val | Ser | Pro | <u>Ala</u> |
| T-III-2-F             | Lys | Gly    | Asp    | Glu     |     |     |     |            |
| T-III-4-J             |     |        | Gly    | Ser     | Asp | Glu |     | <u>Ala</u> |
| T-III-5-E             | Lys | Phe    | Gly    | Ser     | Asp | Glu |     | <u>Ala</u> |
| T-III-4-I             | Lys | Glu    | Asp    | Ala     | Ile | Thr | Leu |            |
| T-III-6-B             | Lys | Glu    | Asp    | Ala     | Ile |     |     |            |
| T-IV-1-D              | Lys | Gly(2) | Ala(2) | Ser (3) |     |     | Asp | Glu        |
| T-V-4-A               | Lys | Gly    | Ala    | Ser     |     | Pro |     |            |
| T-V-4-B               | Lys | Gly    | Ala    | Ser     |     | Pro |     |            |
| T <sub>U</sub> -I-1-A | Lys | Gly(2) | Ala    | Ser     |     | Pro | Asp | Glu        |

TAULA 6.12. Esquema general de tots els pèptids localitzats, on s'indica el mínim nº de substitucions d'aminoàcids i nucleòtids que ha pogut originar els canvis esmentats.

(Els residus subratllats en cada pèptid representen l'N-terminal).

## PÈPTIDS IDENTIFICATS

|           | nmols recuperats | nº res. | canvis | posició | nºbases | canvis |
|-----------|------------------|---------|--------|---------|---------|--------|
| T-I-1-A   | 38.20            | 19      | 4      | 85-103  | 57      | 4      |
| T-II-1-G  | 33.76            | 17      | 2      | 140-156 | 51      | 2      |
| T-II-2-E  | 29.47            | 11      | 1      | 40-50   | 33      | 1      |
| T-III-1-F | 67.55            | 10      | -      | 169-178 | 30      | -      |
| T-III-1-H | 24.03            | 14      | 4      | 207-220 | 42      | 4      |
| T-III-2-E | 20.91            | 10      | 3      | 193-203 | 30      | 4      |
| T-III-2-G | 26.00            | 4       | 1      | 29-32   | 12      | 2      |
| T-III-2-H | 18.56            | 10      | 4      | 221-230 | 30      | 4      |
| T-III-3-C | 32.28            | 12      | 2      | 128-139 | 36      | 1      |
| T-III-3-D | 61.71            | 7       | 2      | 33-39   | 21      | 3      |
| T-III-4-B | 31.58            | 8       | 3      | 248-254 | 24      | 3      |
| T-III-5-B | 57.93            | 5       | 3      | 51-55   | 15      | 3      |
| T-III-5-G | 21.64            | 4       | 1      | 203-207 | 12      | 1      |
| T-IV-2-E  | 13.91            | 12      | 2      | 156-168 | 36      | 2      |
| T-IV-3-C  | 25.45            | 8       | 3      | 179-186 | 24      | 3      |
| T-V-1-B   | 24.78            | 3       | -      | 75-77   | 9       | -      |
| T-V-2-C   | 15.36            | 6       | -      | 187-192 | 18      | -      |
| total     |                  | 160     | 35     |         | 480     | 38     |
|           |                  | 64%     | 21.8%  |         |         | 7.91%  |

Meitat N-terminal (1-127) ...  $49/127 = 38.5\%$        $12/53 = 22.6\%$   
 Meitat C-terminal (128-254) ..  $111/127 = 87.4\%$        $23/107 = 21.49\%$

TAULA 6.13. Resum de les característiques dels pèptids identificats, i percentatges que representen sobre la molècula total.

7. METABOLISME DELS ALCOHOLS A DROSOPHILA.

- 7.1. LA RESPOSTA BIOLÒGICA A SITUACIONS D'INGESTA D'ALCOHOL.
- 7.2. DETERMINACIÓ DE LA COMPOSICIÓ DEL MEDI NUTRITIU SUPLE-  
MENTAT.
- 7.3. ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES. DESCRIPCIÓ D'UNA ACTIVITAT  
REDUCTÀSICA NADPH-DEPENENT.
- 7.4. CROMATOGRAFIA DE GASOS.
- 7.5. PROVES EXPERIMENTALS.
- 7.6. RECUPERACIÓ DE L'ACTIVITAT ADH DESPRÉS DE TRACTAMENT  
AMB ISOPROPANOL.

7.7. LA RESPOSTA BIOLÒGICA A SITUACIONS D'INGESTA D'ALCOHOL.

7. METABOLISME DELS ALCOHOLS A DROSOPHILA.

7.1. LA RESPOSTA BIOLÒGICA A SITUACIONS D'INGESTA D'ALCOHOL.

7.2. DETERMINACIÓ DE LA COMPOSICIÓ DEL MEDI NUTRITIU SUPLE-  
MENTAT.

7.3. ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES. DESCRIPCIÓ D'UNA ACTIVITAT  
REDUCTÀSICA NADPH-DEPENENT.

7.4. CROMATOGRAFIA DE GASOS.

7.5. PROVES EXPERIMENTALS.

7.6. RECUPERACIÓ DE L'ACTIVITAT ADH DESPRÉS DE TRACTAMENT  
AMB ISOPROPANOL.

L'oxidació d'alcohol quan són ingerits o respirats per la mosca, ha centrat l'atenció en aquest punt del problema. Més són els estudis complets que descriuen l'efecte de l'alcohol en l'individu, tant sobre els nivells d'activitat enzimàtica com sobre la capacitat de transformació d'alcohol en diferents metabolites a *Drosophila*. Per una banda s'ha estudiat l'efecte de l'alcohol sobre l'activitat de l'enzim ADH, "in vivo", després de la ingesta d'isopropanol a dosis letals, tal que transcorre paral·lelament a la interconversió de bandes dels diferents isozims (Lopez, 1979; Vilageliu, 1981). D'altra banda, s'ha intentat estudiar les vies metabòliques que desenvolupa el cel·lular en la degradació del etanol al metabolisme intermediari, ja que es veu que l'enzim ADH i els seus isozims tenen un rol clau en la degradació de l'alcohol. El problema de la metabolització i detoxificació de l'alcohol a *Drosophila* és un problema encara obert i en el qual s'ha desenvolupat un programa de recerca. Vilageliu (1981), després de estudiar que es produïen en individus de les espècies *D. obscura* i *D. melanogaster* quan es desenvolupava a partir de l'isopropanol, ha demostrat que l'isopropanol és tòxic a dosis letals. Després de l'estudi de la toxicitat de l'isopropanol en la viabilitat de les mosques, tant en larves com en adults, l'isopropanol causava la interconversió d'isozims

## 7.1. LA RESPOSTA BIOLÒGICA A SITUACIONS D'INGESTA D'ALCOHOL.

Un dels propòsits bàsics en abordar aquest camp d'estudis va ésser el d'intentar trobar algun indicatiu de les veritables funcions que se li poden atribuir a l'enzim ADH en l'organisme de Drosophila. Ja que l'enzim ADH hi és constitutiu, cal adjudicar-li alguna funció important en el metabolisme cel·lular. En la introducció hom ha comentat ja les principals funcions de les quals s'ha fet responsable a aquest enzim. Com que, si alguna qüestió està clara en aquest camp és que l'ADH actua sobre l'oxidació d'alcohols quan són ingerits o respirats per la mosca, hom ha centrat l'atenció en aquest punt del problema. Pocs són els estudis complets que descriuen l'efecte de l'alcohol en l'individu, tant sobre els nivells d'activitat enzimàtica com de cinètica de transformació d'alcohols en diferents metabolits a Drosophila. Per una banda ha estat molt estudiat l'efecte d'inhibició de l'enzim ADH, "in vivo", després de la ingesta d'isopropanol o acetona, fet que transcorre paral·lelament a la interconversió de bandes dels diferents isozims (Papell, 1979, Vilageliu, 1981). D'altra banda, s'ha intentat d'estudiar les vies metabòliques que componen tot el camí d'integració del'etanol al metabolisme intermediari, ja que només sembla clarament establert que l'ADH realitza el primer pas: l'oxidació de l'alcohol. El problema de la metabolització i detoxificació de l'acetaldehid a Drosophila és un problema encara obert i no s'han establert els sistemes enzimàtics que hi intervenen. Vilageliu (1981), descriu els efectes que es produeixen en individus de les espècies D. funebris i D. immigrans quan es desenvolupen a partir ja de l'estadi embrionari en medis suplementats amb etanol o isopropanol, en concentracions no letals. Deixant a banda els dràstics efectes en la viabilitat de les mosques, tant en estadi larvari com d'adult, l'isopropanol causava la interconversió d'iso-



zims esperada, desplaçant l'equilibri cap a les formes menys actives, i, per tant, disminuint l'activitat alcoholdehidrogenàsica. Paral·lelament, l'autor va determinar el contingut d'alcohols en el medi suplementat, per establir quin era el ritme de desaparició i aparició dels diferents metabolits i relacionar-lo, sempre que fos possible amb l'activitat ADH. El problema principal apareixia en no poder explicar l'increment secundari que experimenta la concentració d'isopropanol a expenses de l'acetona que s'havia format prèviament per oxidació d'aquell alcohol, ja que l'activitat ADH roman molt deprimida i, a més a més, no es detecta un increment de l'activitat inversa d'aquest enzim, ja de Per se molt minsa.

Per tal de donar resposta a tots aquests interrogants, hom va idear una sèrie d'experiments que es poden esquematitzar en els diagrames 7.1 i 7.2. Individus adults de l'espècie D.hydei, de 3-4 dies d'edat -període de màxima activitat ADH segons Imbersky (1972), mantinguts des del seu naixement en medi normal suplementat amb extracte de llevat liofilitzat, són transferits a vials d'experimentació, en nombre de 10 a 20/vial, segons les condicions que es detallaran en cada cas. Un vial d'experimentació consistia en un tub de vidre, de diàmetre de 3cm. i alçada de 10cm. en el fons del qual s'hi depositava un gruix apropiat de cel·lulosa que s'em-papa amb la dissolució nutritiva utilitzada en cada cas. El vial es tapava hermèticament amb diferents capes de Parafilm. A cada un dels temps apropiats, obrien els vials, a 4°C per reduir l'evaporació dels compostos presents, les mosques s'homogeneitzaven per a les lectures d'activitat enzimàtica i medicions d'alcohols interns, i les cel·luloses eren transferides directament a un vial de cromatografia de gasos (CG), tancat hermèticament i conservat a -40°C fins al moment de la seva anàlisi. Hom detallarà a continuació totes les proves previes que varen portar a l'establiment de les condicions ideals per a la realització d'aquests experiments.

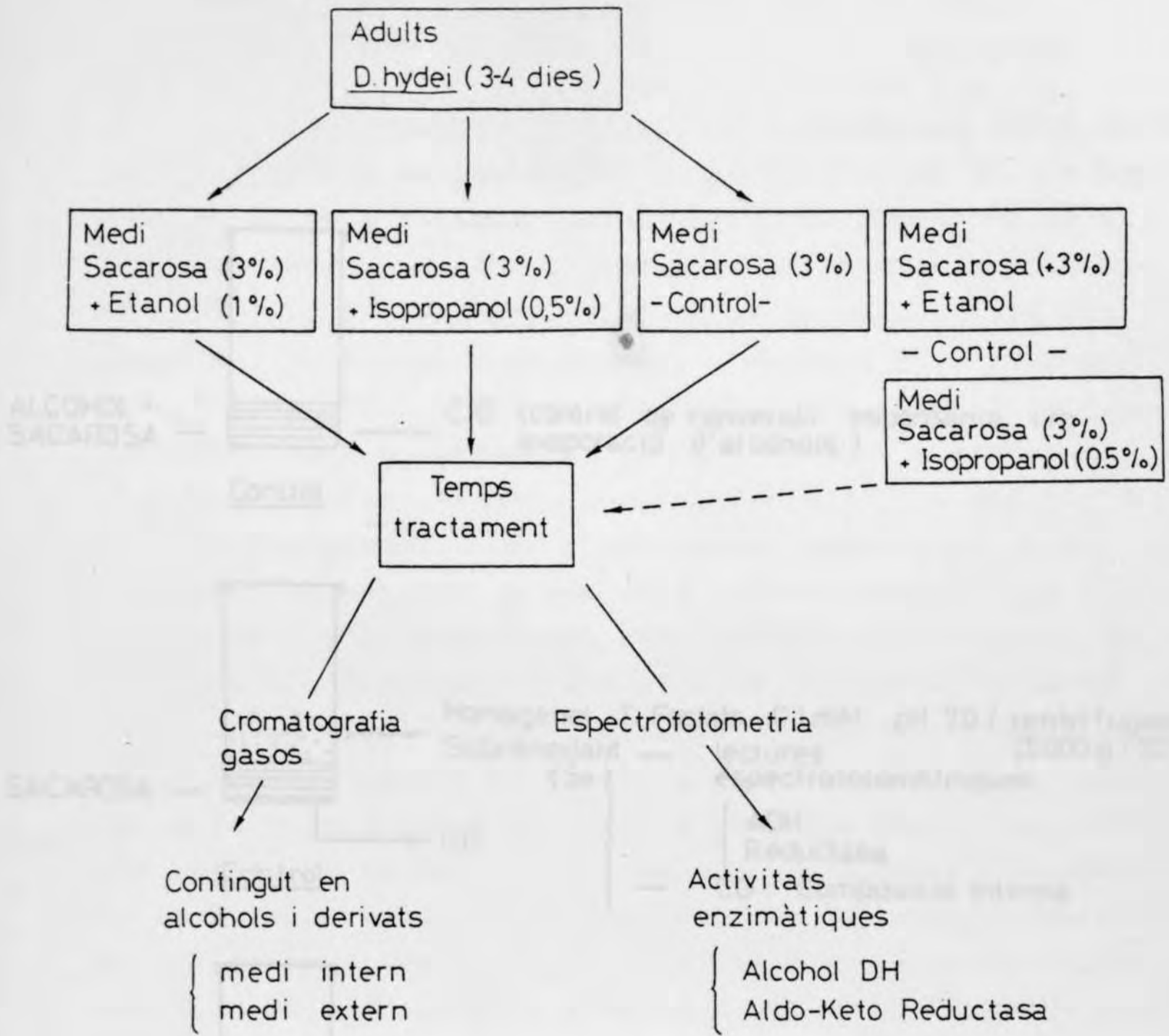


FIGURA 7.1. Esquema dels experiments d'ingesta d'etanol i isopropanol per adults de *D. hydei*.

7.2. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE L'ALCOHOL EN EL SORBITO DE L'EXPERIMENTAT.

La concentració d'alcohol en el sorbito de l'experimentat és la

la concentració màxima que es pot aconseguir amb el sorbito de l'experimentat

ment no arriba a capes de l'alcohol en el sorbito de l'experimentat.

El sorbito de l'experimentat és el que es pot aconseguir amb el sorbito de l'experimentat

de l'experimentat per l'experimentat de l'experimentat. Una altra

manera de tractament és el que es pot aconseguir amb el sorbito de l'experimentat

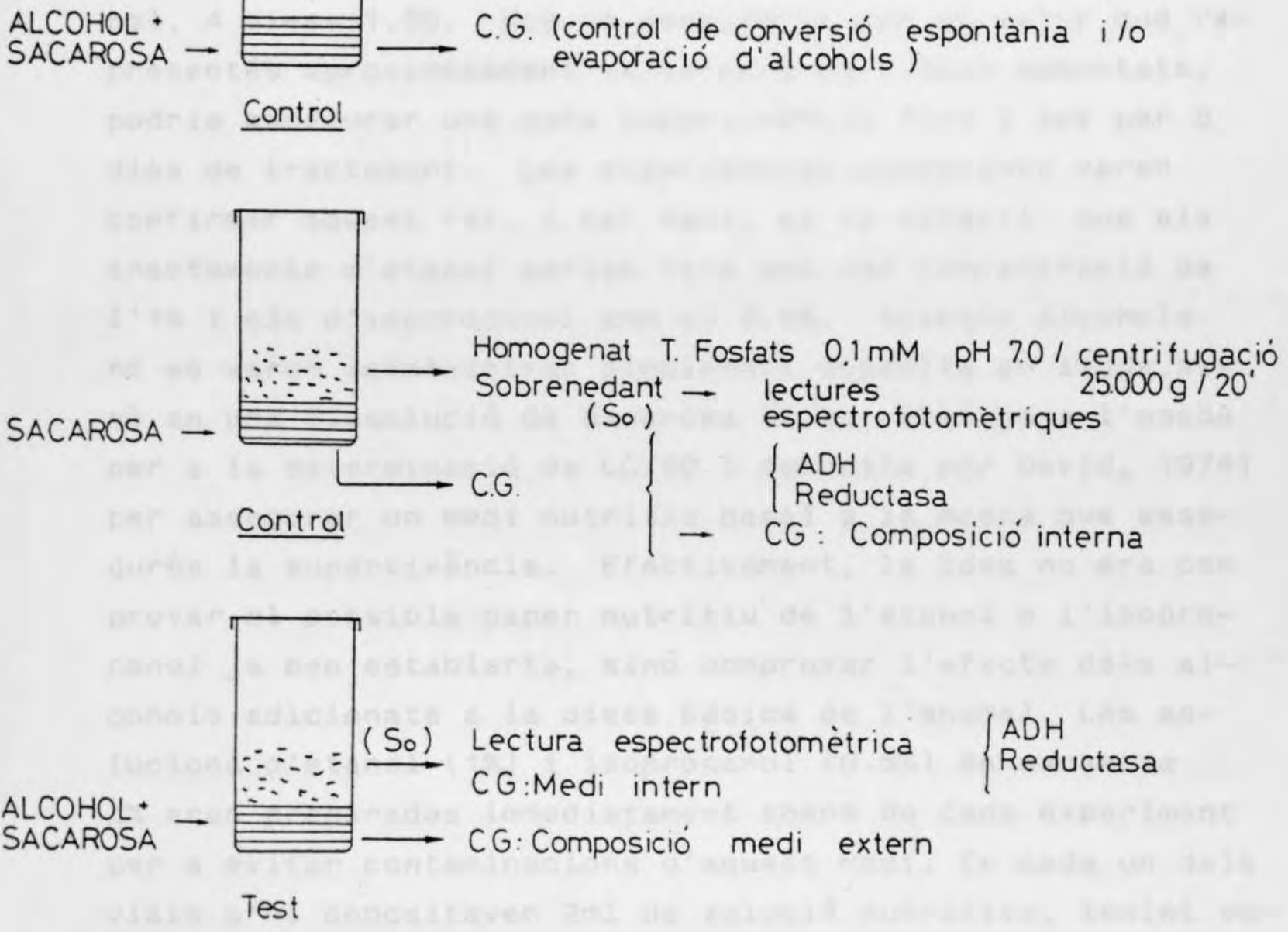


FIGURA 7.2. Realització pràctica de les determinacions indicades en els experiments de la ingesta d'alcohols.

Per a cada una de les condicions experimentals determinades per la concentració d'alcohol en el sorbito de l'experimentat, les proves es fan triplicat, i es pren una mitjana per a cada una.

## 7.2. DETERMINACIÓ DE LA COMPOSICIÓ DEL MEDI NUTRITIU SUPPLEMENTAT.

La concentració d'alcohol suplementat ideal seria la concentració màxima que en el període total de l'experiment no arribés a causar letalitat apreciable. En el capítol 3 (taules 3.2.i 3.3.) hom pot apreciar els valors de LC/50 per D.hydei per etanol i isopropanol, fins el quart dia de tractament: etanol, 4 dies= 3.71 i isopropanol, 4 dies= 1.50. Hom va considerar que un valor que representés aproximadament la tercera part dels esmentats, podria assegurar una bona supervivència fins i tot per 8 dies de tractament. Les experiències posteriors varen confirmar aquest fet, i per tant, es va establir que els tractaments d'etanol serien fets amb una concentració de l'1% i els d'isopropanol amb el 0.5%. Aquests alcohols no es varen subministrar simplement dissolts en aigua, sinó en una dissolució de sacarosa al 3% -anàloga a l'usada per a la determinació de LC/50 i descrita per David, 1974) per assegurar un medi nutritiu basal a la mosca que assegurés la supervivència. Efectivament, la idea no era comprovar el possible paper nutritiu de l'etanol o l'isopropanol ja ben establerts, sinó comprovar l'efecte dels alcohols adicionats a la dieta bàsica de l'animal. Les solucions d'etanol (1%) i isopropanol (0.5%) en sacarosa 3% eren preparades immediatament abans de cada experiment per a evitar contaminacions d'aquest medi. En cada un dels vials s'hi depositaven 2ml de solució nutritiva, tenint especial cura en que quedés totalment empapada en la cel·lulosa i eixugant les parets del tub per tal que les mosques no moríssin per adherència a les parets del vial.

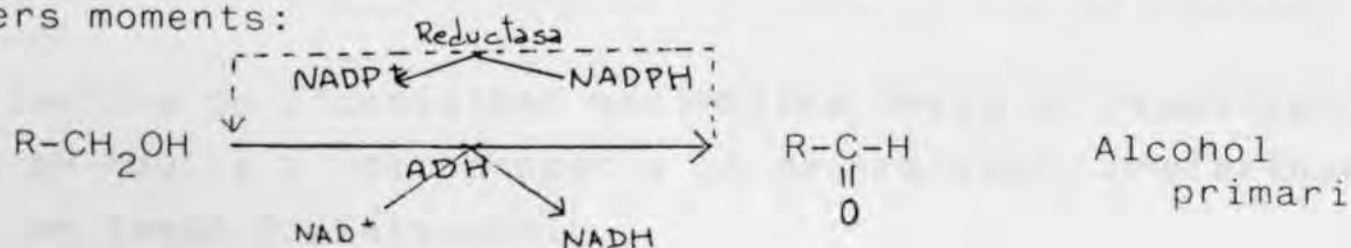
### Composició de cada sèrie experimental .

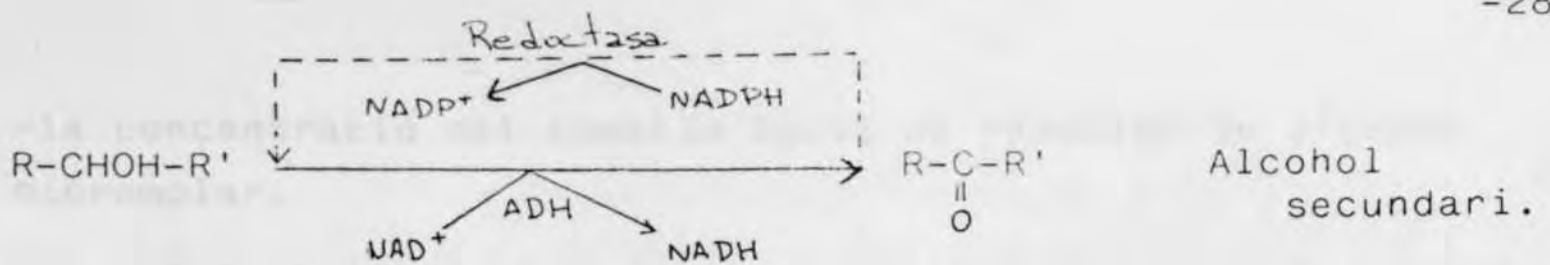
Per a cada una de les condicions experimentals determinades pels paràmetres concentració d'alcohol/ temps de tractament, les proves es varen realitzar sempre per triplicat, o sia amb tres vials idèntics, per a la compro-

vació de resultats. Per a cada una de les condicions experimentals es varen establir també blancs: així doncs, per a cada determinació s'hi afegien uns vials suplementats amb medi nutritiu, però que es mantenia sense mosques el temps necessari -blanc per a la cromatografia de gasos del medi extern- i uns vials que s'havien suplementat només amb sacarosa -blancs per a la determinació d'activitat enzimàtica i cromatografia de gasos del medi intern-. En el primer cas es tractava de comprovar que durant el temps en el qual transcorre l'experiment no hi ha conversió espontània de metabolits, mentre que en el segon cas, hom comprova les variacions de nivells enzimàtics d'activitat en individus no tractats amb alcohol per tal d'establir les variacions inherents a les pròpies ingestes d'alcohols.

### 7.3. ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES. DESCRIPCIÓ D'UNA ACTIVITAT REDUCTÀSICA NADPH-DEPENENT.

La determinació espectrofotomètrica de l'activitat ADH es realitzava d'acord amb el mètode descrit en el capítol corresponent, tant en sentit directe com invers. Les primeres determinacions d'activitat inversa varen donar uns resultats realment inapreciables, fet que va induir a tractar de determinar un altre sistema enzimàtic responsable de la via reductàsica. En la literatura, apareix ja en la dècada dels anys 70 una important informació sobre sistemes enzimàtics de mamífers capaços de reduir aldehids i cetones als corresponents alcohols amb el concurs de NADPH com a coenzim (Flynn, 1975 ; Turner i Tipton 1972). Seguint un consell personal de K.F. Tipton, un dels autors a qui es deu la caracterització de molts d'aquests enzims anomenats "aldo-ceto reductases", hom va assejar la presència i determinació espectrofotomètrica d'aquesta activitat a Drosophila amb resultats positius des dels primers moments:





Hom va establir a continuació les condicions ideals de lectura espectrofotomètrica d'aquesta activitat. En la literatura es varen trobar fins a quatre sistemes diferents de lectura, sempre en els extractes d'organs de mamífers:

Wartburg i Wermuth (1982)

- tampó fosfat-sòdic 0.1M, pH 7.0
- NADPH: solució 1.6mM
- p-nitro-benzaldehid: solució 5mM

Flynn i col. (1982)

- tampó fosfat-sòdic 0.1M, pH 7.0
- NADPH: solució 160  $\mu$ M
- piridin-3- aldehid: solució 5mM

Turner i Tipton (1982)

- tampó fosfat sòdic 0.1M, pH 7.2
- NADPH: solució 75  $\mu$ M
- p-nitro-benzaldehid 0.6mM

Daly i Mantle (1982)

- tampó fosfat sòdic 0.1M, pH 7.2
- NADPH: solució 75  $\mu$ M
- p-nitro-benzaldehid 0.33mM

Com a conclusions a tots aquests mètodes hom va concloure que:

- la lectura de l'activitat enzimàtica havia de realitzar-se a pH neutre o molt proper a la neutralitat, preferiblement en tampó fosfats-sòdic.

-la concentració del coenzim havia de resultar de l'ordre micromolar.

-el substrat ideal és el p-nitro-benzaldehyd, però la lectura es pot realitzar amb d'altres substrats.

Les condicions que hom va establir, descrites ja en el capítol de material i mètodes, segueixen doncs aquestes directrius:

-tampó fosfats (sòdic) 0.1M, pH 7.0

-NADPH : solució 75  $\mu$ M en tampó

-p-nitro-benzaldehyd: sol. 0.33 mM en metanol o

-acetaldehyd o acetona: sol 0.96M

Encara que les primeres determinacions varen ésser realitzades amb p-nitro-benzaldehyd com a substrat, en les determinacions d'activitat dels experiments següents es va utilitzar una solució d'acetaldehyd -preparada a l'instant- per analogia a la situació biològica i per representar un sistema anàleg a l'emprat en les determinacions d'activitat ADH inversa. Hom va observar que no hi havia diferències en les relacions d'activitat determinades amb un o altre substrat. A partir d'aquest moment s'anomenara aquest enzim de forma abreujada com "ACR" (Aldo-Ceto-Reductasa). En la taula 7.1. s'expressen els resultats de les primeres determinacions amb homogenat de D.hydei (0.3g adults per ml de tampó), preparat segons el mètode tradicional. L'espècie D.melanogaster va presentar resultats equivalents fet que indueix a pensar que aquesta activitat és present en tot el gènere, de mateixa manera que l'ADH. El pirazol és un potent inhibidor de l'ADH, l'activitat de la qual anul·la completament a unes concentracions de 25 mM. Tampoc es va detectar activitat inversa de l'enzim ADH, amb NADH com a coenzim i acetaldehyd com a substrat. La lectura d'activitat directa de l'ADH substituint el coenzim  $NAD^+$  per  $NADP^+$  dóna uns nivells de l'ordre de 25 vegades inferior als del control, cosa que indica que l'ADH no treballa normalment amb aquest cofactor. Les lectures

d'activitat reductàsica no es veuen afectades per la presència de pirazol, la qual cosa confirma la independència del sistema de reducció en front del d'oxidació; ans el contrari, la presència de pirazol fa augmentar considerablement ( $\sim x5$ ) l'activitat ACR apreciada.

