



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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (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) service and by the UB Digital Repository (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.