Hom va realitzar encara d'altres proves per assegurar que el responsable de l'activitat reductàsica no fos un sistema enzimàtic ja descrit. Els principals candidats continuaven essent l'ADH -malgrat les proves que ja s'acumulaven en contra- i el sistema Aldox. Per això, es varen determinar les activitats enzimàtiques ADH i ACR en soques deficientes per ADH i per Aldehid Oxidasa. Hom comptava amb les següents soques:

ADH<sup>n1</sup> : soca que presenta síntesi d'una proteïna ADH no funcional.

ADH<sup>n4</sup> : soca que no presenta síntesi d'ADH

A47 : soca heterozigòtica per a la deficiència d'ADH:  
b Df(2L) A47 cn bw / In(2LR)O,Cy, dp<sup>lvI</sup> pr cn<sup>2</sup>

ma-1-F1 : soca amb ADH<sup>F</sup>, però deficient en aldehid-oxidasa, xantin-deshidrogenasa i piridoxal-oxidasa.

Les lectures espectrofotomètriques es varen realitzar a partir d'homogenats preparats segons el mètode general. En la taula 7.2. s'indiquen els resultats d'aquestes proves. Com era d'esperar, les soques ADH-n realment no presenten cap indicatiu d'activitat alcohol-deshidrogenàsica. La soca A47 presenta activitat ja que és heterozigòtica per la delecció que inclou Adh, però presenta nivells aproximadament equivalents a la meitat de la dosi normal, fet que negaria qualsevol mecanisme de compensació de dosi per a aquest gen. La soca ma-1 no presenta tampoc cap alteració respecte els nivells normals d'activitat ADH. En quant a l'activitat ACR, hom pot afirmar que no es veu en absolut afectada en cap dels casos analitzats i les variacions observades entren dins de les variacions experimentals esperades.



| Activitat<br>enzimàtica | coenzim           | Activitat<br>enzimàtica<br>(U/ml.) |
|-------------------------|-------------------|------------------------------------|
| ADH directa             | NAD <sup>+</sup>  | 0.481 ± 0.01                       |
| ADH directa             | NADP <sup>+</sup> | 0.019 ± 0.00                       |
| ADH directa-pirazol     | NAD <sup>+</sup>  | -----                              |
| ADH inversa             | NADH              | -----                              |
| ACR                     | NADPH             | 0.173 ± 0.05                       |
| ACR -pirazol            | NADPH             | 0.942 ± 0.16                       |

TAULA 7.1. Determinacions espectrofotomètriques a partir d'homogenat cru d'individus de l'espècie D.hydei.

| Soca de<br><u>D.melanogaster</u> | Activitat ADH<br>(U/ml) | Activitat ACR<br>(U/ml) |
|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Adh- <sup>n1</sup>               | -----                   | 1.040 ± 0.02            |
| Adh- <sup>n4</sup>               | -----                   | 0.770 ± 0.11            |
| A-47                             | 0.431 ± 0.07            | 0.654 ± 0.19            |
| ma-1- <sup>F1</sup>              | 0.991 ± 0.02            | 0.808 ± 0.11            |
| Adh <sup>S</sup>                 | 0.953 ± 0.01            | 0.705 ± 0.14            |

TAULA 7.2. Determinacions espectrofotomètriques a partir de diferents soques de D.melanogaster.

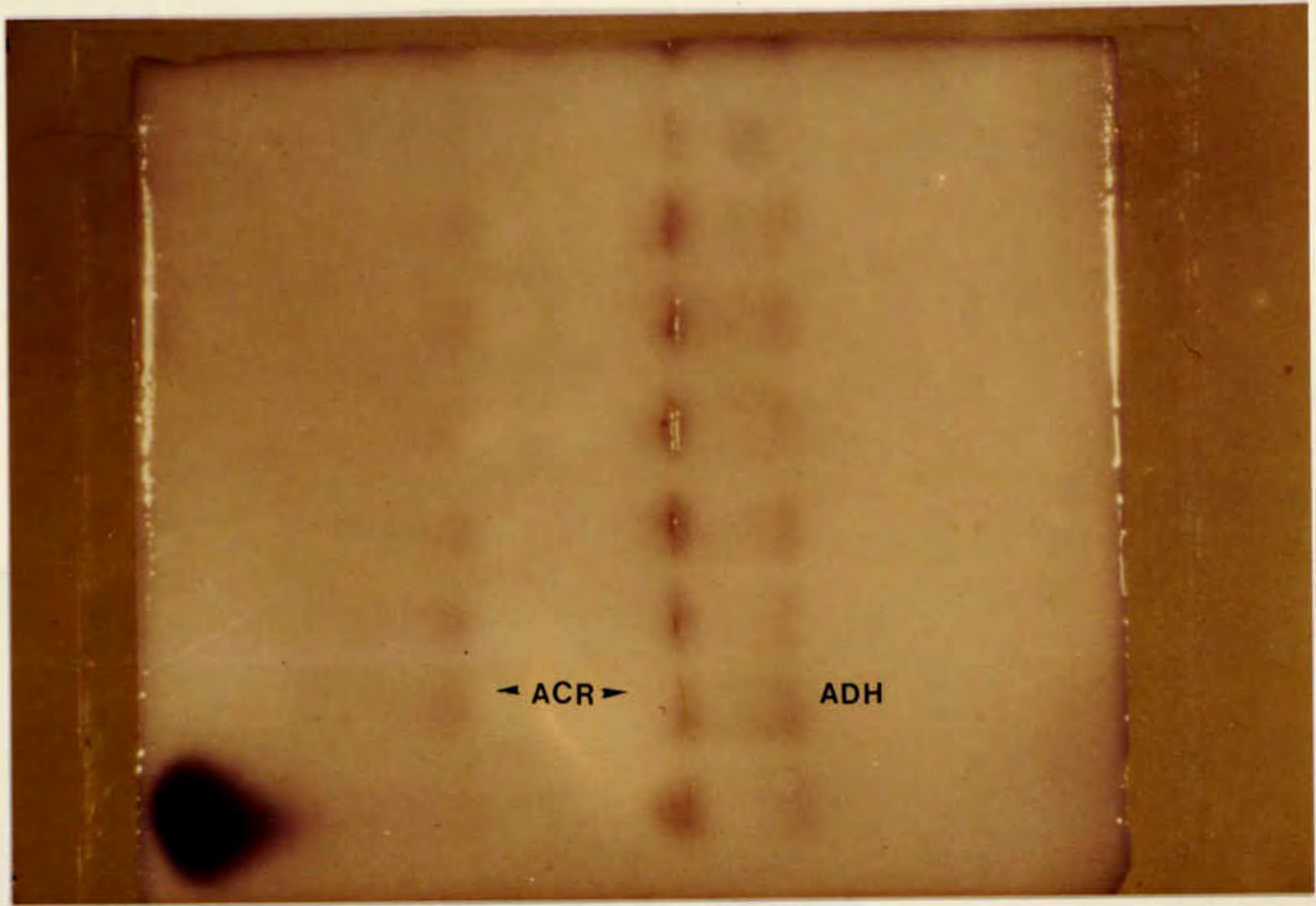


FIGURA 7.3. Tinció per a activitat Aldo-ceto-reductasa en un gel de midó, sobre mostres d'individus de l'espècie D.hydei.

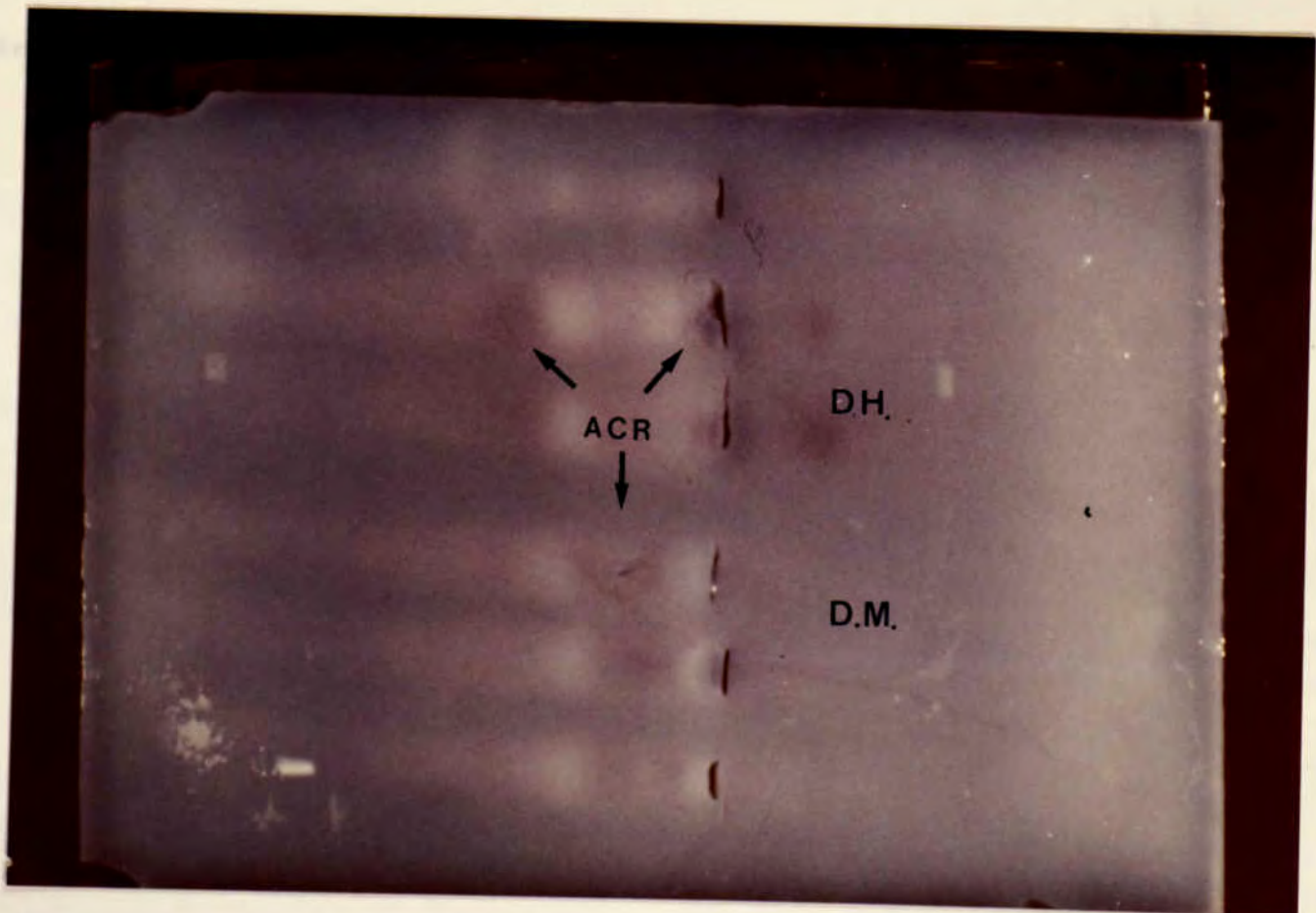


FIGURA 7.4. Idem amb D.melanogaster.

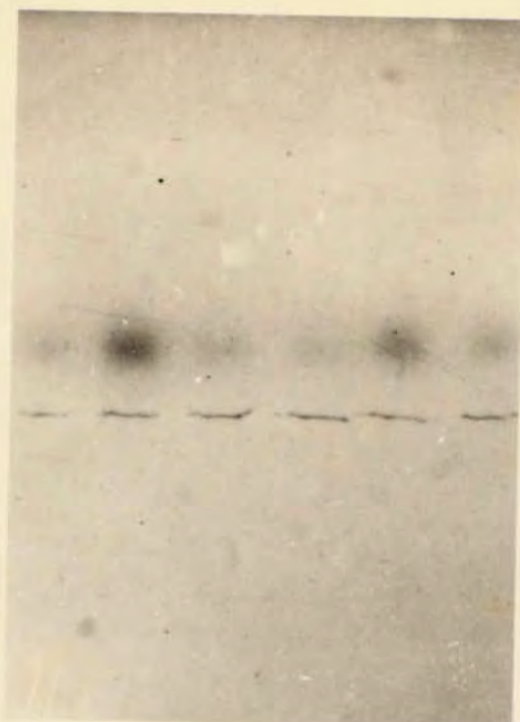
Tinció d'activitat enzimàtica

En la tinció de les mostres de gel de midó, es pot observar la presència de bandes de tinció que corresponen a les diferents isoformes de l'enzim. Aquests resultats són característics de cada espècie i de cada condició experimental.



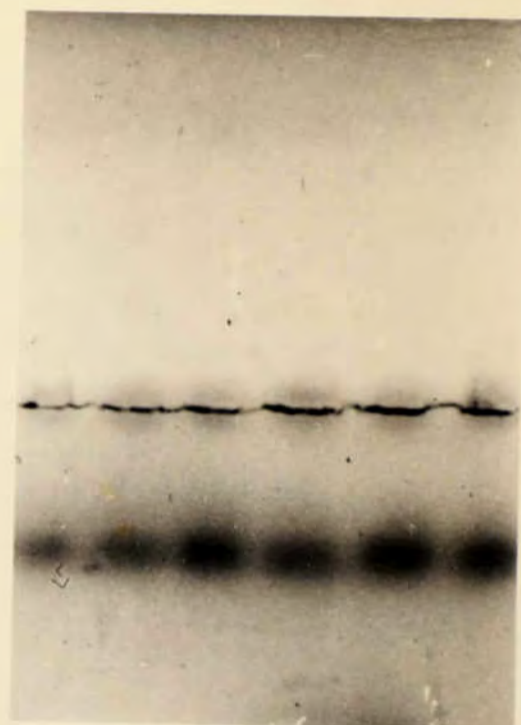
**1**

D. melanogaster



**2**

D. melanogaster  
ADH<sub>n</sub><sup>4</sup>



**3**

D. hydei

Les dades obtingudes a partir d'aquests resultats són molt importants a considerar. Es poden resumir en:  
- resulta evident la presència d'un polimorfisme per a l'ADH de D. melanogaster.  
- les soques ADH-huïl presenten bandes de tinció per ADH.  
- la soca ADH-cull presenta també tinció ACR, així com, lògicament, per ADH.

7.4. CROMATOGRÀFIA DE GASOS.

L'aplicació de la cromatografia de gasos a

**FIGURA 7.5.** Tinció per a activitat ACR en gels de midó amb les mostres que s'especifica en cada cas.

### Tinció d'activitat reductàsica.

En la bibliografia es troben descrits diversos mètodes de tinció de l'activitat ACR en gels de poliacrilamida a partir d'homogenats d'òrgans de mamífer: Turner i Tipton (1972), Duley i Holmes (1982). Hom va intentar de detectar aquest enzim seguint la seva mateixa metodologia, però hom no ho va aconseguir en gels d'acrilamida, sinó en gels de midó. Les condicions de l'electroforesi i de les tincions es troben descrites en el capítol de metodologia. En el mateix gel, es varen detectar els enzims que podien oferir alguna interferència, com l'ADH, que per la seva elevada activitat es tenyeix també en les proves d'ACR, o l'octanol-DH, que migra a una zona propera a l'ACR. En la figura 7.3. s'observa una tinció per activitat ACR en individus de D.hydei: sembla doncs que l'activitat queda centrada en dues bandes: una de migració nul·la respecte l'origen, més intensa, i una de migració anòdica, menys intensa. El sistema sembla, en tot cas, monomòrfic, ja que s'ha repetit el mateix patern sempre que s'ha efectuat aquesta prova. No sembla ésser així, en canvi, en D.melanogaster, els resultats de la qual es poden observar en la figura 7.4.

La prova es va repetir per als mutants de D.melanogaster ADH-null i Aldox-null. Figura 7.5. Els punts més importants a considerar es poden resumir en:

- sembla evident la presència d'un polimorfisme per a l'ACR de D.melanogaster.
- les soques ADH-null presenten bandes de tinció per ACR
- la soca Aldox-null presenta també tinció ACR, així com, lògicament, per ADH.

### 7.4. CROMATOGRAFIA DE GASOS.

L'aplicació de la cromatografia de gasos a l'estudi del metabolisme dels alcohols va prendre gran

importància en el cas de l'alcoholisme humà, i, recentment s'ha desenvolupat la metodologia de cromatografia de gasos en "head space" per a la determinació rutinària d'alcohol en sang (Machata (1964) i Jentsch (1967)). En estudis relacionats amb el metabolisme d'alcohols a Drosophila, l'aplicació de les tècniques de "head space" no s'ha trobat en cap referència bibliogràfica. Les tècniques clàssiques de CG per injecció han estat típicament aplicades a l'estudi de la composició del medi extern natural (McKechnie i Morgan, 1982, estudien la composició de diferents fruits) o del medi extern artificial (Vilageliu, 1980). En el present estudi, i davant la possibilitat de disposar d'un cromatògraf de gasos de "head space", hom va decidir de fer estudis de composició d'alcohols interns en al mosca i d'alcohols en el medi nutritiu que se li proporciona.

#### Estudis en medi extern.

Les característiques de l'anàlisi per CG-HS, àmpliament comentades en el capítol de material i mètodes, permet la transferència directa de les cel.luloses impregnades amb solució nutritiva dels vials d'experimentació als vials de mostres de CG. Cal establir un standard intern que no interfereixi amb cap dels productes a determinar i una concentració d'aquest standard similar a la dels productes que hi haurà en la mostra. Cal establir també les condicions ideals de cromatografia (màxima resolució en el mínim temps possible) i determinar si el fet d'estar empapats en cel.lulosa canvia la resposta relativa dels alcohols i l'estandard intern.

#### Estudis en medi intern.

Cal determinar quines són les concentracions d'standard intern ideals per a les lectures de concen



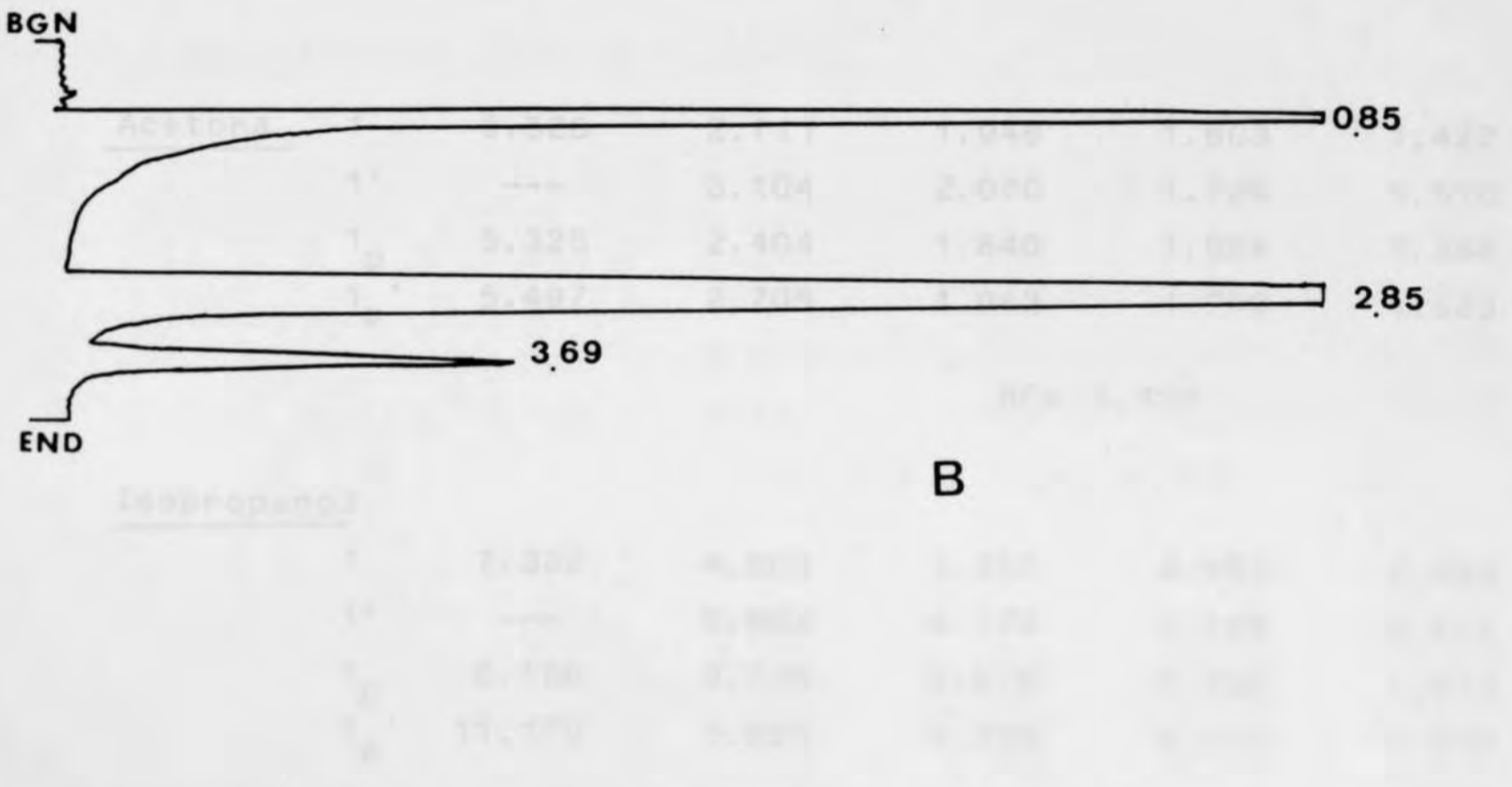
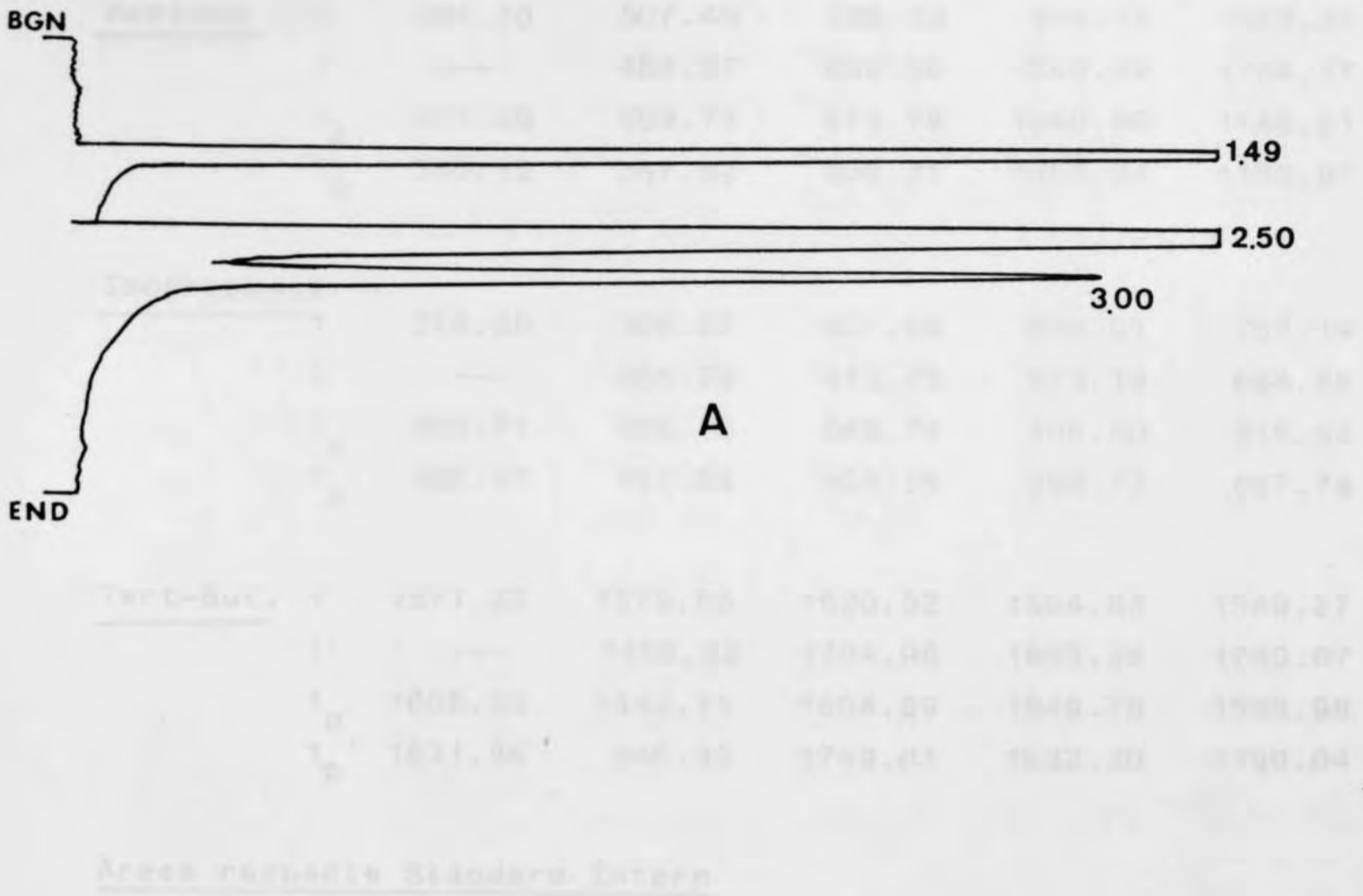


FIGURA 7.6. Cromatograma dels standards (15mM) :

(A) Acetona, t=1.49  
 Tert-butanol, t=2.50 (25mM)  
 Isopropanol, t= 3.00

(B) Acetaldehid, t=0.85  
 Tert-butanol, t= 2.85 (25mM)  
 Etanol, t=3.69

|                    |                  | 5       | 10      | 15      | 20      | 25      |
|--------------------|------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| <u>Acetona</u>     | 1                | 284.20  | 507.49  | 780.53  | 976.15  | 1089.24 |
|                    | 1'               | ---     | 482.97  | 852.50  | 1060.29 | 1164.77 |
|                    | 1 <sub>p</sub>   | 301.39  | 599.71  | 871.79  | 1040.99 | 1146.51 |
|                    | 1 <sub>p</sub> ' | 333.15  | 347.62  | 900.21  | 1065.94 | 1180.91 |
| <u>Isopropanol</u> | 1                | 214.56  | 306.57  | 427.65  | 638.01  | 757.14  |
|                    | 1'               | ---     | 265.29  | 423.23  | 573.19  | 684.56  |
|                    | 1 <sub>p</sub>   | 260.71  | 386.10  | 549.74  | 706.60  | 815.43  |
|                    | 1 <sub>p</sub> ' | 162.17  | 157.64  | 403.35  | 558.73  | 697.79  |
| <u>Tert-But.</u>   | 1                | 1571.22 | 1379.86 | 1520.92 | 1564.83 | 1549.27 |
|                    | 1'               | ---     | 1499.62 | 1764.96 | 1833.28 | 1760.87 |
|                    | 1 <sub>p</sub>   | 1605.55 | 1442.11 | 1604.89 | 1649.78 | 1598.99 |
|                    | 1 <sub>p</sub> ' | 1831.56 | 940.39  | 1749.81 | 1832.30 | 1799.04 |

Àrees respecte Standard Intern

|                |                  |       |       |       |       |       |
|----------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <u>Acetona</u> | 1                | 5.528 | 2.711 | 1.948 | 1.603 | 1.422 |
|                | 1'               | ---   | 3.104 | 2.070 | 1.729 | 1.510 |
|                | 1 <sub>p</sub>   | 5.325 | 2.404 | 1.840 | 1.584 | 1.394 |
|                | 1 <sub>p</sub> ' | 5.497 | 2.705 | 1.943 | 1.719 | 1.523 |

RF= 1.426

|                    |                  |        |       |       |       |       |
|--------------------|------------------|--------|-------|-------|-------|-------|
| <u>Isopropanol</u> | 1                | 7.322  | 4.500 | 3.556 | 2.452 | 2.046 |
|                    | 1'               | ---    | 5.652 | 4.170 | 3.198 | 2.572 |
|                    | 1 <sub>p</sub>   | 6.156  | 3.735 | 2.919 | 2.336 | 1.912 |
|                    | 1 <sub>p</sub> ' | 11.170 | 5.965 | 4.338 | 3.279 | 2.578 |

RF= 2.277

|                          |           |                  |        |        |
|--------------------------|-----------|------------------|--------|--------|
| Coeficients de regressió | Conc/àrea | 1                | -0.953 | -0.985 |
|                          |           | 1'               | -0.937 | -0.982 |
|                          |           | 1 <sub>p</sub>   | -0.966 | -0.989 |
|                          |           | 1 <sub>p</sub> ' | -0.940 | -0.983 |

TAULA 7.3.

|                    | 5       | 10      | 15      | 20      | 25      |
|--------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| <u>Acetaldehid</u> |         |         |         |         |         |
| 1                  | 153.90  | 458.19  | 669.53  | 886.33  | 1075.93 |
| 1'                 | 234.01  | 492.23  | 678.62  | 901.65  | 1099.24 |
| 1 <sub>p</sub>     | 310.55  | 594.08  | 901.57  | 956.98  | 1255.34 |
| 1 <sub>p</sub> '   | 169.57  | 585.05  | 782.00  | 1131.11 | 1334.68 |
| <u>Etanol</u>      |         |         |         |         |         |
| 1                  | 39.57   | 233.50  | 366.69  | 392.37  | 285.62  |
| 1'                 | 63.82   | 112.62  | 171.30  | 222.66  | 266.54  |
| 1 <sub>p</sub>     | 73.06   | 115.74  | 181.21  | 193.09  | 271.38  |
| 1 <sub>p</sub> '   | 37.14   | 111.68  | 149.86  | 220.80  | 260.42  |
| <u>Tert-But.</u>   |         |         |         |         |         |
| 1                  | 1375.51 | 1604.40 | 1844.61 | 1752.10 | 1538.04 |
| 1'                 | 1884.65 | 1794.78 | 1975.66 | 1833.94 | 1675.26 |
| 1 <sub>p</sub>     | 1623.65 | 1588.42 | 1763.57 | 1574.01 | 1548.45 |
| 1 <sub>p</sub> '   | 1214.58 | 1771.52 | 1903.08 | 1873.25 | 1716.00 |

Àrees respecte Standard Intern

|                    |       |       |       |       |       |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <u>Acetaldehid</u> |       |       |       |       |       |
| 1                  | 8.939 | 3.501 | 2.755 | 1.976 | 1.429 |
| 1'                 | 8.053 | 3.646 | 2.911 | 2.034 | 1.524 |
| 1 <sub>p</sub>     | 5.228 | 2.673 | 1.953 | 1.644 | 1.233 |
| 1 <sub>p</sub> '   | 7.162 | 3.027 | 2.433 | 1.656 | 1.319 |

RF= 1.376

|                  |        |        |        |       |       |
|------------------|--------|--------|--------|-------|-------|
| <u>Etanol</u>    |        |        |        |       |       |
| 1                | 34.767 | 6.871  | 5.030  | 4.465 | 5.385 |
| 1'               | 29.530 | 15.936 | 11.530 | 8.236 | 6.285 |
| 1 <sub>p</sub>   | 22.223 | 13.724 | 9.732  | 8.152 | 5.705 |
| 1 <sub>p</sub> ' | 32.702 | 15.862 | 12.699 | 8.483 | 6.762 |

RF= 6.034

|                                    |                  |        |        |
|------------------------------------|------------------|--------|--------|
| Coeficients de regressió Conc/àrea | 1                | -0.995 | ----   |
|                                    | 1'               | -0.995 | -0.985 |
|                                    | 1 <sub>p</sub>   | -0.983 | -0.983 |
|                                    | 1 <sub>p</sub> ' | -0.989 | -0.988 |

TAULA 7.4



Resposta front  
Tert-butanol

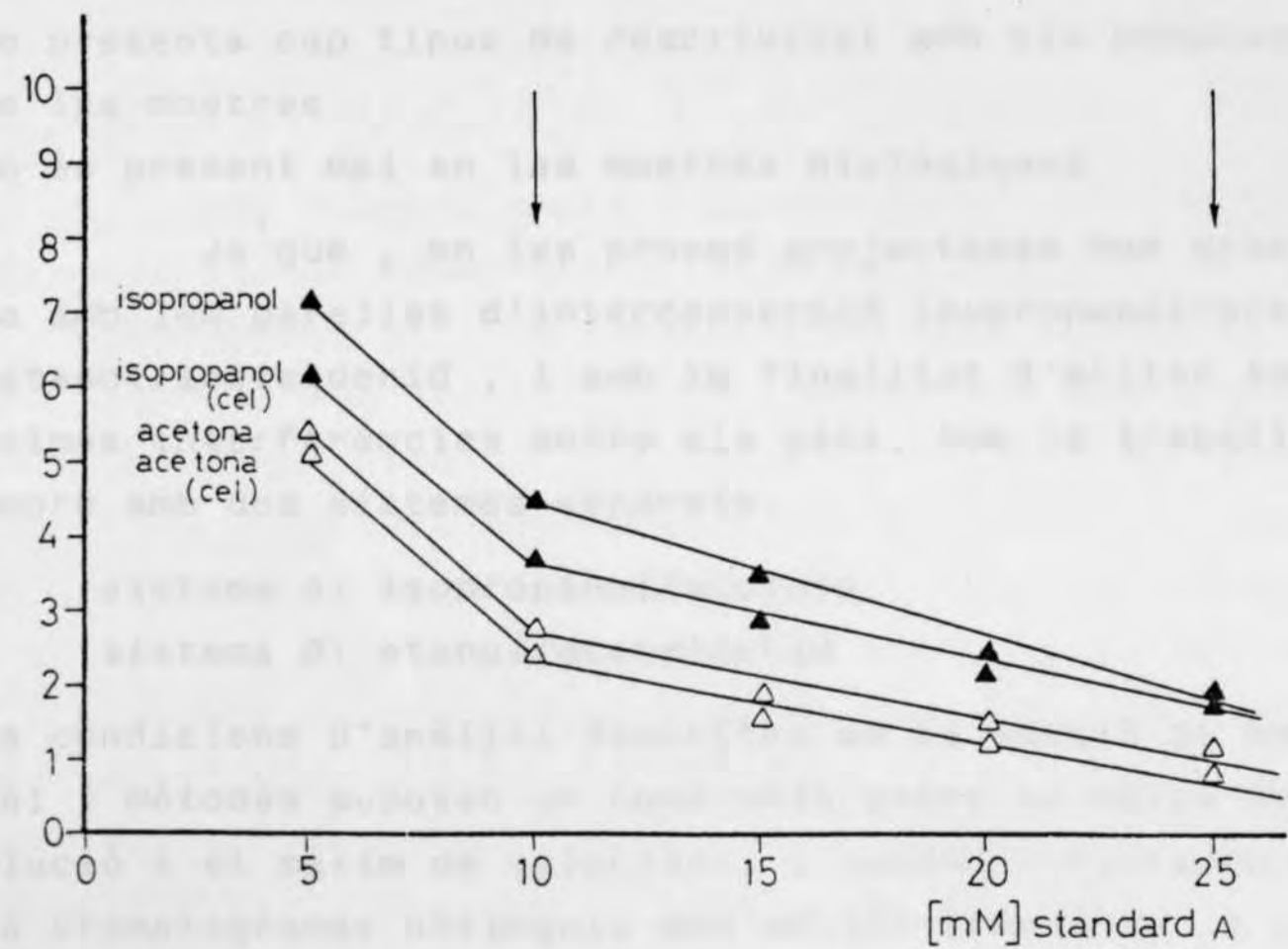
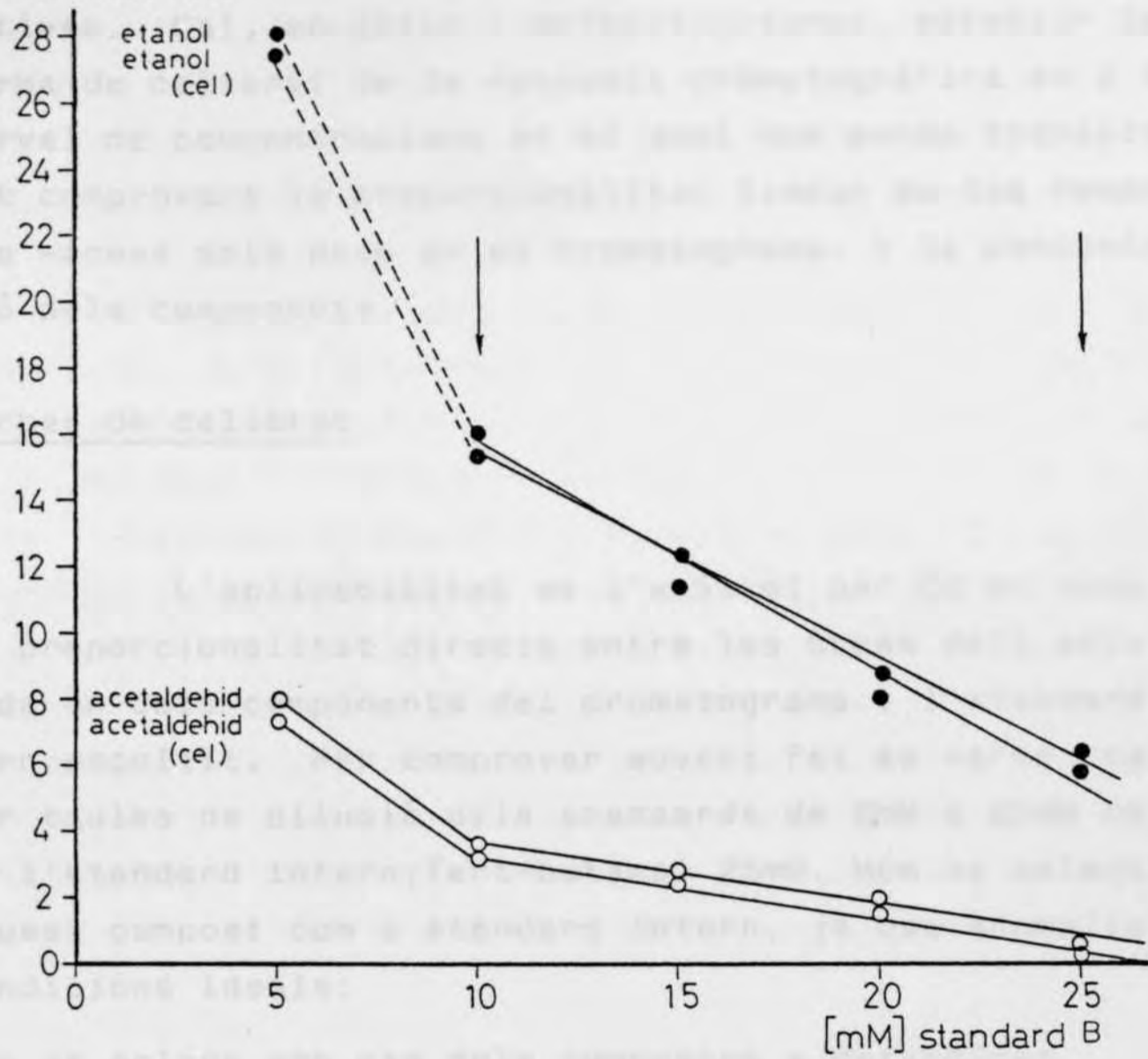


FIGURA 7.7. Corbes de calibrat dels standards de Cromatografia de Gasos.

tracció interna, i si la presència d'altres components en la mostra afecta la proporcionalitat de les respostes relatives. Cal, en últim i definitiu terme, establir la corba de calibrat de la resposta cromatogràfica en l'interval de concentracions en el qual hom pensa treballar, tot comprovant la proporcionalitat linear de les respostes -àrees dels pics en el cromatograma- i la concentració dels components.

### Corbes de calibrat.

L'aplicabilitat de l'anàlisi per CG es basa en la proporcionalitat directa entre les àrees dels pics de cada un dels components del cromatograma i l'standard intern escollit. Per comprovar aquest fet es varen realitzar taules de dilució dels standards de 5mM a 25mM respecte l'standard intern: Tert-butanol 25mM. Hom va seleccionar aquest compost com a standard intern, ja que acomplia les condicions ideals:

- no se solapa amb cap dels compostos a determinar
- no presenta cap tipus de reactivitat amb els compostos de les mostres
- no és present mai en les mostres biològiques

Ja que , en les proves projectades hom treballaria amb les parelles d'interconversió isopropanol/acetona i etanol/acetaldehid , i amb la finalitat d'evitar les màximes interferències entre els pics, hom va treballar sempre amb dos sistemes separats:

sistema A: isopropanol/acetona

sistema B: etanol/acetaldehid

Les condicions d'anàlisi descrites en la secció de material i mètodes suposen un compromís entre el màxim de resolució i el màxim de velocitat, i queden reflexades en els cromatogrames obtinguts amb ambdós standards , a concentració 10mM, que es reproduïxen en la figura 7.6.

En la taula 7.3. i 7.4. hom mostra els valors obtinguts per a les corbes de calibrat de l'interval 5mM a 25mM. Els valors corresponents a 5mM mostren distorsions greus i hom no els va considerar, ja que no cauen dins del marge experimental del present estudi, malgrat això, es varen consignar en les taules. Les taules reproduïxen els valors de les àrees corregides respecte l'àrea de l'standard intern, i els factors de resposta. Hom va realitzar dues lectures per a cada una de les concentracions esmentades. Els valors designats amb els números cardinal (1,1') representa lectures on l'standard es trobava simplement en dissolució aquosa: en cada vial s'hi introduïen 0.5ml de mostra. Els valors subindexats amb la lletra "p" representen lectures on els standards es varen empapar en cel.lulosa (2ml/vial) per simular exactament les condicions en què es trobarien les mostres problema, i comprovar si aquest fet suposava una resposta cromatogràfica diferencial. En la figura 7.7. es mostren les corbes de calibrat corresponents a aquestes dades.

#### 7.5. PROVA nº 1.

Una primera prova d'aproximació al problema va ésser realitzada sotmetent a concentracions d'etanol a l'1% i isopropanol al 0.5% individus durant 2h, 4h, 8h i 24h. En les figures 7.1 i 7.2. es mostren els organigrames d'aquest tipus d'experiments: a partir del temps indicat es retiraven les mosques per a procedir al seu homogenat segons les condicions standards establertes i la cel.lulosa era immediatament tancada, prèvia addició de l'standard intern, en un vial de CG. Totes les operacions es feien a 4°C. En la taula 7.5. hom pot apreciar les lectures d'activitats enzimàtiques ADH i ACR en aquests períodes. En la taula 7.6. es mostren els càlculs dels RRF per a cada component en aquesta prova -en cada experiment es calculaven els RRF corresponents per evitar errors del sistema cromatogràfic-; i en la

## Activitat ADH (U/ml)

|         | Activitat ADH (U/ml) |               |               |
|---------|----------------------|---------------|---------------|
| inicial | 0.120                |               |               |
|         | control              | etanol        | isopropanol   |
| 2h      | 0.120 ± 0.020        | 0.250 ± 0.030 | 0.115 ± 0.001 |
| 4h      | 0.140 ± 0.000        | 0.130 ± 0.009 | 0.100 ± 0.002 |
| 8h      | ----                 | 0.231 ± 0.019 | 0.096 ± 0.000 |
| 24h     | 0.124 ± 0.000        | 0.081 ± 0.008 | 0.053 ± 0.009 |

## Activitat AKR (U/ml)

|         | Activitat AKR (U/ml) |               |               |
|---------|----------------------|---------------|---------------|
| inicial | 0.280                |               |               |
|         | control              | etanol        | isopropanol   |
| 2h      | 0.074 ± 0.000        | 0.183 ± 0.014 | 0.207 ± 0.027 |
| 4h      | 0.101 ± 0.018        | 0.207 ± 0.009 | 0.212 ± 0.000 |
| 8h      | ----                 | 0.217 ± 0.009 | 0.270 ± 0.000 |
| 24h     | 0.098 ± 0.000        | 0.173 ± 0.037 | 0.241 ± 0.060 |

TAULA 7.5. Activitats enzimàtiques mesurades a partir d'individus de l'espècie D.hydei, segons les condicions de la prova nº1.

Standards de cromatografia de gasos:

standard intern: tert-butanol 25mM

Standard (A) Acetona, isopropanol, tert-butanol.

(B) Acetaldehid, etanol, tert-butanol.

|              |         |         |         |         |
|--------------|---------|---------|---------|---------|
| Acetaldehid  | ---     | ---     | 1262.42 | 1455.47 |
| Acetona      | 1027.27 | 1029.89 | ---     | ---     |
| Isopropanol  | 1012.57 | 904.06  | ---     | ---     |
| Etanol       | ---     | ---     | 449.98  | 440.21  |
| Tert-butanol | 1449.90 | 1436.95 | 1484.55 | 1509.37 |

|           |             |      |
|-----------|-------------|------|
| <u>RF</u> | Acetaldehid | 1.10 |
|           | Acetona     | 1.42 |
|           | Isopropanol | 1.51 |
|           | Etanol      | 3.36 |

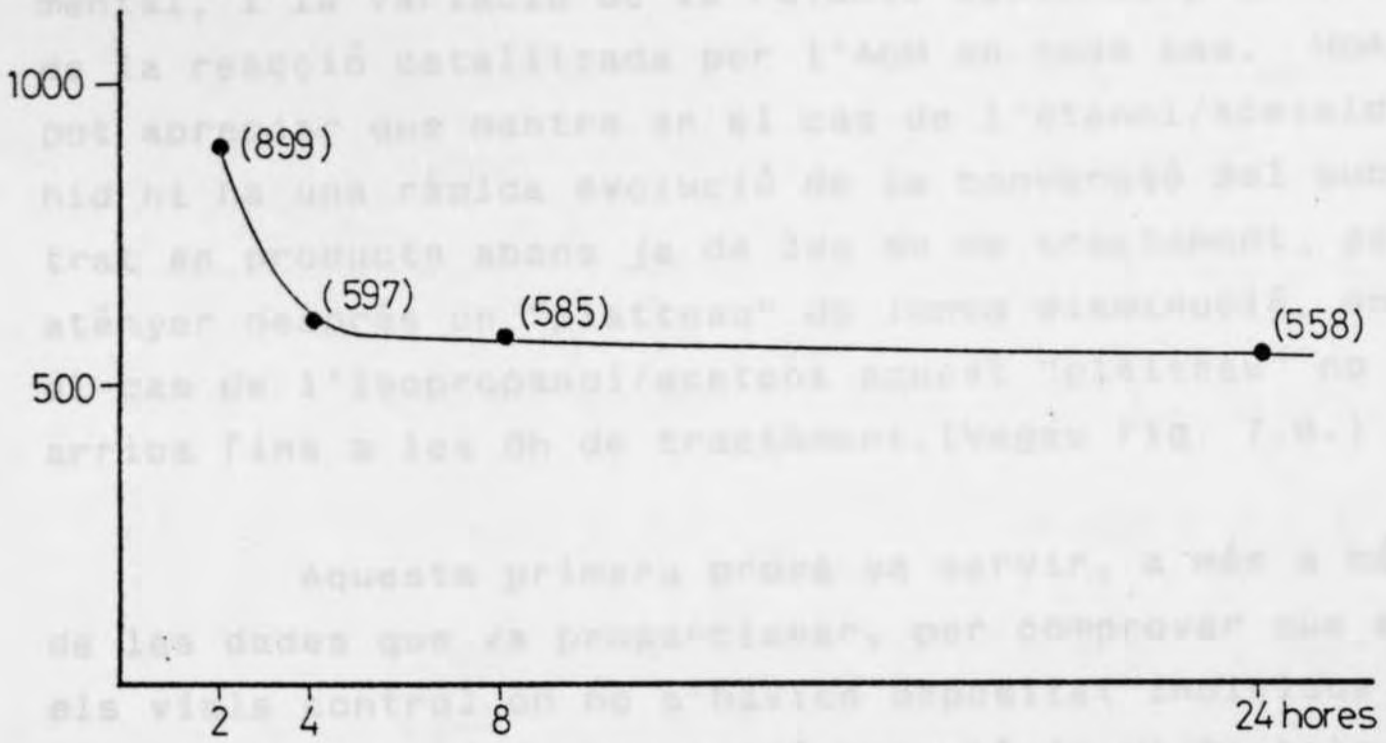
TAULA 7.6. Càlculs dels factors de resposta dels compostos analitzats en la prova nº 1.

|     |         | Acetaldehid         | Etanol | Substrat<br>Producte |
|-----|---------|---------------------|--------|----------------------|
| 2h  | control | $20 \times 10^{-4}$ | 12.59  |                      |
|     | etanol  | 0.014               | 9.43   | 899.28               |
| 4h  | control | $43 \times 10^{-4}$ | 18.64  |                      |
|     | etanol  | 0.031               | 18.64  | 597.43               |
| 8h  | control | $25 \times 10^{-4}$ | 20.31  |                      |
|     | etanol  | 0.034               | 16.77  | 585.30               |
| 24h | control | $50 \times 10^{-4}$ | 20.20  |                      |
|     | etanol  | 0.033               | 18.44  | 558.78               |

|     |             | Acetona             | Isopropanol |        |
|-----|-------------|---------------------|-------------|--------|
| 2h  | control     | $31 \times 10^{-4}$ | 9.867       |        |
|     | isopropanol | 0.035               | 9.09        | 281.91 |
| 4h  | control     | $11 \times 10^{-4}$ | 10.33       |        |
|     | isopropanol | 0.081               | 8.22        | 126.12 |
| 8h  | control     | $11 \times 10^{-4}$ | 12.51       |        |
|     | isopropanol | 0.214               | 7.41        | 58.45  |
| 24h | control     | $19 \times 10^{-4}$ | 9.39        |        |
|     | isopropanol | 0.175               | 7.76        | 44.34  |

TAULA 7.7. Composició (en mg/vial) del medi extern dels vials de la prova nº1.

Etanol / Acetaldehid



Isopropanol / Acetona

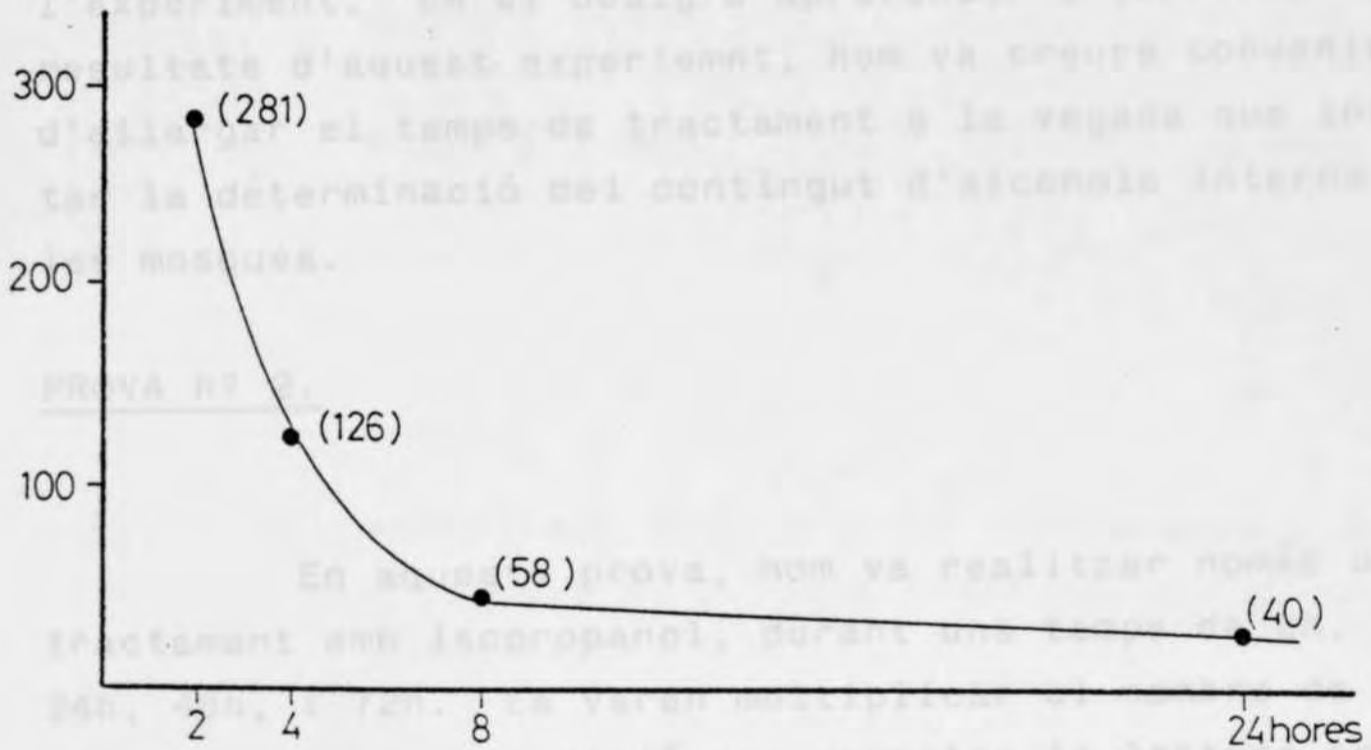


FIGURA 7.8. Prova nº1. Relacions substrst/producte per a cada un dels alcohols assejats.

taula 7.7. apareixen els valors de les concentracions de cada una de les substàncies per a cada temps experimental, i la variació de la relació substrat/producte de la reacció catalitzada per l'ADH en cada cas. Hom pot apreciar que mentre en el cas de l'etanol/acetaldehid hi ha una ràpida evolució de la conversió del substrat en producte abans ja de les 4h de tractament, per atènyer després un "platteau" de lenta disminució, en el cas de l'isopropanol/acetona aquest "platteau" no arriba fins a les 8h de tractament. (Vegeu fig. 7.8.)

Aquesta primera prova va servir, a més a més de les dades que va proporcionar, per comprovar que en els vials control on no s'havien depositat individus, no hi havia cap interconversió espontània d'alcohols en d'altres compostos, que interferís amb els propòsits de l'experiment. En el desig d'aprofundir i confirmar els resultats d'aquest experiment, hom va creure convenient d'allargar el temps de tractament a la vegada que intentar la determinació del contingut d'alcohols interns en les mosques.

#### PROVA nº 2.

En aquesta prova, hom va realitzar només un tractament amb isopropanol, durant uns temps de 2h, 8h, 24h, 48h, i 72h. Es varen multiplicar el nombre de rèpliques de cada condició per permetre la lectura en CG de l'homogenat cru dels individus, que es realitzava amb 0.5ml d'homogenat i 0.5ml d'standard intern (Tert-but. 1%). En la taula 7.8. es representen les activitats enzimàtiques ADH i ACR corresponents a aquests períodes (vegeu fig. 7.9.). En la taula 7.9. s'indiquen els resultats dels càlculs dels RRF per a aquesta prova, en la 7.10 la composició del medi extern i en la 7.11. la del medi intern. Cada valor suposa la mitjana d'un mínim de tres determinacions independents. En la gràfica 7.10. s'il.lustren aquestes determinacions. Hom pot apreciar una mínima pèrdua d'alcohols per evapo-



|         | Activitat ADH<br>(U/ml) | Activitat AKR<br>(U/ml) |
|---------|-------------------------|-------------------------|
| INICIAL | 0.415 ± 0.066           | 1.103 ± 0.080           |
| 2h      | 0.280 ± 0.040           | 2.085 ± 0.214           |
| 8h      | 0.188 ± 0.006           | 2.605 ± 0.242           |
| 24h     | 0.086 ± 0.012           | 3.345 ± 0.131           |
| 48h     | 0.048 ± 0.002           | 2.780 ± 0.310           |
| 72h     | 0.038 ± 0.002           | 2.140 ± 0.400           |

TAULA 7.8. Activitats enzimàtiques corresponents a individus de D.hydei tractats segons la prova nº2.

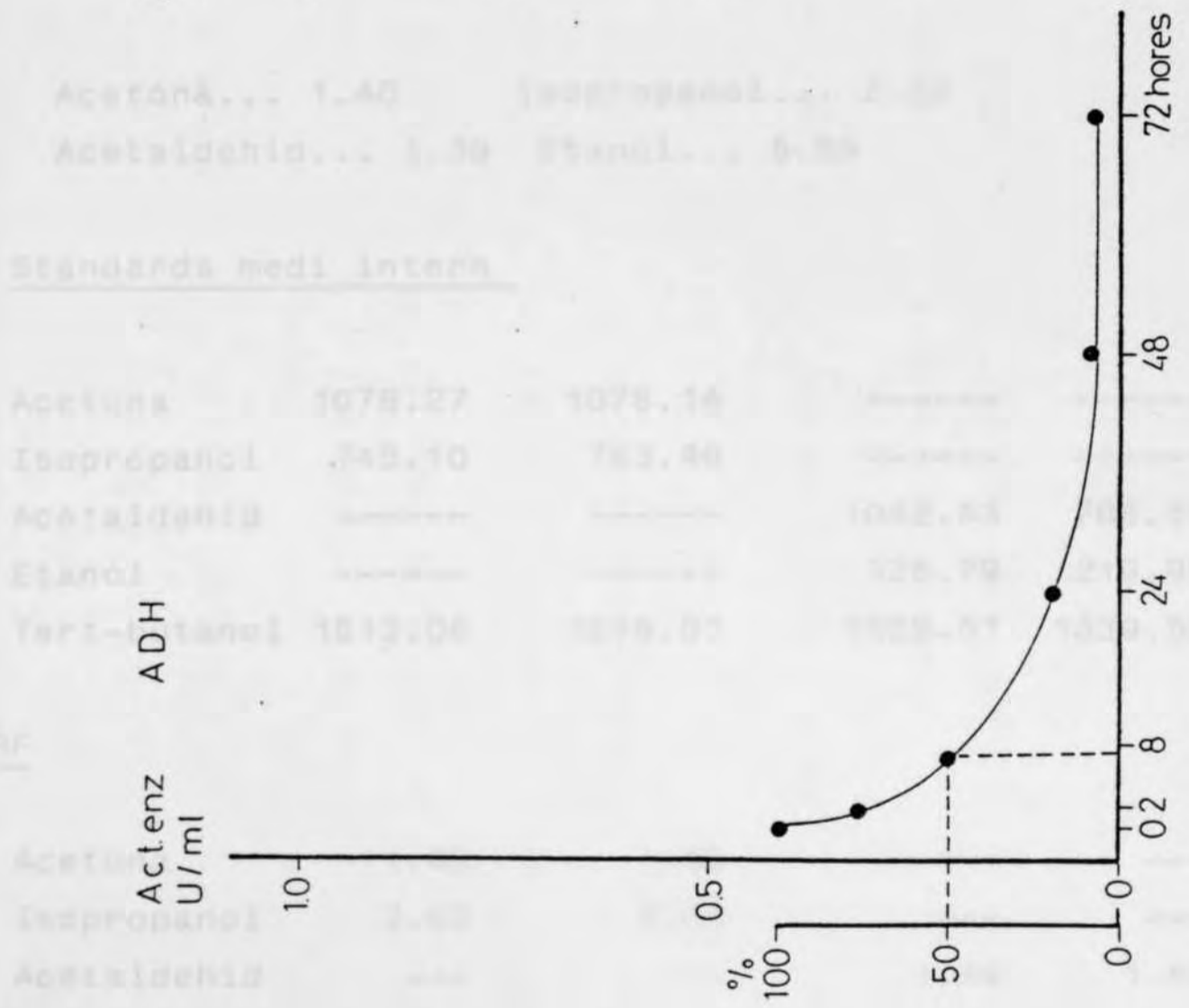
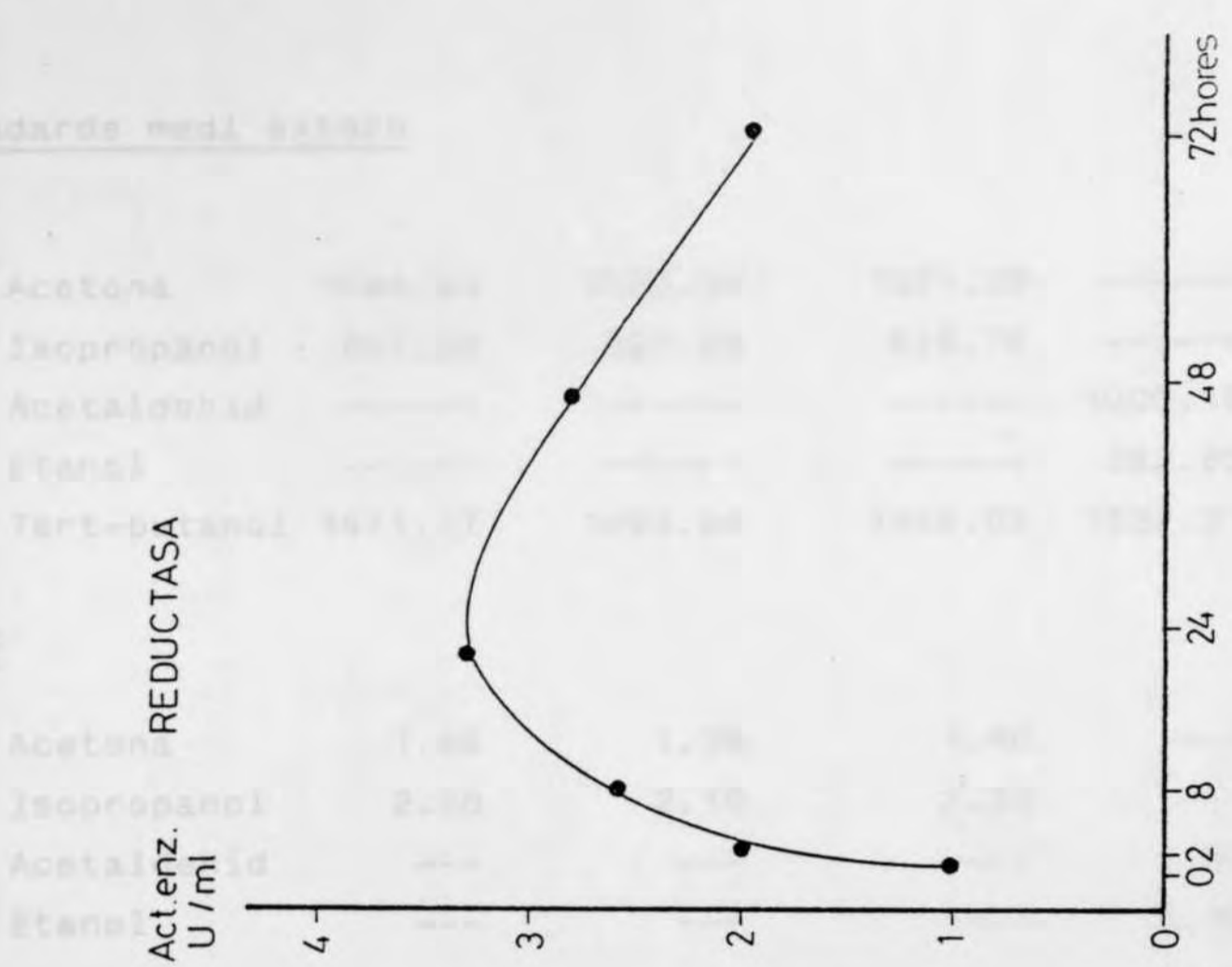


FIGURA 7.9. Activitats enzimàtiques de la prova nº2.



TAULA 7.9. Càlculs dels factors de normalització de les dades de la prova nº2.

Standards medi extern

|              |         |         |         |         |         |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Acetona      | 1044.93 | 1072.04 | 1031.29 | -----   | -----   |
| Isopropanol  | 667.09  | 691.28  | 618.78  | -----   | -----   |
| Acetaldehid  | -----   | -----   | -----   | 1000.16 | 1162.97 |
| Etanol       | -----   | -----   | -----   | 283.85  | 253.73  |
| Tert-butanol | 1471.77 | 1490.94 | 1446.05 | 1522.31 | 1478.41 |

RRF

|             |      |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|------|
| Acetona     | 1.40 | 1.39 | 1.40 | ---  | ---  |
| Isopropanol | 2.20 | 2.15 | 2.33 | ---  | ---  |
| Acetaldehid | ---  | ---  | ---  | 1.52 | 1.27 |
| Etanol      | ---  | ---  | ---  | 5.36 | 5.82 |

Acetona... 1.40      Isopropanol... 2.22  
 Acetaldehid... 1.39      Etanol... 5.59

Standards medi intern

|              |         |         |         |         |
|--------------|---------|---------|---------|---------|
| Acetona      | 1078.27 | 1078.14 | -----   | -----   |
| Isopropanol  | 745.10  | 743.46  | -----   | -----   |
| Acetaldehid  | -----   | -----   | 1042.43 | 788.56  |
| Etanol       | -----   | -----   | 326.79  | 219.99  |
| Tert-butanol | 1513.06 | 1516.01 | 1559.51 | 1339.55 |

RRF

|             |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|
| Acetona     | 1.40 | 1.40 | ---  | ---  |
| Isopropanol | 2.03 | 2.03 | ---  | ---  |
| Acetaldehid | ---  | ---  | 1.49 | 1.69 |
| Etanol      | ---  | ---  | 4.77 | 6.08 |

Acetona ... 1.40      Isopropanol... 2.03  
 Acetaldehid ... 1.59      Etanol ... 5.42.

TAULA 7.9. Càlculs dels Factors de Resposta de les proves de Cromatografia de Gasos(cas 3).

## ACETALDEHID

## ACETONA

## ISOPROPANOL

|             | ISOPROPANOL         | ACETONA   | ACETALDEHID                           |
|-------------|---------------------|---|---------------------------------------|
| TEÒRIC      | 7.80 (129.78)       |   |                                       |
| INICIAL     | 6.48 ± 0.54 (107.8) | 1.05x10 <sup>-4</sup> ± 0.2x10 <sup>-4</sup> (0.0018) | 0.0035 ± 1.3x10 <sup>-4</sup> (0.079) |
| 2h          |                     |   |                                       |
| CONTROL     | 6.55 (108.98)       | 1.4x10 <sup>-4</sup> (0.0023)                         | 0.0030 (0.068)                        |
| ISOPROPANOL | 6.42 ± 1.35 (106.8) | 0.058 ± 0.009 (0.99)                                  | 0.026 ± 0.003 (0.590)                 |
| 8h          |                     |   |                                       |
| CONTROL     | 7.53 (125.2)        | 1.24x10 <sup>-4</sup> (0.0021)                        | 0.0040 (0.090)                        |
| ISOPROPANOL | 5.97 ± 0.90 (99.3)  | 0.209 ± 0.011 (3.56)                                  | 0.013 ± 0.004 (1.040)                 |
| 24h         |                     |   |                                       |
| CONTROL     | 7.06 (117.46)       | 1.56x10 <sup>-4</sup> (0.0026)                        | 0.0040 (0.090)                        |
| ISOPROPANOL | 5.95 ± 0.65 (99.16) | 1.250 ± 0.113 (21.50)                                 | 0.027 ± 0.001 (0.612)                 |
| 48h         |                     |   |                                       |
| CONTROL     | 7.28 (121.12)       | 6.24x10 <sup>-4</sup> (0.0070)                        | 0.0026 (0.058)                        |
| ISOPROPANOL | 3.92 ± 0.83 (65.22) | 3.040 ± 0.226 (52.30)                                 | 0.116 ± 0.007 (0.270)                 |
| 72h         |                     |   |                                       |
| CONTROL     | 7.19 (119.62)       | 1.40x10 <sup>-3</sup> (0.0240)                        | 0.0040 (0.090)                        |
| ISOPROPANOL | 3.17 0.21 (52.74)   | 3.020 ± 0.430 (51.90)                                 | 0.054 ± 0.006 (0.122)                 |

TAULA 7.10. Composició del medi extern en mg de compost. La xifra entre paréntesi indica la concentració mM.

|                    | ISOPROPANOL | ACETONA                         | ACETALDEHID                     | ETANOL                         |
|--------------------|-------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| INICIAL            | -----       | $0.0105 \pm 6.5 \times 10^{-4}$ | $0.0092 \pm 1.4 \times 10^{-3}$ | -----                          |
| ISOPROPANOL<br>2h  | -----       | $0.0231 \pm 2.6 \times 10^{-3}$ | $0.0054 \pm 1.2 \times 10^{-3}$ | -----                          |
| ISOPROPANOL<br>8h  | -----       | $0.0420 \pm 1.5 \times 10^{-3}$ | $0.0165 \pm 6.5 \times 10^{-4}$ | -----                          |
| ISOPROPANOL<br>24h | traces      | $0.053 \pm 0.01 \times 10^{-3}$ | $0.0177 \pm 7.5 \times 10^{-4}$ | -----                          |
| ISOPROPANOL<br>48h | 0.296       | $0.1125 \pm 2.5 \times 10^{-3}$ | $0.114 \pm 7.0 \times 10^{-3}$  | -----                          |
| ISOPROPANOL<br>72h | 0.312       | $0.1430 \pm 3.0 \times 10^{-3}$ | $0.1750 \pm 1.0 \times 10^{-3}$ | $0.247 \pm 1.5 \times 10^{-3}$ |

TAULA 7.11. Composició del medi intern(homogenat cru), en mg de compostos. Aquestes quantitats es troben referides a 50 mg d'individus adults de D.hydei.

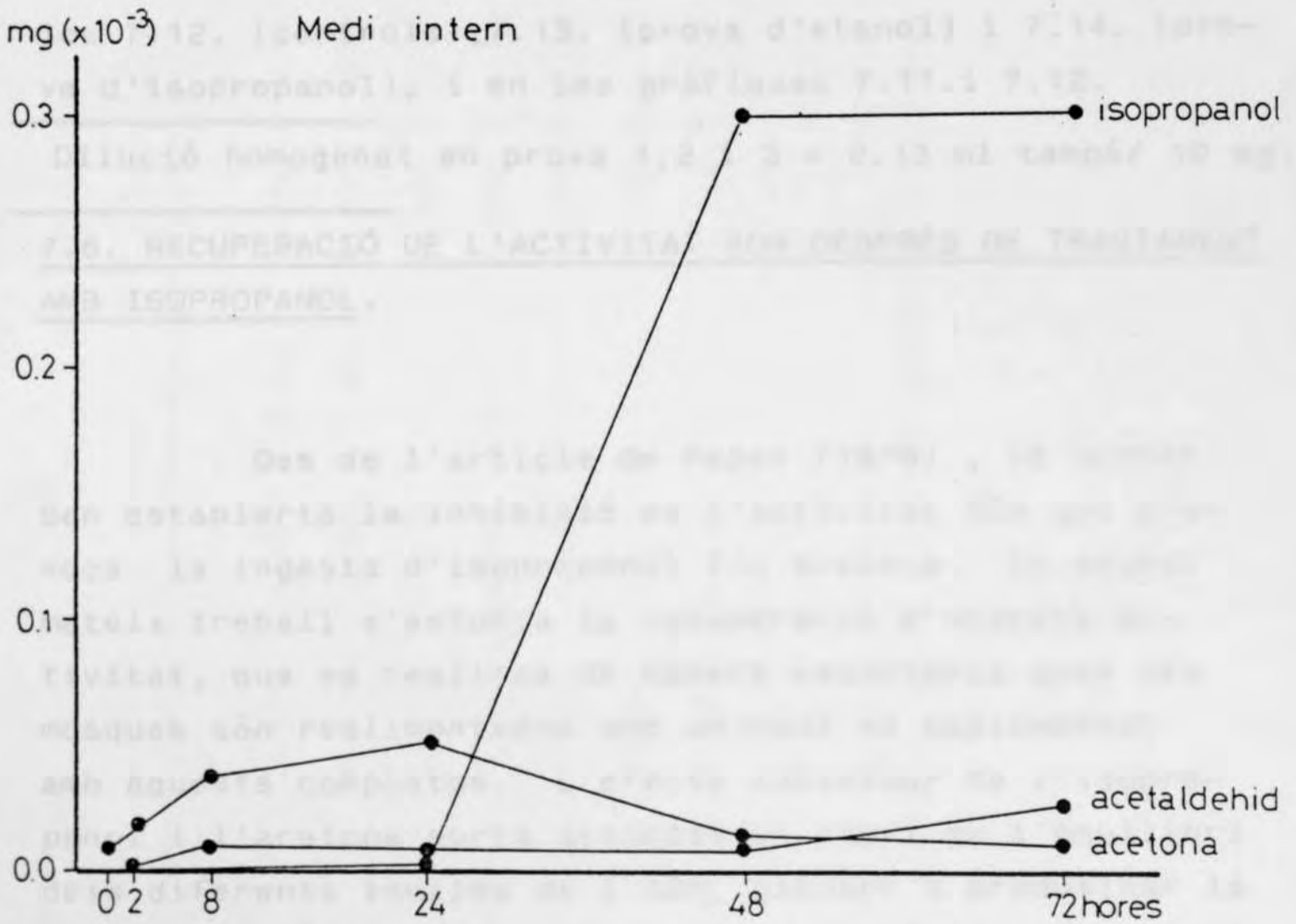
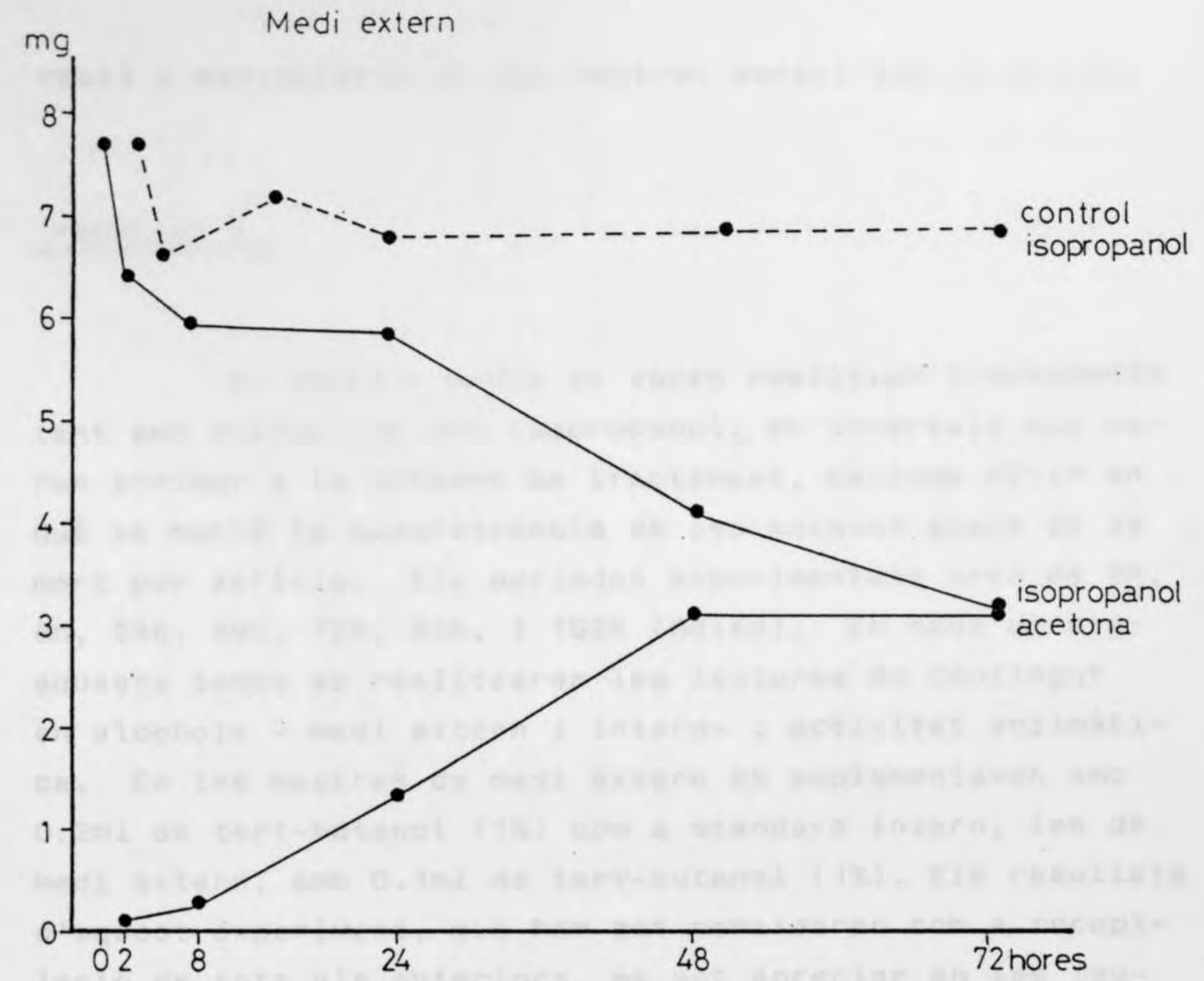


FIGURA 7.10. Concentracions d'alcohols i els seus metabòlits en la prova nº 2.

ració o manipulació de les mostres durant tot el procés.

### PROVA nº 3.

En aquesta prova es varen realitzar tractaments tant amb etanol com amb isopropanol, en intervals que varen arribar a la setmana de tractament, període màxim en què es manté la supervivència de les mosques abans de la mort per asfíxia. Els períodes experimentals eren de 2h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h, i 192h (8dies). En cada un d'aquests temps es realitzaren les lectures de contingut en alcohols - medi extern i intern- i activitat enzimàtica. En les mostres de medi extern es suplementaven amb 0.2ml de tert-butanol (1%) com a standard intern, les de medi extern, amb 0.1ml de tert-butanol (1%). Els resultats d'aquest experiment, que hom pot considerar com a recopilació de tots els anteriors, es pot apreciar en les taules 7.12. (controls), 7.13. (prova d'etanol) i 7.14. (prova d'isopropanol), i en les gràfiques 7.11. i 7.12.

Dilució homogenat en prova 1,2 i 3 = 0.13 ml tampó/ 10 mg.

### 7.6. RECUPERACIÓ DE L'ACTIVITAT ADH DESPRÉS DE TRACTAMENT AMB ISOPROPANOL.

Des de l'article de Papel (1979) , va quedar ben establerta la inhibició de l'activitat ADH que provoca la ingesta d'isopropanol i/o acetona. En aquest mateix treball s'estudia la recuperació d'aquesta activitat, que es realitza de manera espontània quan les mosques són realimentades amb un medi no suplementat amb aquests compostos. L'efecte inhibitor de l'isopropanol i l'acetona porta associat un canvi en l'equilibri dels diferents isozims de l'ADH, passant a predominar la forma més anòdica del pattern electroforètic. En el nostre cas, s'ha comprovat àmpliament aquest efecte de l'isopropanol, així com la interconversió de bandes, i la

|         | Activitat ADH (U/ml) |              |              | Activitat ACR (U/ml) |              |              |
|---------|----------------------|--------------|--------------|----------------------|--------------|--------------|
|         | control              | etanol       | isopropanol  | control              | etanol       | isopropanol  |
| inicial | 0.067                |              |              | 0.256                |              |              |
| 2h      | 0.616                | 0.674 ± 0.02 | 0.240 ± 0.01 | 0.269                | 0.288 ± 0.00 | 0.298 ± 0.01 |
| 8h      | 0.500                | 0.520 ± 0.02 | 0.231 ± 0.05 | 0.346                | 0.240 ± 0.01 | 0.365 ± 0.17 |
| 24h     | 0.462                | 0.674 ± 0.02 | 0.092 ± 0.02 | 0.308                | 0.520 ± 0.02 | 0.354 ± 0.01 |
| 48h     | 0.654                | 0.905 ± 0.02 | 0.057 ± 0.01 | 0.346                | 0.828 ± 0.08 | ---          |
| 72h     | 0.616                | 0.635 ± 0.07 | 0.028 ± 0.00 | 0.500                | 0.346 ± 0.00 | 0.963 ± 0.05 |
| 96h     | 0.404                | 0.520 ± 0.02 | 0.028 ± 0.02 | 0.269                | 0.323 ± 0.00 | 0.924 ± 0.00 |
| 192h    | 0.404                | 0.223 ± 0.02 | 0.024 ± 0.00 | 0.173                | 0.221 ± 0.01 | 0.500 ± 0.01 |

TAULA 7.12. Activitats enzimàtiques ADH i ACR corresponents a la prova nº 3.



|      | Acetaldehid<br>extern | Etanol<br>extern                               | Acetaldehid<br>intern * | Etanol<br>intern * |
|------|-----------------------|--|-------------------------|--------------------|
| 2h   | Control<br>etanol     | 4.50x10 <sup>-3</sup><br>0.035 ± 0.004         | 15.536<br>16.416 ± 1.04 | -----<br>-----     |
| 8h   | control<br>etanol     | 2.72x10 <sup>-3</sup><br>0.049 ± 0.036         | 17.152<br>16.425 ± 1.25 | -----<br>0.0372    |
| 24h  | control<br>etanol     | 4.26x10 <sup>-3</sup><br>0.028 ± 0.002         | 17.569<br>15.495 ± 0.45 | -----<br>0.0247    |
| 48h  | control<br>etanol     | 10.3x10 <sup>-3</sup><br>+---                  | 18.610<br>9.259 ± 1.38  | -----<br>0.0210    |
| 72h  | control<br>etanol     | 33.6x10 <sup>-3</sup><br>---                   | 18.120<br>-----         | -----<br>0.0342    |
| 96h  | control<br>etanol     | 14.4x10 <sup>-3</sup><br>---                   | 16.374<br>-----         | -----<br>-----     |
| 192h | control<br>etanol     | 19.9x10 <sup>-3</sup><br>4.74x10 <sup>-3</sup> | 18.912<br>0.215 0.20    | -----<br>4.567x10  |
|      |                       |  |                         | 0.0602             |

TAULA 7.13. Composició del medi intern i extern en el tractament d'etanol de la prova nº3.  
(mg). (\* referit a 50 mg d'individus adults de D.hydei).

|      | Acetona<br>externa                          | Isopropanol<br>extern | Acetona<br>interna * | Isopropanol<br>intern * | Acetaldeh<br>et.<br>interns          |
|------|---|-----------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| 2h   | Control 0.0025<br>isopropanol 0.030 ± 0.003 | 7.510<br>6.899 ± 0.11 | -----<br>0.0248      | -----<br>-----          | ---<br>---                           |
| 8h   | control 0.0041<br>isopropanol 0.200 ± 0.060 | 7.892<br>6.747 ± 0.24 | -----<br>0.0833      | -----<br>0.0186         | ---<br>---                           |
| 24h  | control 0.0057<br>isopropanol 0.814 ± 0.11  | 7.337<br>6.674 ± 0.15 | -----<br>0.0574      | -----<br>0.0322         | ---<br>---                           |
| 48h  | control 0.0071<br>isopropanol 2.939 ± 0.16  | 7.942<br>6.041 ± 0.26 | -----<br>0.1052      | -----<br>0.0461         | ---<br>---                           |
| 72h  | control 0.0431<br>isopropanol 3.827 ± 0.15  | 8.525<br>4.469 ± 0.06 | -----<br>0.1156      | -----<br>0.0547         | ---<br>---                           |
| 96h  | control 0.0431<br>isopropanol 3.961 ± 0.29  | 8.163<br>3.347 ± 0.20 | -----<br>0.0691      | -----<br>0.0361         | ---<br>traces                        |
| 192h | control 0.1176<br>isopropanol 4.358 ± 0.12  | 6.676<br>0.799 ± 0.09 | -----<br>0.0625      | -----<br>0.0332         | ---<br>3.837x10 <sup>-3</sup> traces |

TAULA 7.14. Composició del medi intern i extern en el tractament d'isopropanol de la prova nº3. (mg)  
 (\* referit a 50 mg. d'individus adults de D.hydei.)

TRACTAMENT ETANOL

Activitat enzimàtica (unitats)

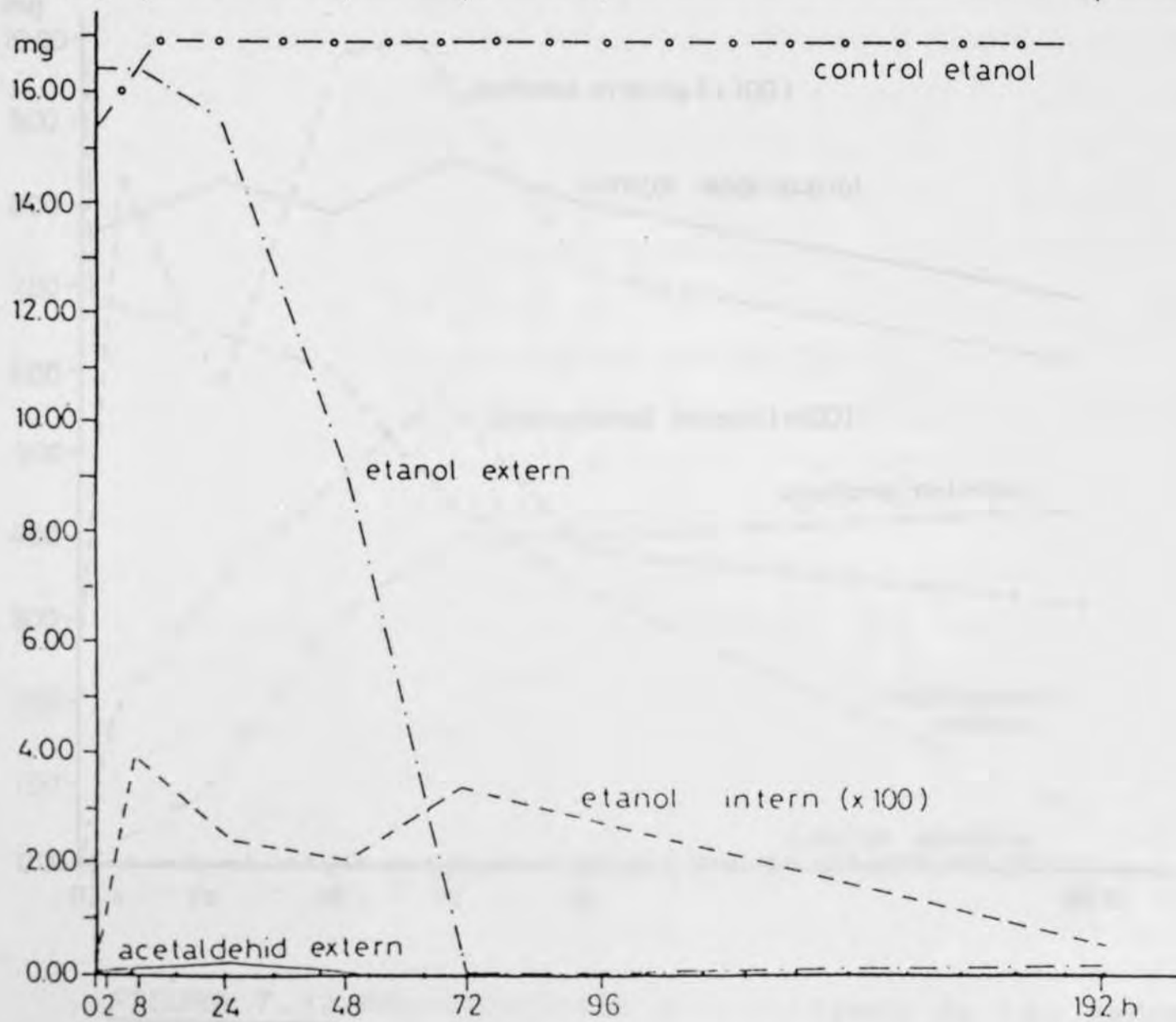
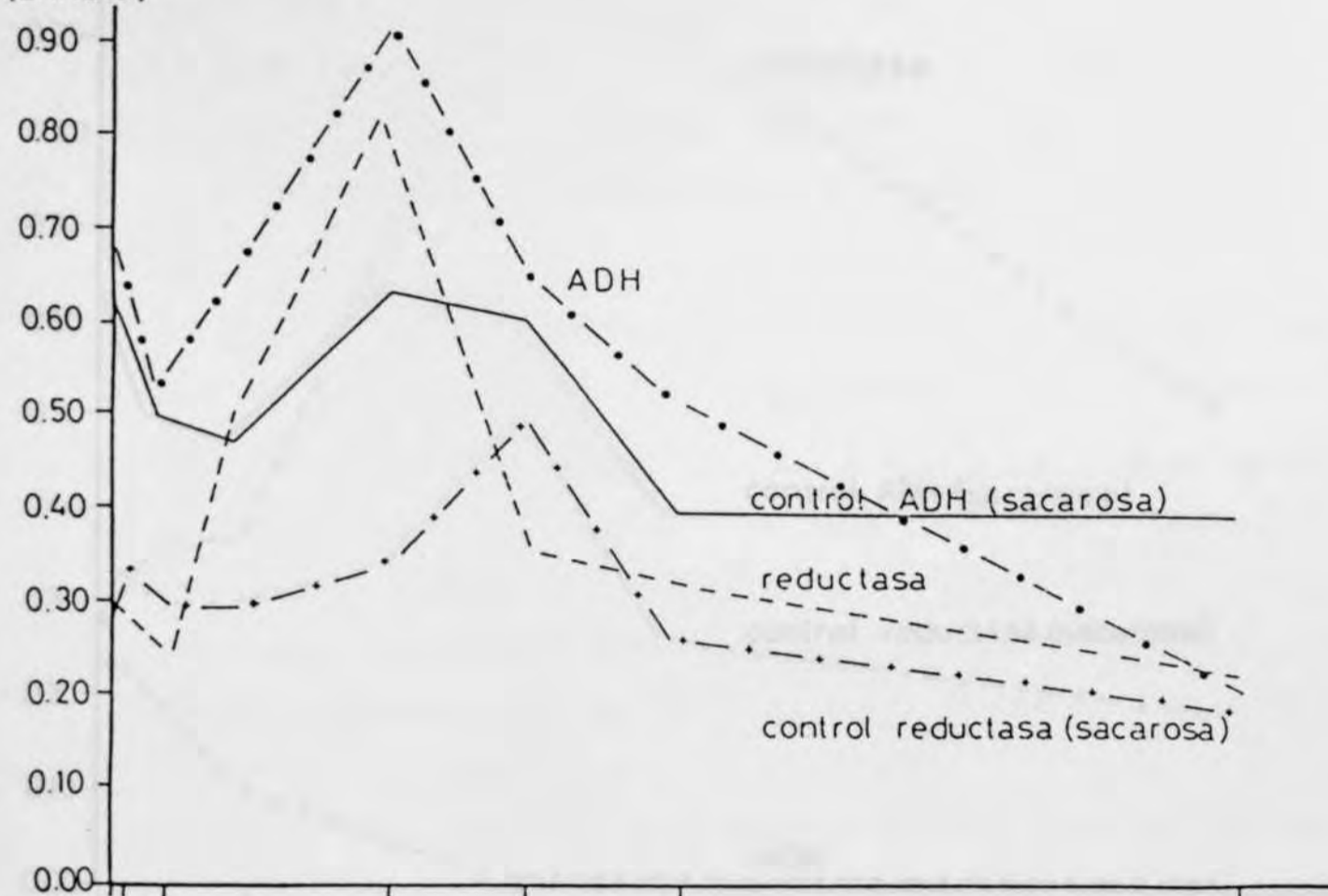


FIGURA 7.11. Representació globalitzada de les dades obtingudes en el tractament amb etanol, provan<sup>o</sup>3.

TRACTAMENT ISOPROPANOL

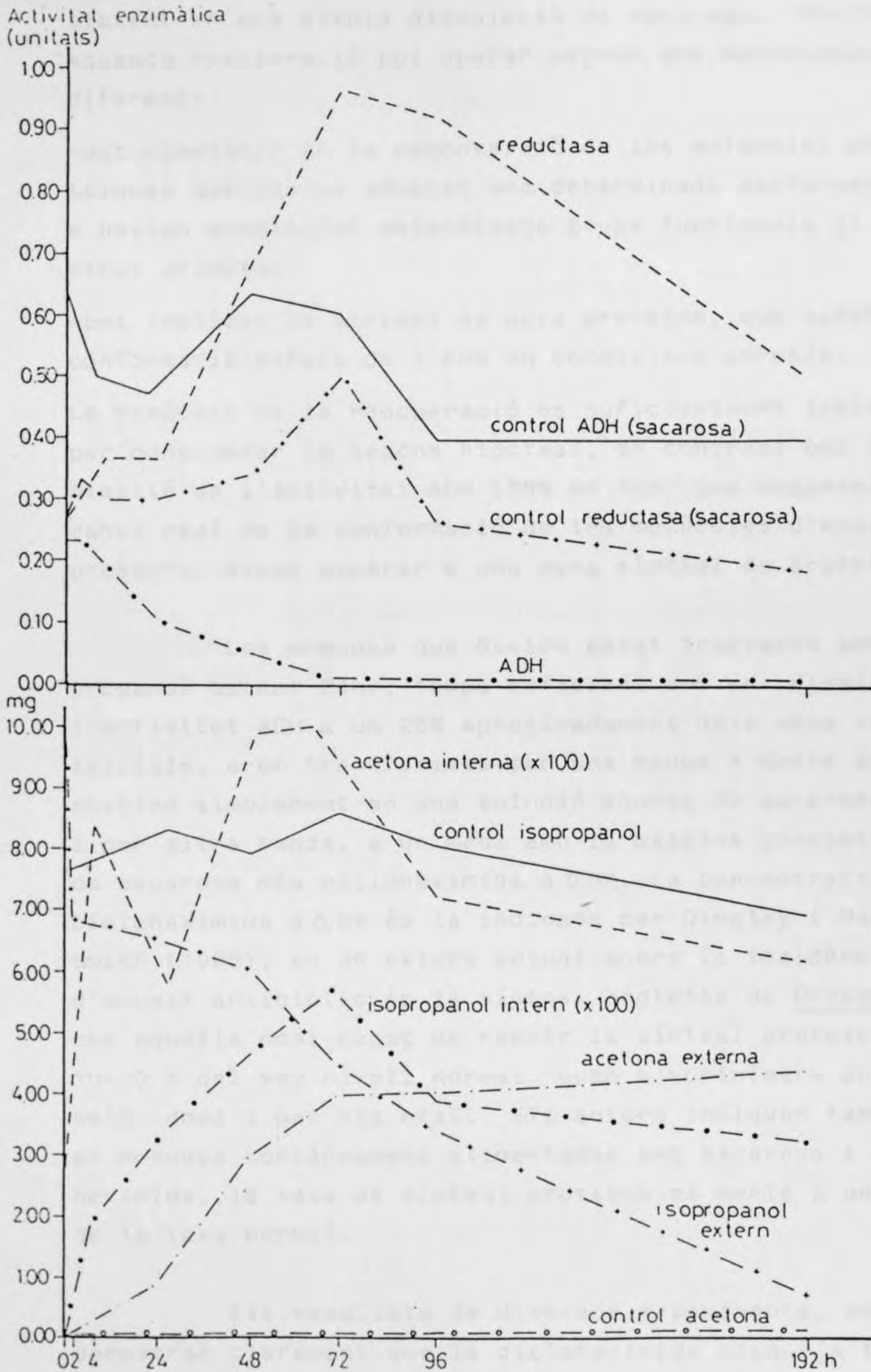


FIGURA 7.12. Representació globalitzada de les dades obtingudes amb el tractament amb isopropanol en la prova 3.

recuperació de la posterior activitat ADH en medi consistent en una simple dissolució de sacarosa. Ara bé, aquesta recuperació pot operar segons dos mecanismes diferents:

-pot consistir en la reconversió de les molècules proteiques que havien adoptat una determinada conformació o havien annexionat determinats grups funcionals al seu estat primitiu.

-pot implicar la síntesi de nova proteïna, que adopti la conformació pròpia de l'ADH en condicions normals.

La cinètica de la recuperació és suficientment lenta com per considerar la segona hipòtesi, en contrast amb la inhibició de l'activitat ADH (50% en 10h) que suggereix un canvi real de la conformació de les molècules d'enzim ja presents, sense esperar a una nova síntesi de proteïna.

Les mosques que havien estat tractades amb isopropanol durant 24h., temps suficient com per disminuir l'activitat ADH a un 25% aproximadament dels seus valors inicials, eren transferides per una banda a medis que consistien simplement en una solució aquosa de sacarosa, i per altra banda, a un medi amb la mateixa concentració de sacarosa més cicloheximida a 0.5%. La concentració de cicloheximida a 0.5% és la indicada per Dingley i Maynard-Smith (1968), en un extens estudi sobre la incidència d'aquest antibiòtic en la síntesi proteica de Drosophila, com aquella dosi capaç de reduir la síntesi proteica al 10-20 % del seu nivell normal, quan s'administra en una sola dosi i per via oral. Els autors indiquen també que en mosques contínuament alimentades amb sacarosa i cicloheximida, la taxa de síntesi proteica es manté a un 10% de la taxa normal.

Els resultats de diversos experiments, semblen demostrar clarament que la cicloheximida bloqueja la recuperació de l'activitat ADH després del tractament amb isopropanol (vegeu taula 7.15. i figura 7.13.)

TRACTAMENT - CICLOHEXIMIDA

transferència

|                             | Inicial | 24h    | 48h    | 72h    | 96h    |
|-----------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| etanol                      | 0.6677  |        |        |        |        |
| etanol                      |         | 0.6741 |        |        |        |
| a { sacarosa                |         |        | 0.4237 | ---    | 0.4237 |
| a { sacarosa +cicloheximida |         |        | 0.5393 | 0.5393 | 0.4044 |
| isopropanol                 |         | 0.0924 |        |        |        |
| a { sacarosa                |         |        | 0.2020 | 0.2889 | 0.4044 |
| a { sacarosa cicloheximida  |         |        | 0.0924 | 0.1040 | 0.0770 |

TAULA 7.15. Activitat ADH en les proves de l'efecte de la cicloheximida sobre la recuperació de l'activitat enzimàtica després d'inhibició per isopropanol.

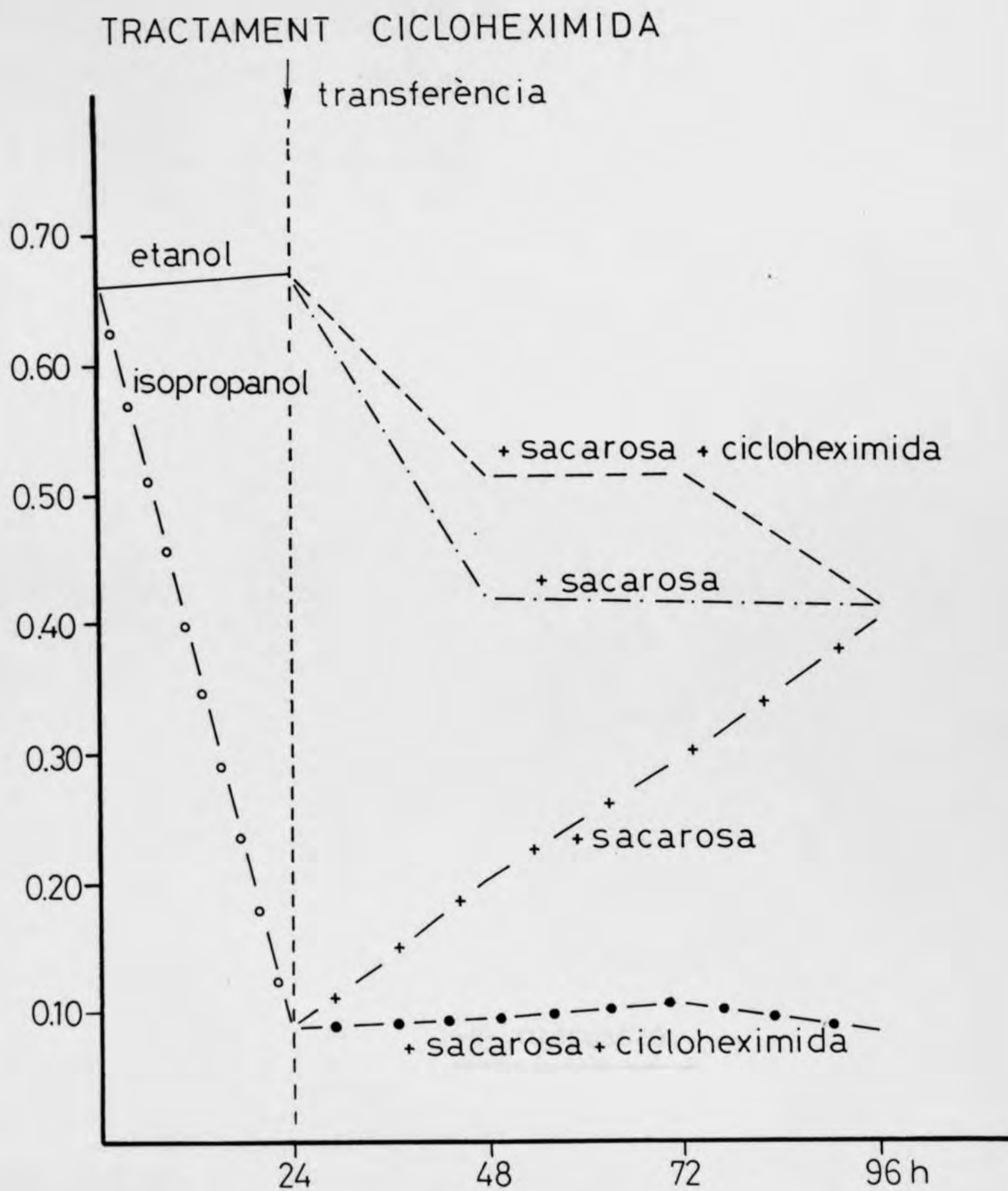


FIGURA 7.13. Evolució de les activitats enzimàtiques després de tractament amb etanol i/o isopropanol i exposició a la cicloheximida.

- B.1. PROPIETATS DE L'ENZIM ADH EN 16 ESPÈCIES DE DROSOPHILA .
- B.2. PURIFICACIÓ DE L'ADH DE D.HYDEI I PROPIETATS FUNCIONALS .
- B.3. ESTUDIS ESTRUCTURALS DE L'ADH DE D.HYDEI .
- B.4. METABOLISME DELS ALCOHOLS A DROSOPHILA .



8.1. PROPIETATS DE L'ENZIM ADH EN 16 ESPÈCIES DE DROSOPHILA .

8.2. PURIFICACIÓ DE L'ADH DE D.HYDEI I PROPIETATS FUNCIONALS .

8.3. ESTUDIS ESTRUCTURALS DE L'ADH DE D.HYDEI.

8.4. METABOLISME DELS ALCOHOLS A DROSOPHILA .

di larvari i en l'adult, i corbes amb un eix màxim ab-  
solut d'activitat que sigui en la larva del tercer esta-  
di o en l'adult de quatre a cinc dies després del naix-  
ment. Sembla doncs evident, que el perfil establert per  
a D.melanogaster, que en un principi s'havia pensat com a  
universal per seguir exactament les variacions del  
metabolisme basal de l'individu, no és universal, ni tan  
sola és el perfil més comú entre totes les espècies de  
Drosophila estudiades, com podria suposar que el màxim  
que es presenta sempre en la larva de tercer estadi del  
desenvolupament, bé que a nivell relatiu, bé que a abso-  
lut, té veritablement un sentit biològic: ja s'ha succe-  
nialat en la introducció que el paper de l'enzim ADH "in  
vivo" resta molt controvertit i, en Tot, malgrat l'equi-  
valència que pugui existir entre els perfils de desenvol-  
upament de diverses espècies, els nivells d'activitat  
enzimàtica són molt diferents entre un cas i l'altre.  
Els resultats obtinguts inclinen a fer pensar que hi ha  
un màxim comú d'activitat per a totes les espècies en la  
larva de tercer estadi, però relacionat amb el con-  
tinent, atès que l'enzim no té un màxim relatiu en el tercer  
estadi sinó que el màxim de l'adult restaria més lligat als hàbits  
alimentaris de l'espècie.

Els estudis de tolerància envers els alcohols  
etanol i isopropanol van revelar que no existeix una  
relació directa entre aquest paràmetre i els nivells d'  
activitat ADH. L'ADH com a enzim, inicia la degradació  
metabòlica dels alcohols, i s'ha de considerar un factor

### 8.1. PROPIETATS DE L'ENZIM ADH EN 16 ESPÈCIES DE DROSOPHILA.

Tal com s'ha esmentat en el seu moment, existeixen dos models generals de corbes d'activitat ADH al llarg del cicle biològic: corbes en U (màxims en l'estadi larvari i en l'adult), i corbes amb un sol màxim absolut d'activitat (ja sigui en la larva del tercer estadi o en l'adult de quatre o cinc dies després del naixement). Sembla doncs evident, que el perfil establert per a D.melanogaster, que en un principi s'havia prèes com a universal per seguir exactament les oscil·lacions del metabolisme basal de l'individu, no és universal, ni tan sols és el perfil més comú entre totes les espècies de Drosophila estudiades. Hom podria suposar que el màxim que es presenta sempre en la larva de tercer estadi del desenvolupament, bé com a màxim relatiu, bé com a absolut, té veritablement un sentit biològic: ja s'ha assenyalat en la introducció que el paper de l'enzim ADH "in vivo" resta molt controvertit i, de fet, malgrat l'equivalència que pugui existir entre els perfils de desenvolupament de diverses espècies, els nivells d'activitat enzimàtica són molt diferents entre un cas i l'altre. Els resultats obtinguts inclinen a fer pensar que hi ha un màxim comú d'activitat per a totes les espècies en la larva de tercer estadi, potser relacionat amb el contacte permanent de la larva amb el medi on habita, mentre que el màxim de l'adult restaria més lligat als hàbitats alimentaris de l'espècie.

Els estudis de tolerància envers els alcohols etanol i isopropanol varen revelar que no existeix una relació directa entre aquest paràmetre i els nivells d'activitat ADH. L'ADH com a enzim, inicia la degradació metabòlica dels alcohols, i s'ha de considerar un compo-

ment més del mecanisme fisiològic general mitjançant el qual l'organisme desenvolupa la seva tolerància als alcohols ambientals. En casos on l'activitat ADH destaquí, sigui per uns valors molt elevats o molt disminuïts, aquest component tindrà un pes específic molt important respecte la resta de les altres variables que intervinguin en la resistència a l'alcohol de l'espècie en qüestió, de manera que es podrà apreciar una bona relació entre ambdós paràmetres. Aquest és el cas que exemplificarien D.hydei -alta activitat ADH--- alta tolerància a l'etanol i isopropanol- i D.phalerata -baixa activitat ADH --- baixa tolerància a l'etanol i isopropanol-. En la resta de les espècies estudiades, l'efecte de l'activitat ADH en la tolerància queda probablement emmascarat darrera el paper de molts altres paràmetres que determinarien quines són les concentracions d'alcohol que la mosca pot ingerir sense presentar greus trastorns. Ziolo i Parsons (1982) , consideren acertadament la tolerància als alcohols com "un fenomen metabòlic determinat de manera poligènica , que evoluciona a nivell local en resposta al contingut de metabolits en les fonts d'alimentació d'aquell hàbitat natural".

En quant a l'estabilitat de l'enzim, s'ha d'assenyalar que en homogenat cru, presenta valors relativament baixos -estabilitat mitjana de 4 a 7 dies-, ja que l'enzim es veu sotmés a l'acció de múltiples proteases (Thatcher, 1977). Els valors d'estabilitat obtinguts no representen doncs únicament una propietat intrínseca de l'ADH de cada espècie, sinò un conjunt de factors on hi compten també la presència de diversos productes inter- i intra-cel.lulars. Una prova de l'existència d'aquests factors que influeixen sobre els nivells d'activitat ADH és el fet que quasi la totalitat d'espècies mostren una recuperació al voltant del 7è dia de preparada la mostra després d'una davallada contínua. Aquest fet es podria interpretar com una degradació d'inhibidors de l'activitat ADH en l'organisme o bé una estabilització de l'enzim en solució.

El mateix tipus de consideracions es podrien fer per a les determinacions de pH òptim de l'enzim, ja que són molts els factors que, "in vivo", poden estar influint el pH al qual l'enzim mostri major activitat : grau d'ionització de la mateixa ADH, del substrat, del coenzim, activació o desactivació d'altres molècules que interaccionin amb l'ADH ,... Algunes espècies mostren un sol màxim d'activitat, mentre que la majoria presenten dos pics, com a característica de moltes oxidoreductases (Bachur, 1976) i de l'ADH en estat pur (vegeu capítol 5).

L'anàlisi dels punts isoelèctrics (pI) de l'ADH de cada una de les espècies, revela que, llevat d'algunes variacions aïllades, totes les altres espècies es poden dividir en tres grans grups, amb pI comuns:(s'assenayla en cada cas el valor corresponent a l'isozim més actiu):

7.40: D.melanogaster<sup>S</sup>, D.teissieri, D.mauritiana.

8.41: D.yakuba, D.greeni, D.willistoni, D.subobscura, D.guanche

8.83: D.kikkawai, D.bocqueti, D.gaucha, D.pavani, D.hydei.

Com a casos aïllats, cal esmentar les dues espècies extremes: D.erecta amb l'ADH més àcida registrada (6.38) i D.phalerata (8.90), la d'ADH més bàsica. D.littoralis i D.burlai mostren aparent polimorfisme enzimàtic, amb valors entre 7.5 i 6.9 per a la primera i 8.77 i 7.21 per a la segona. Una anàlisi d'aquests resultats en du a les següents conclusions:

-totes les espècies mostren com a mínim dues o tres bandes d'activitat ADH, perfectament diferenciables, la qual cosa sembla indicar la universalitat de l'existència de diferents conformòmers en totes les espècies de Drosophila.

-algunes espècies mostren més de tres bandes. Aquest fenomen es pot interpretar com l'existència de polimorfisme enzimàtic -com a mínim 2 al·lels en la població-que proporcionarien els corresponents heterozigots; o bé com l'

- P I
- 1 - 8.90
- 2 - 8.83
- 3 - 8.41
- 4 - 7.40
- 5 - 6.38

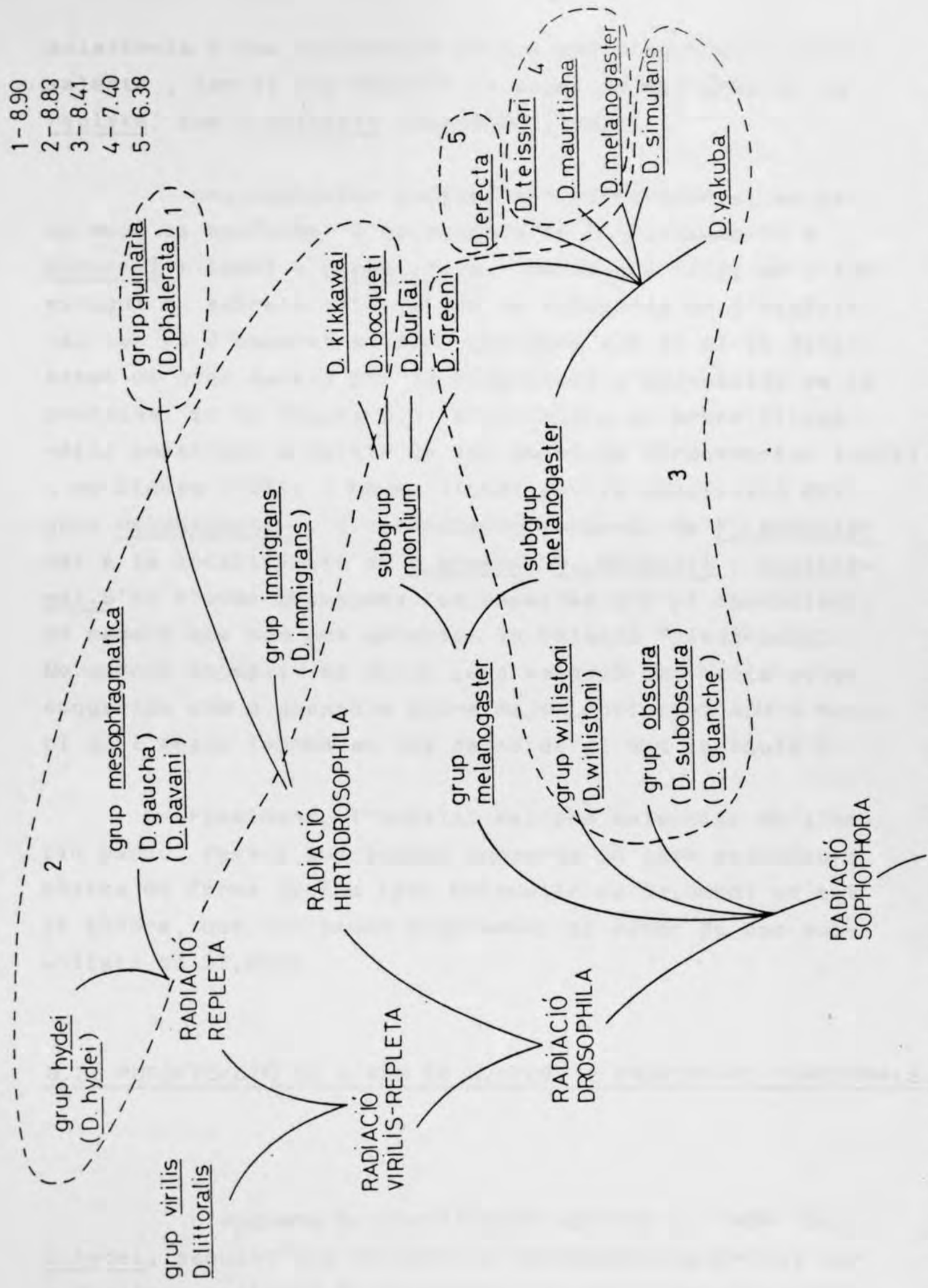


FIGURA 8.1. Arbre filogenètic del gènere *Drosophila* on s'han agrupat les espècies de punt isoelectric de l'ADH (banda més intensa) coincidents.



existència d'una duplicació gènica amb productes no equivalents , com el cas descrit en espècies del grup de la repleta, com D.buzzatti (Oakeshott,1982).

Una posterior anàlisi per electroforesi en gel de midó va confirmar l'existència de 2 al·lelomorfs a D.burlai i també a D.phalerata. Sembla que el pI de l'ADH estigui en estreta relació amb la filogenia de l'espècie, tal com és d'esperar si hom considera que el pI ve determinat de gran manera per la composició d'aminoàcids de la proteïna. En la figura 8.1. s'il·lustra un arbre filogenètic construït a partir de les dades de Throckmorton (1975) i de Eisses (1979) i Cseko (1979) per la subdivisió del grup melanogaster , i comunicació personal de F.Lemeunier per a la localització de D.greeni, D. bocqueti i D.kikkawai. S'hi troben agrupades les espècies amb pI equivalent, de manera que hom pot apreciar la relació filogenia/pI. No sembla acomplir-se doncs , una relació que havia estat suggerida com a possible entre major activitat ADH i menor pI de l'enzim (compareu les dades de pI amb la taula 3.1.)

Finalment, l'anàlisi del pes molecular de l'enzim nadiu, revela que aquest conserva la seva estructura bàsica de forma activa (pes molecular de 54,000d) en tot el gènere, que correspon segurament al dímer de dos subunitats de 27,000d.

## 8.2. PURIFICACIÓ DE L'ADH DE D.HYDEI I PROPIETATS FUNCIONALS.

L'esquema de purificació aplicat a l'ADH de D.hydei, seguint les directrius principals descrites per a d'altres espècies de Drosophila (Juan i Gonzalez,1980) dóna com a resultat una preparació final de proteïna que supera satisfactòriament tots els criteris de puresa establerts (vegeu fig. 4.7. a 4.9.) Les quantitats d'enzim

pur obtingudes al final del procés oscil·la al voltant d'uns 14.5mg d'ADH pura per cada 100g de larves de D.hydei del tercer estadi. No es varen detectar variacions en aquesta proporció en purificacions realitzades a partir de diferents pesos inicials de larves. Els rendiments de la purificació donen un valor promig d'un 40% d'activitat enzimàtica final respecte a la detectada després de la primera columna de filtració en gel -Sephadex G-25. El rendiment de l'operació s'ha calculat respecte a l'etapa esmentada ja que sovint és aquella que dóna uns valors d'activitat absoluta més elevats, superiors i tot a l'activitat total inicial. L'activitat específica de l'ADH de D.hydei és de 9.26 u/mg, valor que s'ajusta al de les altres espècies estudiades fins al moment (Vilageliu i col., 1982). El monòmer de l'enzim té un pes molecular de 27,224d, calculat per electroforesi en SDS de la proteïna pura. Ja que el pes molecular de l'enzim nadiu ha estat fixat en 54,213d, resulta evident que la forma activa consta de dues subunitats equivalents. L'enzim en estat pur presenta, en tampó Tris-HCl 20mM pH 8.6, una vida mitjana de 85.27 dies, valor molt semblant a l'obtingut amb una preparació de l'enzim D.melanogaster per Juan (1980) -vegeu figura 5.2. L'espectre d'absorció molar de l'enzim presenta 2 màxims, un d'absolut a 280nm i un de realtiu a 290nm. El coeficient d'absorció molar calculat a partir d'aquest espectre va proporcionar un valor de  $5.425 \times 10^4$  l/mol cm. Els pH òptims d'activitat de l'enzim pur presenten uns valors de 7.925 i 9.375 en tampó Tris-HCl 20mM. El fet de presentar dos òptims pel pH d'activitat enzimàtica és una característica que es repeteix en moltes oxidoreductases (Bachur, 1976), i aquest cas no n'és una excepció. Els pH de 7.925 i 9.375 s'allunyen bastant de la suposada neutralitat del pH fisiològic, però estan en absoluta concordança amb els de l'enzim de les altres espècies estudiades (Vilageliu i col. 1982). Els valors esmen-

tats no concorden amb els del pH òptim determinat per a aquesta mateixa espècie a partir de l'homogenat cru (pH= 8.5), indicant que hi ha components intra i extracel·lulars que afecten decisivament a aquest paràmetre i que, de fet, estan condicionant la funcionalitat "in vivo" de l'enzim. Les determinacions de pH òptim a partir de preparacions pures dependran quasi exclusivament dels estats iònics dels punts actius de la molècula que intervinguin en el mecanisme de catàlisi.

Els càlculs de les constants cinètiques aparents de l'enzim, tant pel seu coenzim com per a diferents substrats, es va realitzar mitjançant dos mètodes: l'equació de Linearització de Lineweaver-Burk i el mètode d'Eisenthal, que proporciona estimacions no esbiaixades d'aquests paràmetres. La constant de Michaelis ( $K_m$ ) aparent i la velocitat de reacció s'assenyalen en la taula 8.1., juntament amb els valors de les altres espècies estudiades (Vilageliu i col.1982).  $K_m / \text{NAD}^+$  és de  $0.168 \pm 0.002$ , valor que no difereix significativament dels altres casos. Aquest fet indica que l'afinitat de l'enzim envers el seu coenzim no varia en gran mesura, D'aquí podem postular dues conclusions: primerament que les diferències d'activitat enzimàtica observades entre espècies no es deuen a un nivell d'afinitat diferent pel coenzim; i en segon lloc, que la regió d'unió del  $\text{NAD}^+$  deu correspondre a una zona de la proteïna considerablement ben conservada durant l'evolució.-Aquest punt serà discutit més extensament quan es faci referència a l'estructura primària de l'enzim-. Les diferències d'afinitat envers els diferents substrats assejats es fa també palesa en la mateixa taula, divergències que coincideixen també amb les divergències interespecífiques. Com en la resta dels casos, l'ADH de D.hydei resulta molt més activa per als alcohols secundaris (isopropanol i isobutanol) que en front dels primaris (etanol, n-propanol i n-butanol). Dins dels alcohols secundaris, l'afinitat creix



d'acord amb la longitud de la cadena alifàtica (isobutanol isopropanol). En canvi, amb els alcohols primaris, l'afinitat per l'n-propanol és major que per l'n-butanol, i l'etanol és, paradoxalment, aquell pel qual l'ADH mostra menys afinitat. En general, l'enzim ADH de D.hydei mostra unes característiques cinètiques molt properes a les de l'enzim de D.simulans. Cal examinar els resultats de la velocitat màxima de reacció per als diferents substrats esmentats. Es confirma de nou la similitud de les ADH de D.hydei i D.simulans, fet que podria representar un cas de convergència biològica d'aquestes dues espècies que es troben molt allunyades dins de la filogènia del gènere Drosophila -Un cas semblant de convergència va ésser descrit per Juan (1980) entre D.melanogaster i D.virilis. Cal interpel·lar-se sobre la significació global que les dades presentades poden tenir en relació amb la funcionalitat de l'enzim "in vivo". En la taula 8.2. es presenten les freqüències de captura de les espècies de Drosophila esmentades en diferents hàbitats de poblacions corresponents a la regió Est de l'Estat Espanyol ( a partir de dades de Monclús i Prevosti 1981). Dues espècies: D.simulans i D.immigrans es caracteritzen per la seva quasi total absència d'altres hàbitats que no siguin el camp obert. De les restants, tres (D.melanogaster, D.virilis i D.funnebris) presenten valors propers al 50% dins dels cellers. D.hydei presenta valors del 25% per a cellers i zones habitades, i 50% per al camp obert. Té això alguna relació amb les propietats cinètiques de l'enzim? És evident que l'adaptació d'algunes espècies a hàbitats rics en etanol, no s'ha guiat per l'afinitat del seu ADH envers aquest alcohol, ja que D.melanogaster, l'espècie típica per excel·lència en l'interior dels cellers, posseix una ADH amb un grau d'afinitat comparativament molt pobre respecte l'etanol. Contràriament, si hom procedeix a analitzar les velocitats màximes de l'enzim, hom aprecia directament la relació que existeix entre aquesta velocitat i el que podríem denominar

"grau de presència" de l'espècie en els cellers". La relació lineal es manté pels alcohols etanol, isopropanol i n-butanol; i mostra alguns punts de discordança per a l'isobutanol i l'n-propanol. Anderson i col(1981) assenyalen que el paper que cada una de les constants cinètiques ( $K_m$  i  $V_{max}$ ) d'un enzim podria jugar en la metabolització del/s seu/s substrat/s és molt diferent segons les condicions en les quals es dugui a terme la catàlisi : la  $K_m$  fóra un paràmetre determinant quan les concentracions de substrat no atenyessin el valor que expressa aquesta constant. En el moment en què les concentracions d'alcohol sobrepassessin la  $K_m$ , la reacció vindria determinada per la  $V_{max}$ , a la qual pot arribar l'enzim, així com per la quantitat total de l'enzim present en l'organisme. En altres paraules, això suposaria que el paràmetre determinant de la funció nutritiva de l'ADH seria la seva  $K_m$  i per a la funció detoxificant caldria analitzar  $V_{max}$ . Els autors esmentats expliquen mitjançant aquest raonament perquè els individus de l'al·lelomorfe  $ADH^S$  de D.melanogaster semblen posseir una eficàcia biològica superior als de l' $ADH^f$  a baixes concentracions d'etanol en la dieta, mentre que el protagonisme s'inverteix a altes concentracions d'etanol :  $K_m ADH^S < K_m ADH^f$  , però  $V_{max} ADH^f > V_{max} ADH^S$  ). Així doncs,, la presència d'espècies dins dels cellers on la funció de l'ADH és principalment detoxificant, està lògicament lligada amb la velocitat màxima del seu enzim ADH. A la vegada, els resultats confirmen que aquestes espècies sintetitzen una elevada quantitat d'ADH (Vilageliu i col. 1982), excepte el cas de D.funnebris, que sembla compensar aquesta deficiència amb una ADH d'activitat específica anormalment alta. ADH de D.hydei té una  $V_{max}$  per l'etanol de 2.77 mols/min/mol sub. i una  $K_m$  per a l'etanol de 5.62mM. Aquests valors li confereixen d'una banda, una acceptable disponibilitat per detoxificar l'etanol -com demostra la presència d'un 27% de la població en els cellers-, i també una bona disposició a nivells més baixos d'alcohols, que podem suposar que caracteritzen els

|                  | <u>D.melanogaster</u> | <u>D.simulans</u> | <u>D.virilis</u> | <u>D.funnebris</u> | <u>D.immigrans</u> | <u>D.hydei.</u> |
|------------------|-----------------------|-------------------|------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| NAD <sup>+</sup> | 0.26 ± 0.05           | 0.19 ± 0.02       | 0.20 ± 0.02      | 0.15 ± 0.02        | 0.16 ± 0.01        | 0.16 ± 0.00     |
| Isopropanol      | 1.87 ± 0.03           | 0.93 ± 0.05       | 1.99 ± 0.16      | 2.90 ± 0.44        | 1.53 ± 0.38        | 0.81 ± 0.06     |
| Isobutanol       | 0.86 ± 0.06           | 0.41 ± 0.12       | 1.60 ± 0.28      | 2.08 ± 0.42        | 1.49 ± 0.39        | 0.43 ± 0.07     |
| Etanol           | 8.92 ± 0.35           | 5.22 ± 0.86       | 6.44 ± 0.99      | 13.11 ± 1.88       | 12.42 ± 1.50       | 5.62 ± 0.47     |
| N-propanol       | 3.42 ± 0.45           | 3.33 ± 0.18       | 4.16 ± 0.46      | 8.21 ± 1.01        | 5.06 ± 0.52        | 1.95 ± 0.39     |
| N-butanol        | 3.31 ± 0.35           | ---               | 3.01 ± 0.27      | 9.39 ± 1.43        | 6.02 ± 0.00        | 2.64 ± 0.49     |

Constants de Michaelis de l'ADH de les diferents espècies.

|             | <u>D.melanogaster</u> | <u>D.simulans</u> | <u>D.virilis</u> | <u>D.hydei.</u> |
|-------------|-----------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| Isopropanol | 9.78 ± 1.01           | 6.67 ± 1.07       | 8.15 ± 1.66      | 7.36 ± 0.21     |
| Etanol      | 4.78 ± 0.50           | 2.08 ± 0.23       | 4.01 ± 0.17      | 2.77 ± 0.15     |
| Isobutanol  | 9.34 ± 0.86           | 6.02 ± 0.95       | 7.75 ± 1.66      | 5.93 ± 0.43     |
| N-propanol  | 4.60 ± 0.94           | 2.15 ± 0.15       | 4.99 ± 0.36      | 2.70 ± 0.09     |
| N-butanol   | 5.75 ± 0.91           | ---               | 6.13 ± 0.19      | 4.18 ± 0.17     |

Velocitats màximes de reacció de l'ADH de les diferents espècies.

TAULA 8.1. Constants cinètiques.

|                       | -1-   | -2-   | -3-   | -4-   |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| <u>D.melanogaster</u> | 58.22 | 7.85  | 33.91 | 41.76 |
| <u>D.simulans</u>     | 0.10  | 2.70  | 97.18 | 99.88 |
| <u>D.virilis</u>      | 45.88 | 1.17  | 52.90 | 54.07 |
| <u>D.funnebris</u>    | 45.60 | 25.35 | 29.04 | 54.39 |
| <u>D.immigrans</u>    | 0.14  | 5.23  | 94.59 | 99.82 |
| <u>D.hydei</u>        | 27.30 | 21.77 | 50.90 | 72.62 |

-1- Cellers

-2- Hábitat domèstic

-3- Natura (camp obert)

-4- (2) + (3)

TAULA 8.2. Dades de freqüències de captura de cada una de les espècies. ( Segons Monclús i Prevosti, 1979)

hàbitats domèstics i la natura. L'aparent paradoxa que l'espècie D.simulans, que és la que mostra una Km més baixa per l'etanol, sigui aquella que es troba tradicionalment absent dels cellers, confirma la teoria anterior, i indicaria que D.simulans posseiria avantatge selectiu a l'hora d'utilitzar l'etanol com a font d'energia, a baixes concentracions ambientals.

### 8.3. ESTUDIS ESTRUCTURALS DE L'ADH DE D.HYDEI.

Les anàlisis d'aminoàcids de la proteïna revelaren una composició bàsicament anàloga a la de l'ADH de les espècies que havien estat estudiades fins al moment (Thatcher, 1977; Vilageliu i col. 1982)-vegeu taula 8.3.- La oxidació prèvia a la hidròlisi àcida de la proteïna revela 2 residus de cisteïna -valor també constant a totes les espècies, fet que indica que el pont disulfur creat és de la màxima importància per al manteniment de l'estructura terciària necessària per a la funcionalitat de l'enzim. ADH de D.hydei presenta 4 histidines, com D.melanogaster (ADH<sup>S</sup>) i D.simulans, 6 arginines com D.funnebris i 4 triptòfans com els detectats per anàlisi d'aminoàcids en la resta de les espècies. És molt probable que el nombre de residus de triptòfan sigui superior al que es detecta sotmetent l'enzim a hidròlisi amb un àcid dèbil com el p-toluen-sulfònic, tal com s'ha deduït en seqüenciar el gen Adh de D.melanogaster i comptabilitzar cinc triptòfans ( Benyajati, 1981) La molècula presenta segons anàlisi d'aminoàcids, un residu de metionina, aminoàcid absent en l'ADH de D.melanogaster i D.simulans, però detectat en totes les altres espècies estudiades. En el cas de D.hydei el residu únic de metionina va ésser detectat fins i tot després de dràstiques condicions d'hidròlisi (105°C, 108h, 10<sup>-2</sup>atm ) que eliminen qualsevol possibilitat que es tractés d'una impuresa de la mostra. Malgrat això no va ésser possible la detecció

de metionina-sulfona o metionina -sulfòxid en l'anàlisi d'aminoàcids de la proteïna oxidada per causes tècniques. Per confirmar doncs la presència d'aquesta metionina es va realitzar la digestió amb BrCN. El resultat va ésser el d'una hidròlisi parcial de la molècula en dos fragments tals que la suma dels seus pesos moleculars coincideix amb la mida del monòmer d'ADH. Si es confirma aquesta hipòtesi, l'aminoàcid metionina estaria situat aproximadament en la regió central de la cadena proteica de 254 residus de la subunitat d'ADH. Aquest fet podria explicar també el mínim rendiment de la digestió amb BrCN, ja que aquella regió és un nucli molt compacte, hidrofòbic, resistent fins i tot al mateix procés de carboximetilació.

Per a quantificar d'alguna manera les analogies entre la composició d'aminoàcids de D.hydei respecte les altres espècies es va utilitzar el paràmetre de Marchalonis (1972), com queda reflexat en la taula 8.4. Per tal de donar una representació gràfica a aquests valors, es varen aplicar dos mètodes d'anàlisi multivariada: la taxonomia numèrica i l'anàlisi de coordenades principals. La taxonomia numèrica té com a finalitat obtenir una classificació jeràrquica sobre "N entitats", prenent com a informació bàsica la matriu de similaritats entre aquestes entitats. A partir d'aquesta classificació s'estableixen subgrups que es fusionen progressivament mentre decreix l'homogeneïtat (Sokal i Sneath, 1963) La representació gràfica de la jerarquia indexada es resol en un dendrograma, com el que es presenta en la figura 8.2. Els índexs jeràrquics que defineixen cada subconjunt d'espècies varen ésser calculats mitjançant el mètode de les mitjanes (Sokal i Michener, 1958). Un altre mètode d'interpretació gràfica de distàncies no euclídees és el de les coordenades principals (Gower, 1966). L'anàlisi ens proporciona una representació en (n-1) dimensions d'n poblacions, de manera que la distància entre elles és un reflex de les indicades en la matriu de similaritats

|     | <u>D. melanogaster</u> |                    | <u>D. virilis</u>  |                        | <u>D. immigrans</u> |    | <u>D. hydei</u> |  |
|-----|------------------------|--------------------|--------------------|------------------------|---------------------|----|-----------------|--|
|     | <u>Adh</u>             | <u>D. simulans</u> | <u>D. funebris</u> | <u>D. lebanonensis</u> |                     |    |                 |  |
| Asx | 27                     | 27                 | 26                 | 26                     | 25                  | 29 | 30              |  |
| Thr | 25                     | 25                 | 23                 | 22                     | 23                  | 23 | 19              |  |
| Ser | 11                     | 10                 | 14                 | 11                     | 14                  | 14 | 13              |  |
| Glx | 18                     | 17                 | 19                 | 18                     | 17                  | 17 | 18              |  |
| Pro | 10                     | 10                 | 11                 | 13                     | 12                  | 10 | 11              |  |
| Gly | 19                     | 19                 | 18                 | 19                     | 21                  | 16 | 21              |  |
| Ala | 22                     | 22                 | 22                 | 24                     | 27                  | 22 | 28              |  |
| Cys | 2                      | 2                  | 2                  | 2                      | 2                   | 2  | 2               |  |
| Val | 20                     | 19                 | 19                 | 19                     | 18                  | 20 | 20              |  |
| Met | --                     | --                 | 1                  | 2                      | 1                   | 1  | 1               |  |
| Ile | 23                     | 21                 | 24                 | 25                     | 20                  | 23 | 22              |  |
| Leu | 29                     | 28                 | 24                 | 20                     | 21                  | 24 | 20              |  |
| Tyr | 6                      | 6                  | 5                  | 5                      | 5                   | 3  | 6               |  |
| Phe | 9                      | 9                  | 9                  | 10                     | 10                  | 9  | 10              |  |
| His | 4                      | 4                  | 5                  | 6                      | 6                   | 7  | 4               |  |
| Lys | 18                     | 20                 | 16                 | 18                     | 19                  | 18 | 16              |  |
| Arg | 5                      | 5                  | 8                  | 6                      | 5                   | 8  | 6               |  |
| Trp | 4                      | 4                  | 4                  | 4                      | 4                   | 4  | 4               |  |

TAULA 8.3. Composició d'aminoàcids de l'ADH de totes les espècies estudiades fins el moment.  
(Vilageliu i col. 1982)



TAULA 8.4. Paràmetre de Marchaloni per representar l'homologia entre les molècules d'ADH de les diferents espècies. (Vilageliu i col. 1982).



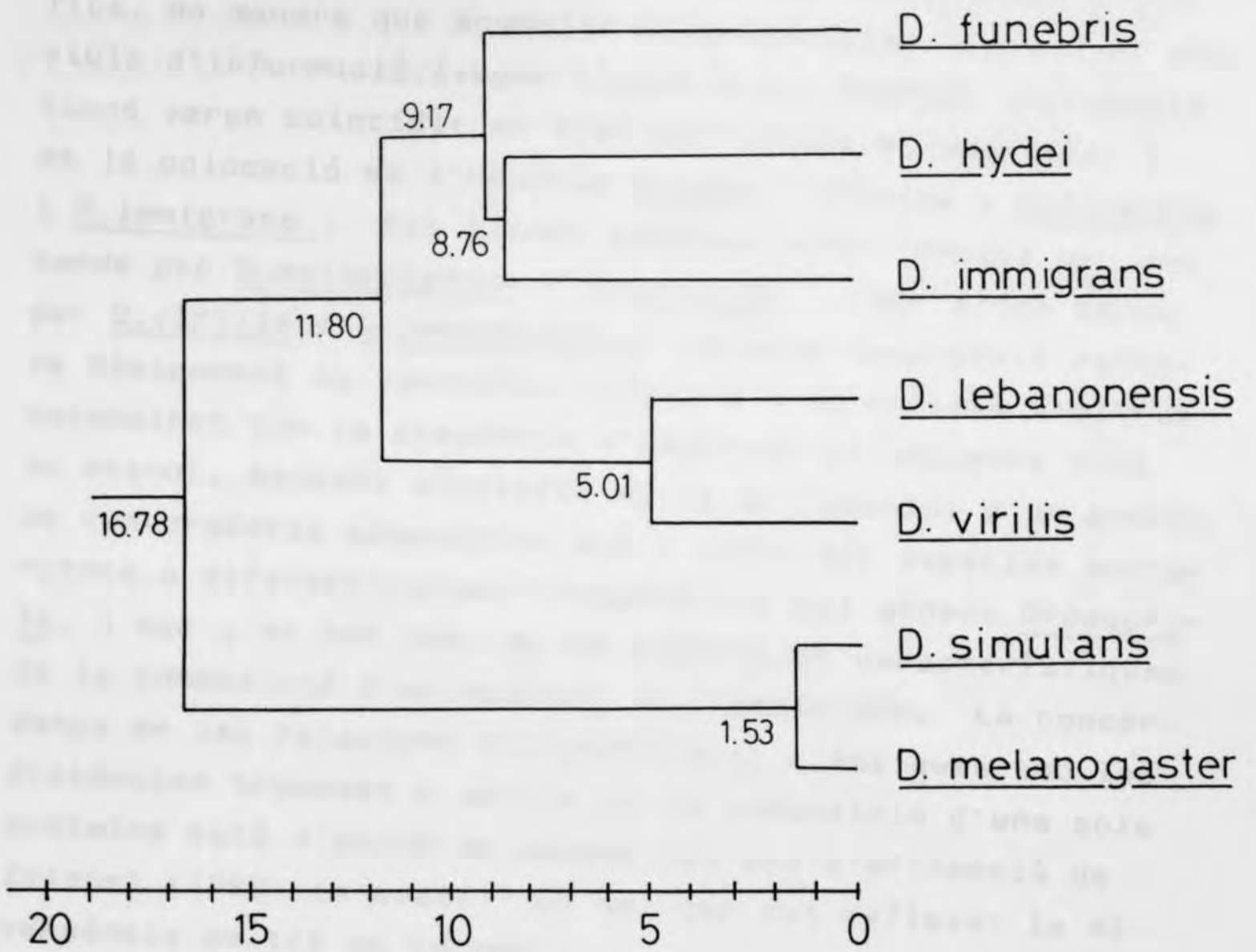


FIGURA 8.2. Dendrograma obtingut a partir del Paràmetre de Marchaloni de similitud entre les composicions d'aminoàcids de les molècules d'ADH.

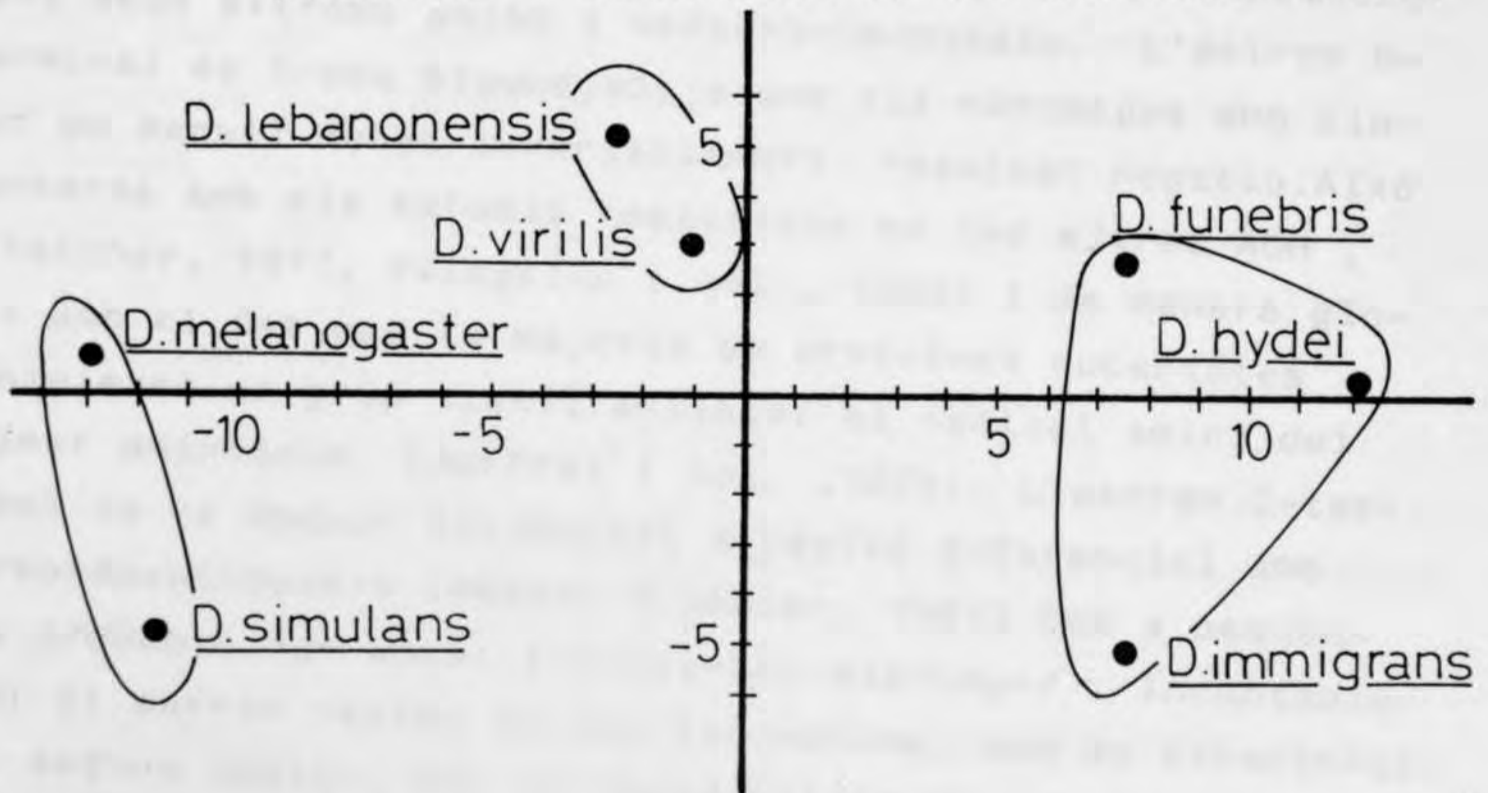


FIGURA 8.3. Representació de l'anàlisi de coordenades principals del mateix conjunt.

per als caràcters que hom estudia. De les (n-1) dimensions s'utilitzen les dues primeres per a la representació gràfica, de manera que acumulen el percentatge més elevat possible d'informació. (vegeu figura 8.3.) Ambdues representacions varen coincidir en tres particions fonamentals, i en la colocació de l'espècie D.hydei pròxima a D.funnebris i D.immigrans. Els altres subgrups eren formats per una banda per D.melanogaster i D.simulans i per altra banda per D.virilis i D.lebanonensis. Aquesta disposició reflexa bàsicament la taxonomia clàssica i no reflexa d'altres paràmetres com la presència d'espècies en ambients rics en etanol. Aquesta propietat seria el resultat d'un procés de convergència adaptativa dut a terme per espècies pertanyents a diferents grups filogenètics del gènere Drosophila, i que, en tot cas, no es basaria en característiques de la composició d'aminoàcids de l'enzim ADH. La concordança de les relacions filogenètiques clàssiques amb les distàncies trobades a partir de la composició d'una sola proteïna està d'acord en aquest cas amb l'afirmació de Zwiebel (1982) en quant " un sol gen pot reflexar la divergència de tot un genoma".

En relació amb l'estructura primària de la proteïna ADH de D.hydei, s'ha determinat també la composició dels seus extrems amino i carboxi-terminal. L'extrem N-terminal es troba bloquejat, ja que els marcatges amb clorur de dansil donen invariablement resultat negatiu. Això concorda amb els estudis realitzats en les altres ADH, (Thatcher, 1977, Vilageliu i col., 1982) i de manera global amb el fet que la majoria de proteïnes eucariotes posseïxen un grup acetil enllaçat al radical amino del primer aminoàcid. (Auffret i col., 1978). L'extrem C-terminal es va deduir mitjançant digestió diferencial amb carboxipeptidasa-A (mètode d'Ambler, 1967) Com a seqüència probable hom dona: Ile-Gly-Ser-Ala-Leu-/. Indubtablement el darrer residu és una isoleucina, que es caracteritza, segons Ambler, per un ràpid alliberament sota l'acció

de la carboxipeptidasa. La segona posició vindria ocupada per una glicina, i la tercera per una serina; els valors d'aquests aminoàcids es mostren solapats en alguns dels temps experimentals, fet que podria ésser causat perquè la serina és una aminoàcid d'alliberament lent per part de la carboxipeptidasa, però la glicina ho és d'alliberament molt més lent, i, per tant, hi pot haver una superposició de valors. Les places quarta i cinquena semblen ocupades per residus d'alanina i leucina, respectivament. També hi ha poca resolució en quant a aquests dos aminoàcids, que són, teòricament d'alliberament fàcil per la carboxipeptidasa, però que deuen restar "atrapats" per la baixa disgregació de la glicina anterior. En tot cas, la seqüència proposada coincideix en els seus tres primers residus amb l'ADH de D.melanogaster ADH<sup>S</sup> (Thatcher 1980) i D.simulans (Juan, 1981)

Per a l'obtenció dels pèptids triptics de la proteïna, aquesta s'ha sotmés primerament a un procés de carboximetilació per tal d'assegurar la seva desnaturalització i potenciar l'activitat de la tripsina. La carboximetilació de l'ADH de D.hydei va posar de manifest els següents punts:

-tal com assenyala Hirs (1967), les proteïnes alquilades esdevenen extramadament insolubles en medi aquós. En el present cas, va ésser necessària una concentració d'àcid acètic al 50%, per tal de mantenir l'ADH-CM en solució, ja que per sota d'aquesta concentració, la precipitació era immediata.

-la carboximetilació confirmà la presència de dos residus de cisteïna en la molècula, ja que varen ésser detectats dos residus de carboxi-metil-cisteïna per monòmer d'ADH

-la carboximetilació va resultar un procés realtívament poc eficaç, fet que va hipotetitzar una posició molt interna dels residus cisteïna en l'estructura terciària de la proteïna. La permanència de cisteïna sense carboxi-

metilar explicaria l'aparició de proteïna resistent a l'acció de la tripsina o del bromur de cianogen.

La digestió tríptica es va dur a terme amb una tripsina de la qual s'havia inhibit prèviament l'activitat quimotríptica amb DPCC. Una bona mostra d'aquesta inhibició és que el nombre de pèptids tríptics obtinguts en diferents proves realitzades, en cap cas va accedir de 25, quan el nombre teòric de pèptids esperats per acció de la tripsina sobre l'ADH de D.hydei seria de 23 (6 Arg + 16 Lys + 1) Es varen realitzar els mapes tríptics d'acord amb el sistema de Laver (1974). Mapes peptídics seguint aquest mateix esquema han estat realitzats amb l'enzim ADH de diferents electromorfs de D.melanogaster (Chambers 1981) i D.immigrans (Vilageliu, 1983). En la figura 6.5. s'ha observat l'esquema tríptic de l'ADH de D.hydei. Una ullada general ens fa adonar que la majoria dels pèptids detectats pertanyen a la zona neutra (dèbil càrrega elèctrica a pH 6.5) o bé mostren migració cap al càtode (pèptids amb càrrega positiva). Només tres pèptids mostren migració cap a l'ànode. Aquest esquema concorda amb l'elevat pI que caracteritza l'enzim ADH de D.hydei (8.99 per a la seva banda més activa), que dóna idea d'un elevat nombre de càrregues positives en la molècula. Alguns dels pèptids de la molècula resultaren ja fàcilment identificables a partir d'aquests mapes peptídics analítics: són pèptids comuns, a més a més a les altres espècies de Drosophila estudiades: el pèptid T-24 de D.hydei, característic per la seva elevada migració cromatogràfica, i el pèptid T-22 de D.hydei, de posició també característica, conegut com el pèptid SLOW i del qual ja es parlarà extensament més endavant. En general, es va comprovar la repetibilitat del "pattern" del mapa tríptic de D.hydei, i es va aconseguir la identificació d'algun pèptid a partir de l'anàlisi d'aminoàcids i estudi de l'N-terminal, però, el que no va ésser possible a partir d'un mapa analític va ésser la caracterització

de la majoria dels pèptids triptics, a causa de gran nombre de contaminacions per contacte colateral que existien, i de la reduïda quantitat amb què és necessari treballar si hom vol aconseguir "taques" netes i perfilades. La determinació de la composició dels pèptids triptics de l'ADH de D.hydei es va emprendre a partir de mapes preparatius, realitzats seguint els mateixos criteris que per elaborar els mapes analítics. La fragmentació dels diferents pèptids a partir del digerit triptic total començà per una columna de filtració en gel de Sephadex G-25-SF (3m x 1cm  $\varnothing$ ) que no va resultar massa efectiva, ja que el "pool" important de pèptids es varen eluir conjuntament, tal com indica l'electroforesi analítica de cada una de les fraccions. Es va procedir a la separació de tres subgrups de pèptids: el subgrup anterior  $T_A$ , la fracció intermitja T, i  $T_U$ , les fraccions finals que coelueixen amb l'urea. Cada un d'aquests subgrups es va sotmetre a electroforesi, i cada una de les subfraccions obtingudes, a cromatografia. L'esquema de la figura 6.12. és un muntatge on es representa el fraccionament obtingut a partir de la cromatografia de cada una de les fraccions electroforètiques (TI a TV) de T. És de destacar la quasi correspondència amb el mapa analític total, fet que confirma que la gran part dels pèptids varen eluir en aquesta subfracció. Es conserva també la posició i identificació dels pèptids amb reacció Pauli +. A partir de la fracció  $T_A$  s'identificaren dos pèptids, un dels quals va resultar Pauli + i no va presentar posterior migració cromatogràfica, i l'altre de migració anòdica, com era d'esperar. De les fraccions que s'eluien conjuntament amb el tris i la urea, se'n va identificar un pèptid, que va ésser separat dels esmentats reactius per electroforesi en paper, ja que els intents de fer-ho per filtració en gel (G-10 o G-25) varen resultar infructuosos. La caracterització dels pèptids separats per aquesta metodologia, per anàlisi d'aminoàcids i N-terminal, va revelar els següents aspectes a tenir en compte:

-En alguns casos, l'existència de dos pèptids en una mateixa fracció es manifesta per la detecció de més d'un residu N-terminal i la manca d'ajustament del nº calculat de residus d'aminoàcids amb valors enters (p.e. T-II-1, T-III-2, T-III-3, en taula).

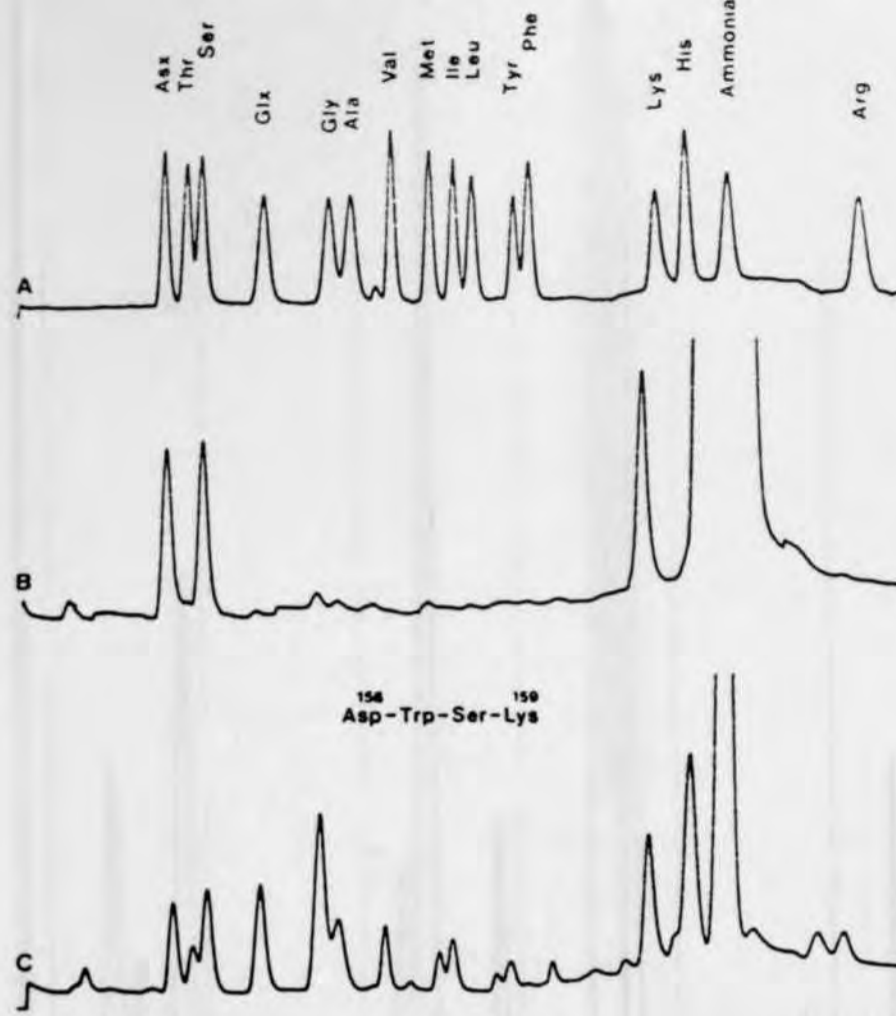
-En d'altres casos, on només s'ha detectat un N-terminal, els valors calculats del nº de residus continuen allunyant-se massa dels valors enters, fet que pot indicar, bé la presència de contaminants, com ara restes del mateix pèptid degradat, o bé la presència de residus d'aminoàcids lliures.

-Finalment, una mostra certa d'impuresa en pèptids tríptics és l'aparició de lisina i arginina en la mateixa mostra (p.e. T-III-3).

Aquests inconvenients, a més a més d'impossibilitar la correcta caracterització del péptid, impedirien la posterior aplicació de qualsevol mètode de seqüenciació -p.e. Degradació d'Edman o Seqüenciació automatitzada- que exigeixen mostres amb extrem grau de puresa. Un altre tipus de contaminació que s'introdueix en els mètodes clàssics d'aïllament de pèptids tríptics és aquella que prové de tots els productes químics que intervenen en els processos d'electroforesi i cromatografia, principalment: la piridina, les impureses del paper Whatman, del qual s'elueixen els pèptids, els solvents d'elució (àcid acètic, amoníac, piridina) o fins i tot els fils amb els quals hom ha de cosir els mapes preparatius. Algunes d'aquestes impureses com és el cas de substàncies de tractament dels fils comercials, absorbeixen a la llum ultraviolada, i interfereixen amb la detecció de pèptids per tinció amb fluorescamina.

Per tal d'obviar tots els inconvenients esmentats, hom va creure oportuna la introducció d'una nova metodologia en l'aïllament i purificació de pèptids tríptics, com és la cromatografia líquida d'alta resolució, anomenada HPLC de manera abreujada.

El desenvolupament recent de les columnes de fase reversa per a HPLC ha permès la gran aplicabilitat d'aquests mètodes a la bioquímica dels pèptids provinents de digestions triptiques. Anderson i Mole (1982) apliquen amb molt d'èxit l'HPLC per a la separació dels pèptids resultants de la digestió de la glucoproteïna plasmàtica coneguda com Component-P, i Oray i col (1982) a la separació dels pèptids triptics de la triosa-fosfat isomerasa. Aquests darrers autors, en un estudi comparatiu dels mètodes clàssics de separació bidimensional sobre paper o capa fina i la cromatografia per HPLC, assenyalen també com a gran avantatge d'aquest darrer mètode la disminució de soroll de fons en els posteriors anàlisis d'aminoàcids dels pèptids. (vegeu figura 8.4.a). La cromatografia per HPLC ha estat també aplicada a l'estudi comparatiu de formes molt properes de proteïnes, p.e. diferents isozims de l'ADH humana, per Strydom i Vallee (1982), mitjançant la comparació del perfil d'elució dels digerits triptics en columnes d'HPLC (vegeu fig.8.4.b) i deducció de quins són els pèptids que inclouen els canvis que diferencien un d'altre isozim. En el present treball, hom va aplicar l'HPLC a cada una de les fraccions que ja havien estat "purificades" per electroforesi/cromatografia, i contenien, teòricament, un o dos pèptids com a màxim. Les condicions d'elució i la columna varen ésser seleccionades d'entre els mètodes aplicats pels autors citats. Els cromatogrames presentats demostren de manera prou eloqüent la quantitat d'impureses que contenia cada una de les fraccions. En analitzar, mitjançant anàlisi d'aminoàcids, cada un dels pics majoritaris de cada una de les fraccions, hom va deduir que només un o dos, com a màxim, dels pics del cada cromatograma representava un pèptid. Així doncs, a més a més d'aconseguir separar totes les impureses químiques que contenia la mostra, hom aconseguia netejar-la d'aminoàcids lliures o restes de degradació del mateix pèptid, que emascaraven greument la composi-



(a) Comparació de l'anàlisi d'aminoàcids d'un pèptid tríptic de la Triosa-P-isomerasa, aïllat per HPLC (B) i per capa fina bidimensional (C). ( Oray i col, 1982).

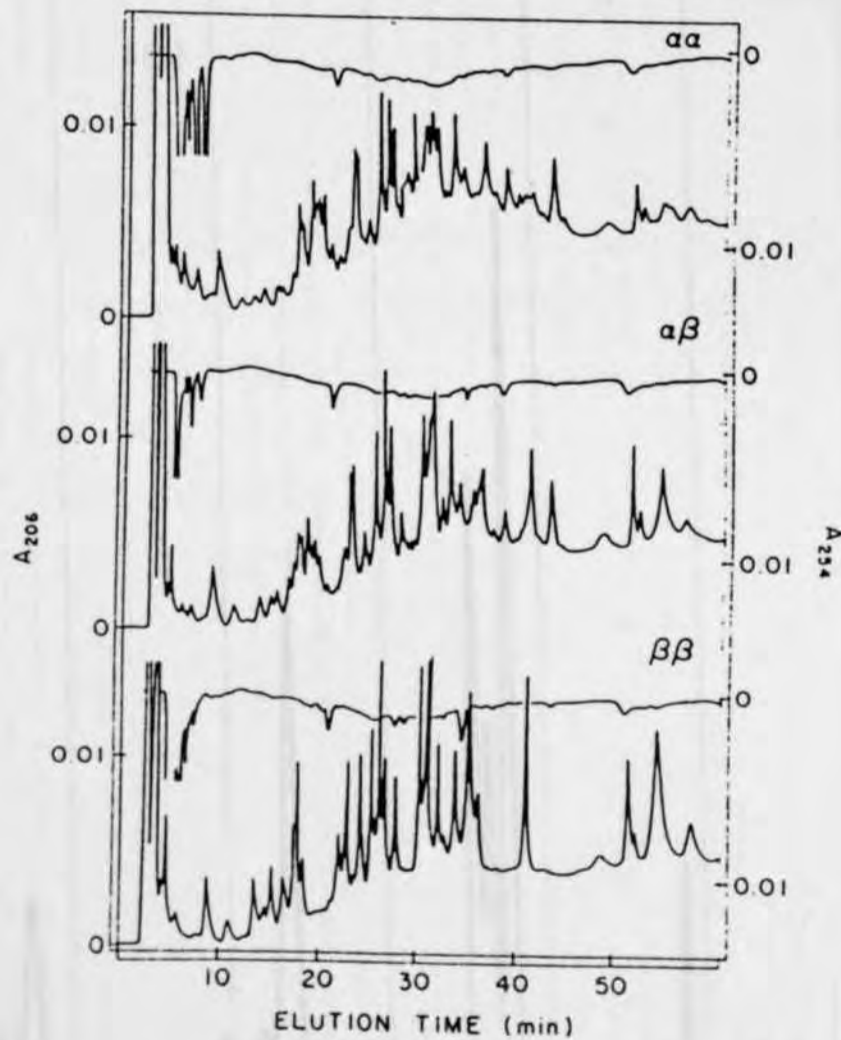


FIGURA 8.4. (b) Mapes tríptics dels isoenzims  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$  i  $\beta\beta$  de l'ADH humana, per elució en HPLC. (Vallee i col, 1982.)





FIGURA 8.5. Anàlisi d'aminoàcids del pèptid T-II-2 abans (A) i després (B) del pas per HPLC.

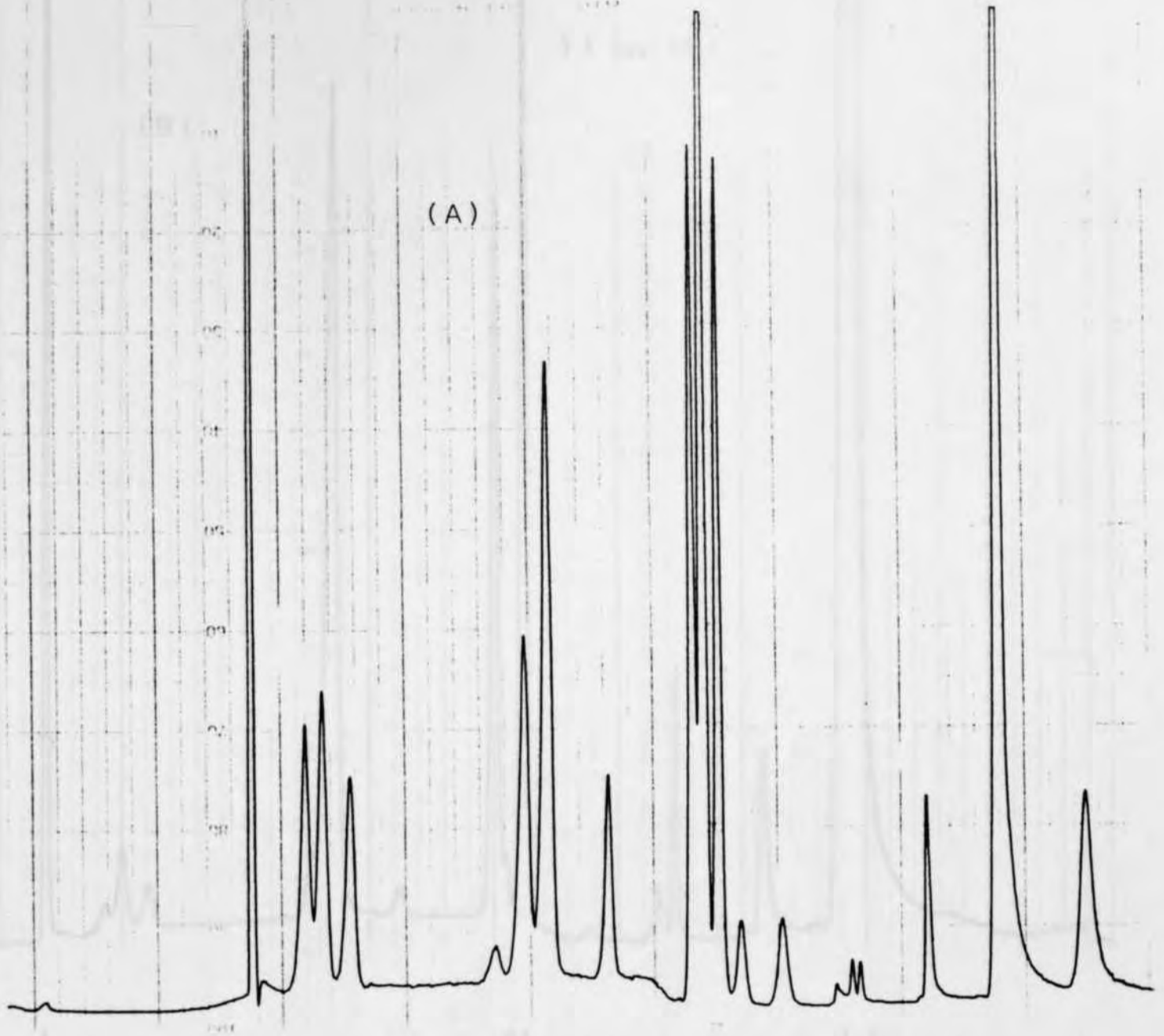


FIGURA 8.6. Anàlisi d'aminoàcids del pèptid T-III-3  
(A) després d'aïllament per electroforesi/cro-  
matografia.  
  
(B) després d'HPLC.  
(C) després d'HPLC.

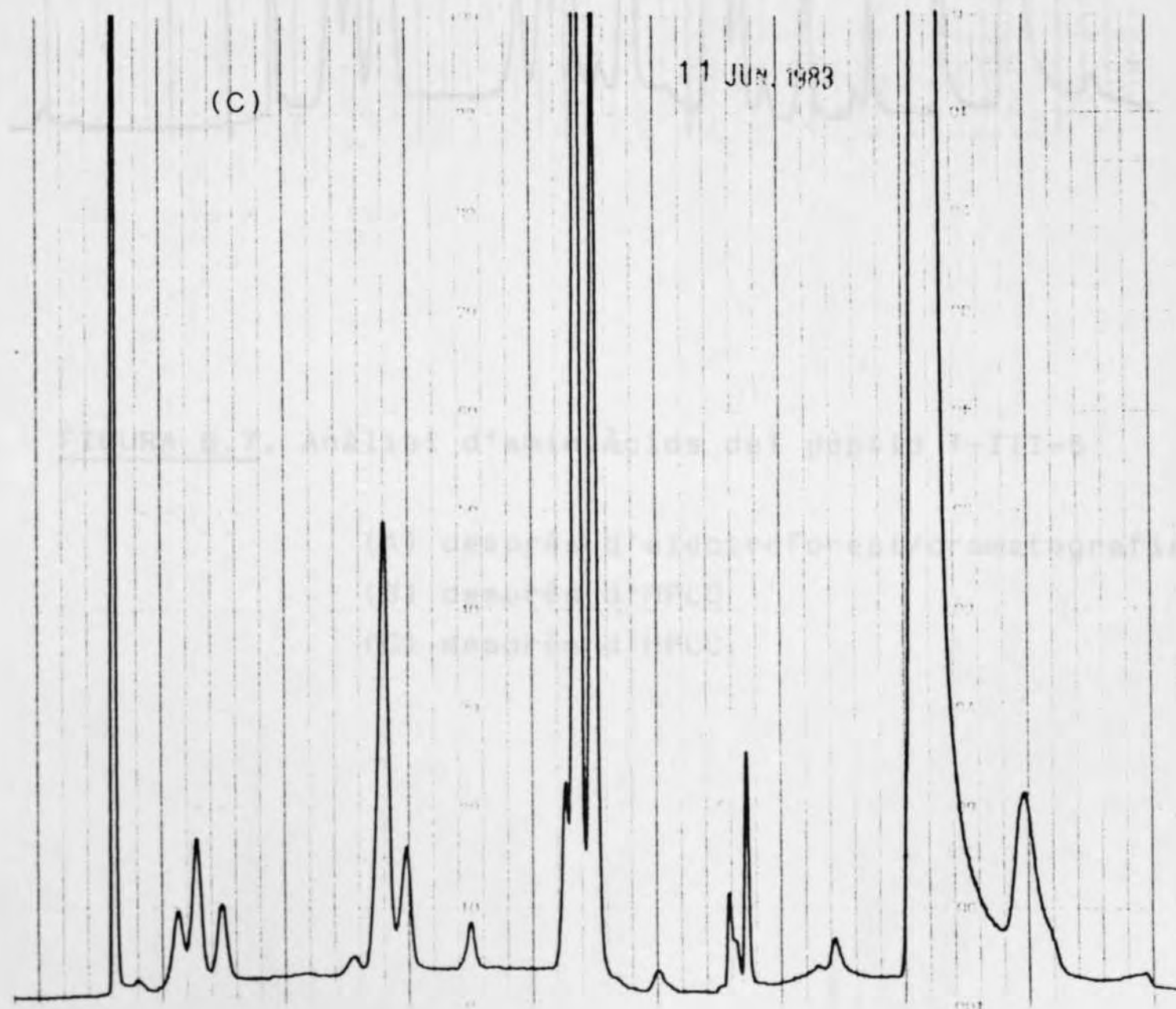
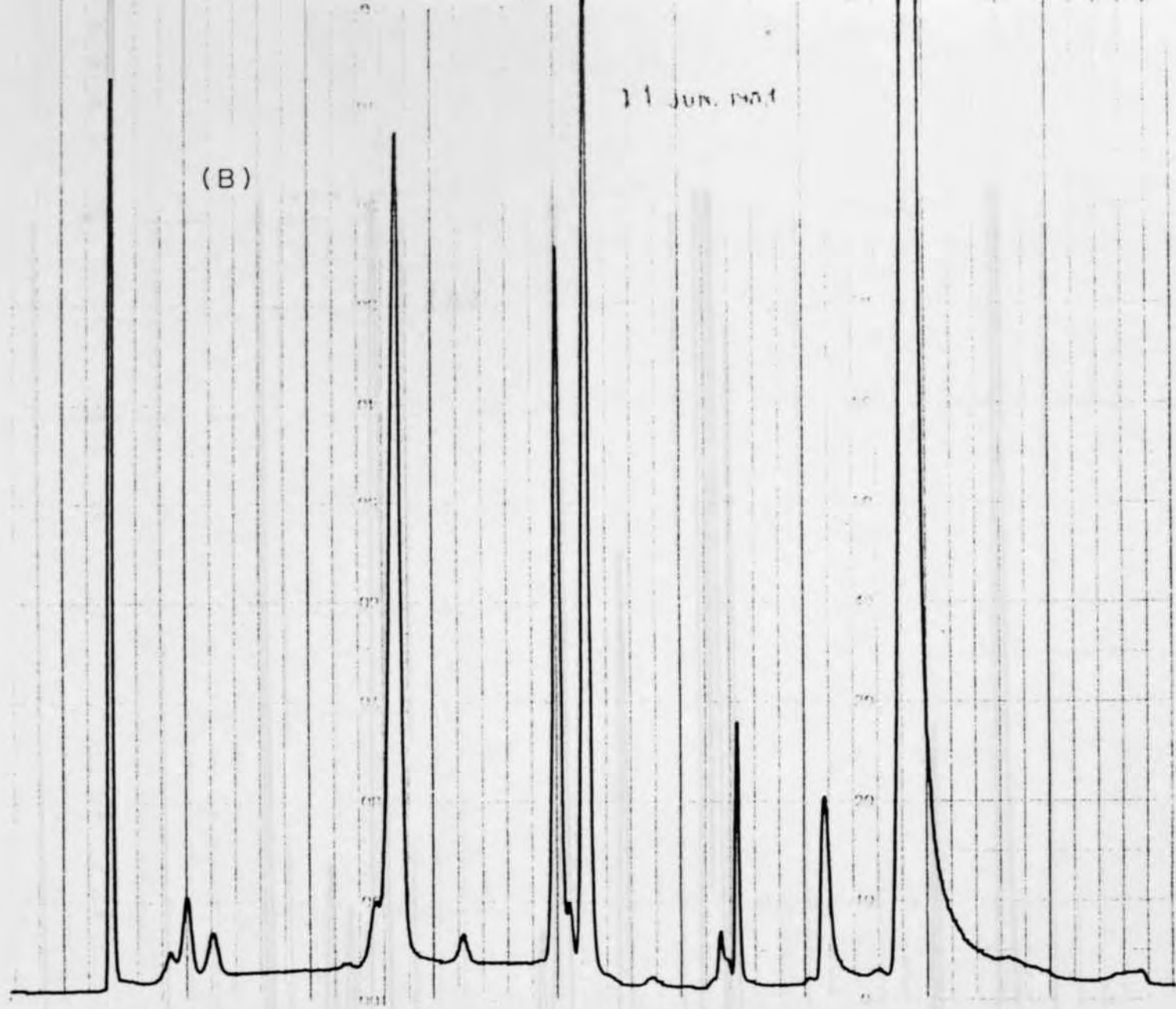


FIGURA 8.6.

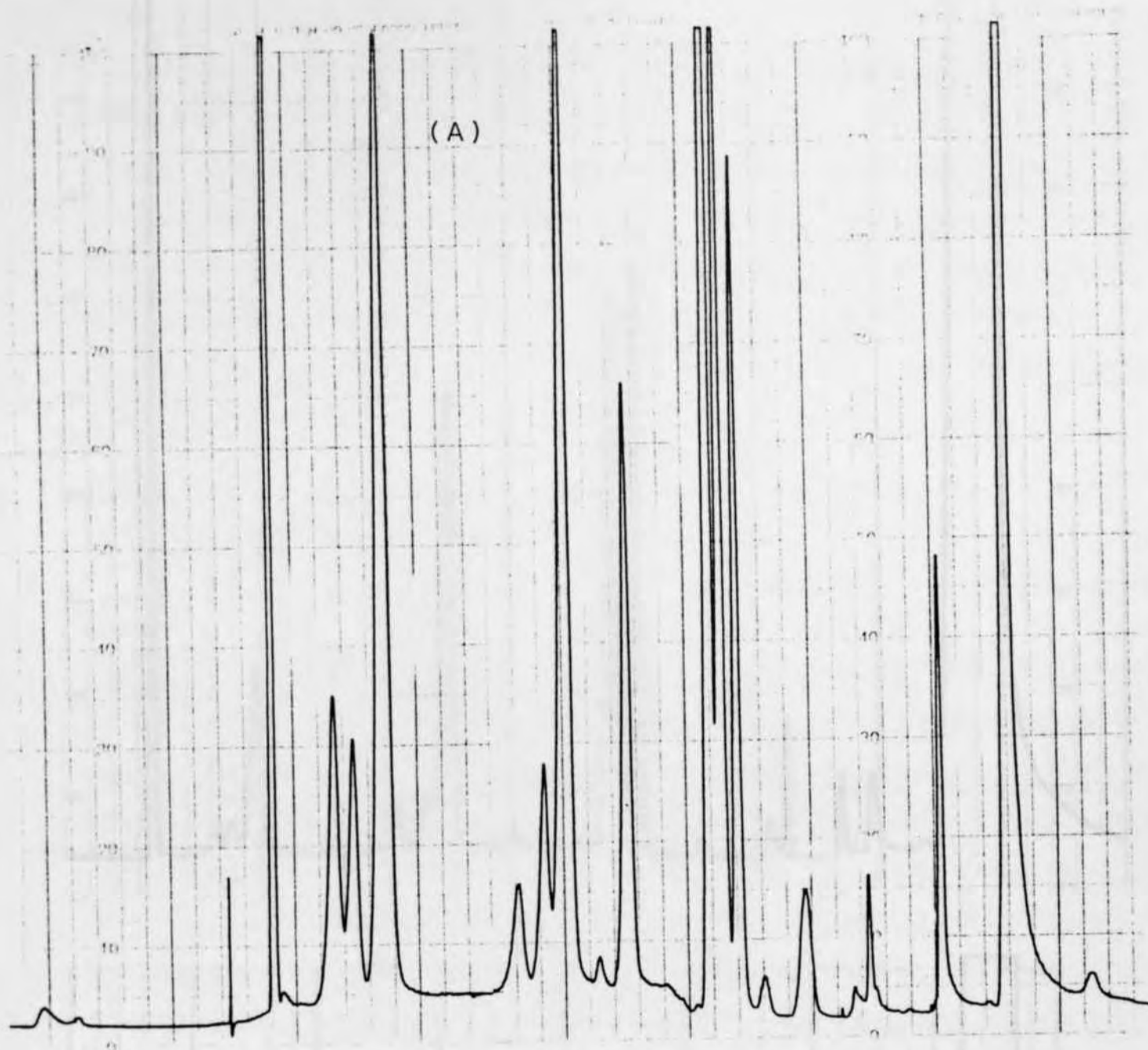
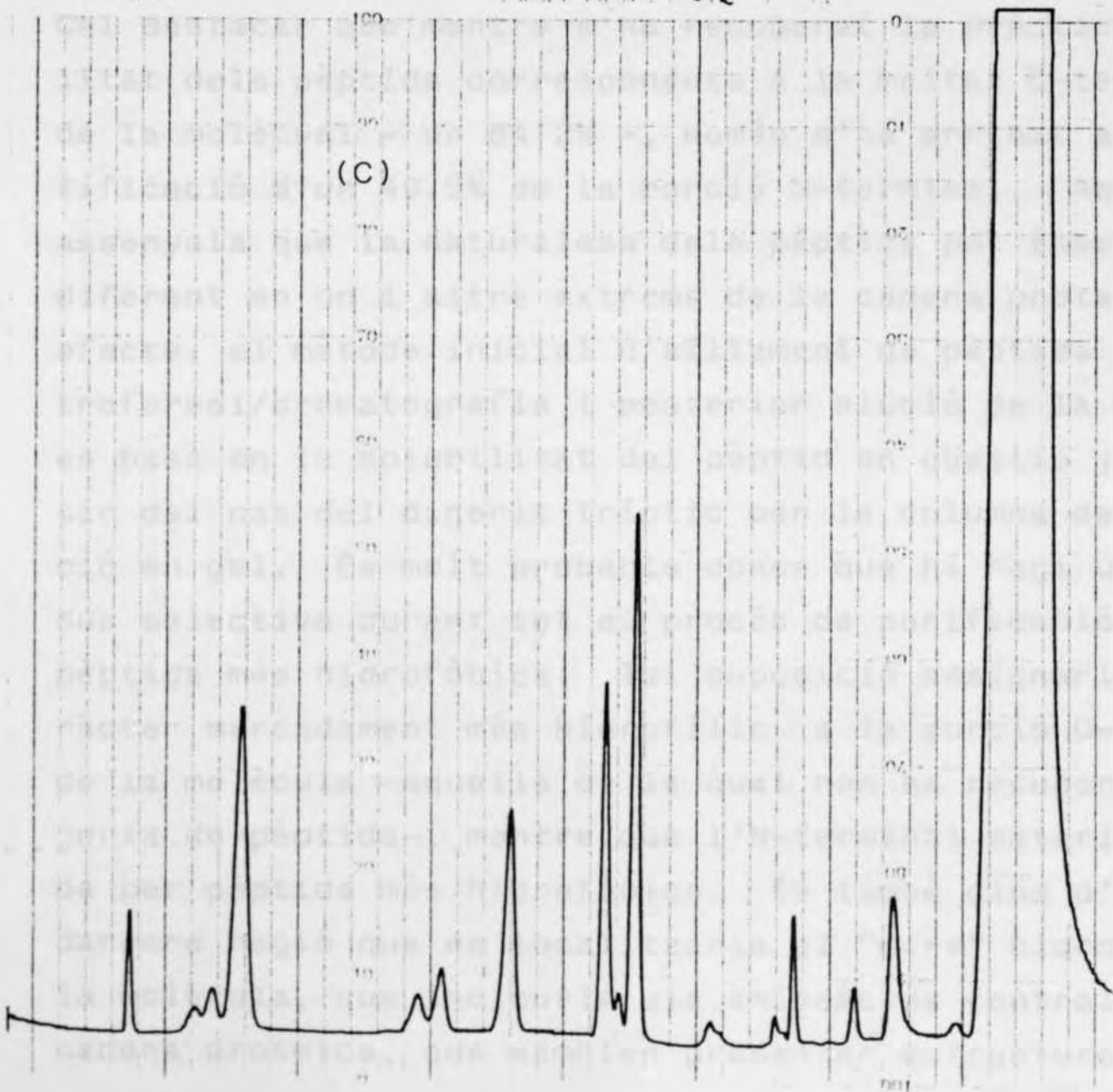
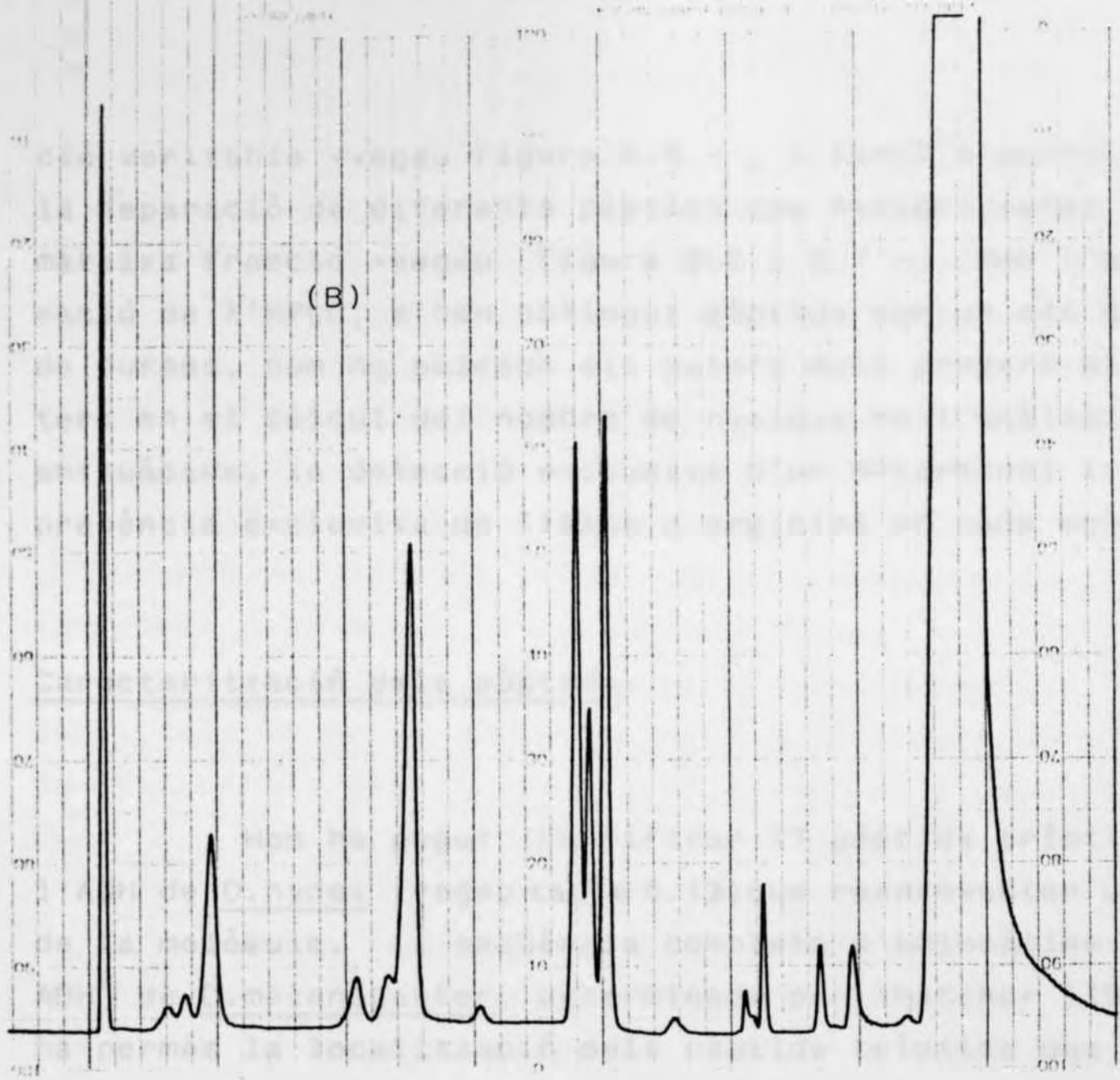


FIGURA 8.7. Anàlisi d'aminoàcids del pèptid T-III-5

- (A) després d'electroforesi/cromatografia
- (B) després d'HPLC
- (C) després d'HPLC.



ció veritable -vegeu figura 8.5.- , i també s'aconseguia la separació de diferents pèptids que havien restat en la mateixa fracció -vegeu figura 8.6 i 8.7 -. Amb l'aplicació de l'HPLC, s'han obtingut pèptids amb un alt grau de puresa, com ho palesen els valors molt propers als enters en el càlcul del nombre de residus en l'anàlisi dels aminoàcids, la detecció exclusiva d'un N-terminal i la presència exclusiva de lisina o arginina en cada mostra.

#### Caracterització dels pèptids.

Hom ha pogut identificar 17 pèptids tríptics de l'ADH de D.hydei (vegeu taula 6.13) que representen un 64% de la molècula. La seqüència completa d'aminoàcids de l'ADH<sup>S</sup> de D.melanogaster, determinada per Thatcher (1980), ha permès la localització dels pèptids tríptics que conserven suficient homologia com per ésser identificats. Cal destacar que mentre s'ha recuperat la pràctica totalitat dels pèptids corresponents a la meitat C-terminal de la molècula - un 84'2% -, només s'ha arribat a la identificació d'un 49.5% de la porció N-terminal. Aquest fet assenyala que la naturalesa dels pèptids pot ésser molt diferent en un i altre extrems de la cadena proteica. En efecte, el mètode inicial d'aïllament de pèptids per electroforesi/cromatografia i posterior elució de la mostra es basa en la solubilitat del pèptid en qüestió ja a partir del pas del digerit tríptic per la columna de filtració en gel. És molt probable doncs que hi hagi una pèrdua selectiva durant tot el procés de purificació dels pèptids més hidrofòbics. Tal suposició assignaria un caràcter marcadament més hidrofílic a la porció C-terminal de la molècula -aquella de la qual hom ha recuperat la majoria de pèptids-, mentre que l'N-terminal estaria formada per pèptids més hidrofòbics. És també dins d'aquesta darrera regió que es localitzaria el "core" hidrofòbic de la molècula, que inclouria els aminoàcids centrals de la cadena proteica, que semblen presentar estructures secun-

dària i terciària impenetrables i que fóra responsable de la baixa eficàcia dels tractaments de carboximetilació i degradació per bromur de cianogen. Segons conclusions de Wingberg (1982,b), a partir d'estudis cinètics de l'enzim, la regió d'enllaç dels alcohols a l'ADH ha d'ésser de caràcter hidrofòbic, per la qual cosa no fóra desencaminat pensar en localitzar punts determinants d'aquesta regió en la meitat N-terminal, mentre que la regió d'unió del coenzim vindria determinada per zones de la meitat C-terminal, o zona hidrofílica. La introducció de les tècniques d'HPLC a partir directament del digerit tríptic de la proteïna ajudaria obviament a evitar aquesta pèrdua selectiva de pèptids de baixa solubilitat.

Només tres dels pèptids caracteritzades (75-77, 169-178, 187-192) representant 19 aminoàcids dels 254 de la molècula no presenten cap variació respecte D.melanogaster. Els pèptids (169-178) i (187-192) comprenen doncs una regió altament conservada, relacionada probablement amb els mecanismes de catàlisi enzimàtica de l'ADH, de manera que un canvi podria alterar greument la funcionalitat de l'enzim. Confirmin aquesta hipòtesi dues observacions complementàries: primerament, en d'altres espècies s'ha localitzat aquests mateixos pèptids també sense cap variació (p.e. D.immigrans, Vilageliu, 1983) En segon lloc, per estudis cinètics, Winberg (1982,a) suposa que l'aminoàcid 192 forma part de la regió d'unió del coenzim. En aquesta posició hi ha la substitució que caracteritza l'al.lelomorfs ADH<sup>S</sup> de l'ADH<sup>F</sup> a D.melanogaster: una lisina en ADH<sup>S</sup> (com a D.hydei) i una treonina a ADH<sup>F</sup>. Per aquesta raó es coneix el pèptid 187-192 com a pèptid "slow" (Fletcher, 1978). S'hipotetitza que el canvi en aquest aminoàcid en una localització tan crucial com fóra la de la zona d'unió del coenzim, explicaria les diferències en les constants cinètiques de les formes "fast" i "slow" de l'ADH de D.melanogaster, començant per la mateixa constant d'afinitat cap al NAD<sup>+</sup> ( $K_m \text{ NAD}^+$ ), Winberg (1982,a) i Anderson (1981).

Hi ha moltes evidències a favor que un residu de lisina en la posició 192 representa la forma ancestral de la molècula ( Kreitman, 1983):

- una major variabilitat de les seqüències no traduïdes del gen Adh entre diferents soques de D.melanogaster , ADH<sup>S</sup> que ADH<sup>F</sup> , sembla indicar que ADH<sup>S</sup> és anterior en l'evolució i, per tant, ha tingut més temps per originar variabilitat en les seves poblacions.
- espècies molt properes a D.melanogaster , com D.simulans i D.mauritiana, presenten una lisina en 192.
- espècies analitzades de grups més llunyans a D.melanogaster, com la mateixa D.hydei o D.immigrans, presenten també una lisina en 192.

Es podria doncs concloure que en el tronc comú d'evolució de Drosophila s'ha conservat la lisina originària de la posició 192, i l'al·lel fast de D. melanogaster no seria més que una divergència, relativament recent , d'aquest tronc. Finalment cal assenyalar que totes les espècies que presenten el pèptid slow, presenten també una afinitat equivalent pel NAD<sup>+</sup> -vegeu taula 8.1.-coincidència que recolza la participació d'aquest pèptid en la zona de metabolització del coenzim.

Benyajati i col.(1980) va localitzar els introns de l'Adh de D. melanogaster entre els codons codificadors dels aminoàcids 32-33 i 167-168. És de suposar que l'esquema general de l'estructura del gen Adh s'ha conservat al llarg de l'evolució del gènere i per tant, també els introns que presenta el gen. S'han detectat mutants "nulls" de l'ADH a D.melanogaster on la causa de la inviabilitat rau en una substitució d'un nucleòtid en les seqüències flanquejants de l'intró 32-33 , (Benyajati i col. 1982), la qual cosa assenyala com és d'important la conservació d'aquestes zones. En tot cas, s'han localitzat a D.hydei els pèptids que corres-



ponen a les regions d'ADN on hi ha els introns: l'aminoàcid 32 és una lisina, i per tant, marca una diana triptica, i el 33 és un àcid aspàrtic, reconegut com a N-terminal del pèptid 33-39, també localitzat. L'aminoàcid 167 és una leucina, i el 168 una alanina, ambdós presents en el pèptid identificat com 157-169.

En quant als canvis observats, caldria fer especial esment d'un tipus de substitució que crea noves dianes per a la tripsina o bé n'elimina, variant doncs substancialment els patró dels pèptids triptics. Parlem del cas Glx --- Lys o viceversa. Aquest fenomen es detecta cinc vegades en els últims 50 residus de l'extrem C-terminal de la molècula: Gln 202, Glu 200, Gln 230 a D.melanogaster passen a lisina a D.hydei i Lys 224, Lys 249 a D.melanogaster passen a Glx a D.hydei. Un grau tan elevat de variabilitat no pot deixar d'indicar que aquesta regió no deu posseir un paper massa crucial en la funcionalitat de l'enzim.

S'ha detectat un trencament de la molècula pel punt equivalent a la serina 139 de D.melanogaster. De fet al pèptid 128-139 no s'hi detecta ni lisina ni arginina, i la serina esmentada deu ésser substituïda per un Asx. Schultz (1967) cita casos d'hidròlisi per un residu d'àcid aspàrtic, en dissolucions tan baixes com HCl 0.03N, i pensem que aquest fenomen s'hauria pogut produir en el present cas, -recordem que el sistema d'elució de l'HPLC està compost per TFA 0.05% ).

Un altre cas d'alteració de pèptid durant el procés d'elució i/o hidròlisi és el de la mostra T-III-1. Aquest és un pèptid que correspon a T-24, i és l'anomenat pèptid pseudo-tríptic, ja que s'origina per trencament entre la tirosina 178 i la treonina 179. És un pèptid present també a les altres espècies estudiades i on es conserva la leucina com a N-terminal i la tirosina com a C-terminal. Aquesta tirosina havia estat detectada en l'anàlisi d'aminoàcids del pèptid durant tot el

procés d'aïllament, però va desaparèixer després de purificat el pèptid per HPLC. L'explicació rau segurament en l'halogenació de la tirosina durant la hidròlisi àcida sota determinades condicions, com documenten Sanger i Thompson (1963).

Llevat del pèptid 179-186, on s'ha detectat el canvi d'una arginina per una lisina, i de les substitucions esmentades de lisines per glutàmics i viceversa, s'ha detectat una bona conservació de les dianes triptiques de la molècula. Els pèptids d'arginina detectats, T-10, T-16, T-20 que es resolten en T-I-1-A, T-II-1 i T-III-3-D, és curiós remarcar que formen part dels pèptids que migren cap al pol positiu, la qual cosa indica la presència d'aminoàcids que neutralitzen els residus d'arginina.

En la caracterització dels pèptids s'ha hipotetitzat quines serien les mínimes substitucions de nucleòtids que explicarien els canvis d'aminoàcids detectats. El nombre de canvis en els pèptids puja a 35, 21.8% de divergència en l'estructura primària de la molècula. L'index de substitucions dóns valors idèntics per a les dues meitats N i C-terminals ( un 22.6% i un 21.49 %, respectivament). Si considerem ara els triplets que codifiquen per als 160 residus localitzats, corresponen a 480nt, dels quals 38, un 7.91%, suposarien mutacions puntuals respecte D.melanogaster. Aquest 7.91% de divergència en la seqüència de nucleòtids estimada dóna només raó de les seqüències codificadores del gen. Si hom té en compte estimacions de divergència de l'ADN de còpia única entre D.melanogaster i D.hydei, calculades a partir de les anàlisis de les temperatures de fusió dels híbrids ADN/ADN interespecífics, s'obtenen valors de 26.10% de divergència per l'ADN de còpia única. La diferència entre ambdós, suposant que realment la divergència entre el producte d'expressió d'un gen representi la divergència del

genoma, pertanyeria a les seqüències no codificadores del gen, en les quals és lògic esperar un grau més alt de substitucions. Si espècies tan properes com D.melanogaster i D.simulans, que fins i tot formen híbrids en la natura (Patterson, 1942) i només mostren una diferència d'1.9% del genoma per punts de fusió d'heterodúplex d'ADN (Zwiebel 1982), mostren com a mínim tres substitucions d'aminoàcids en la molècula d'ADH (Kreitman, 1983), no sembla desorbitada l'estimació obtinguda en el present estudi d'un 21.8% de divergència per a una espècie que resulta tan allunyada de D.melanogaster com D.hydei. Zwiebel, en la seva anàlisi de temperatures de fusió dels heterodúplex inclou un estudi emprant exclusivament l'ADN del plàsmid pSAC, plàsmid que inclou el gen ADH de D.melanogaster, clonat per Goldberg (1980). Per a aquesta regió, D.hydei presenta uns 16.8°C de diferenciació en el punt de fusió dels heterodúplex, mentre D.simulans només una disminució de 0.8°C. Si 0.8°C (corresponent a 0.8% de divergència) dona peu com a mínim a les tres substitucions esmentades, la mateixa relació aplicada a D.hydei suposaria 60 substitucions. En el present estudi s'han hipotetitzat un 21.8% de substitucions (sobre 160 aminoàcids localitzats); si aquest percentatge es conservés sobre els 254 aminoàcids totals, significaria 55 substitucions, valor que concordaria perfectament amb els 60 deduïts per divergència del genoma.

Com a conclusió general, hom podria considerar que, al llarg del temps d'evolució que deuria transcórrer entre l'especiació de D.melanogaster i D.hydei varen tenir lloc canvis bastant nombrosos en el monòmer de l'ADH -al voltant del 20%- però canvis d'una natura tal que van deixar inalterada la seva constitució bàsica, i per tant donen un enzim totalment homologable al de D.melanogaster i que conserva les seves funcions bàsiques de catàlisi enzimàtica. És lògic pensar que la selecció natural hauria eliminat en el transcurs d'aquesta diferenciació totes aquelles innovacions que afectessin a punts estratègics d'unió del substrat o del coenzim, i per tant, se'ns ofereix una variabilitat "filtrada" per la operativitat funcional al llarg de segles d'existència.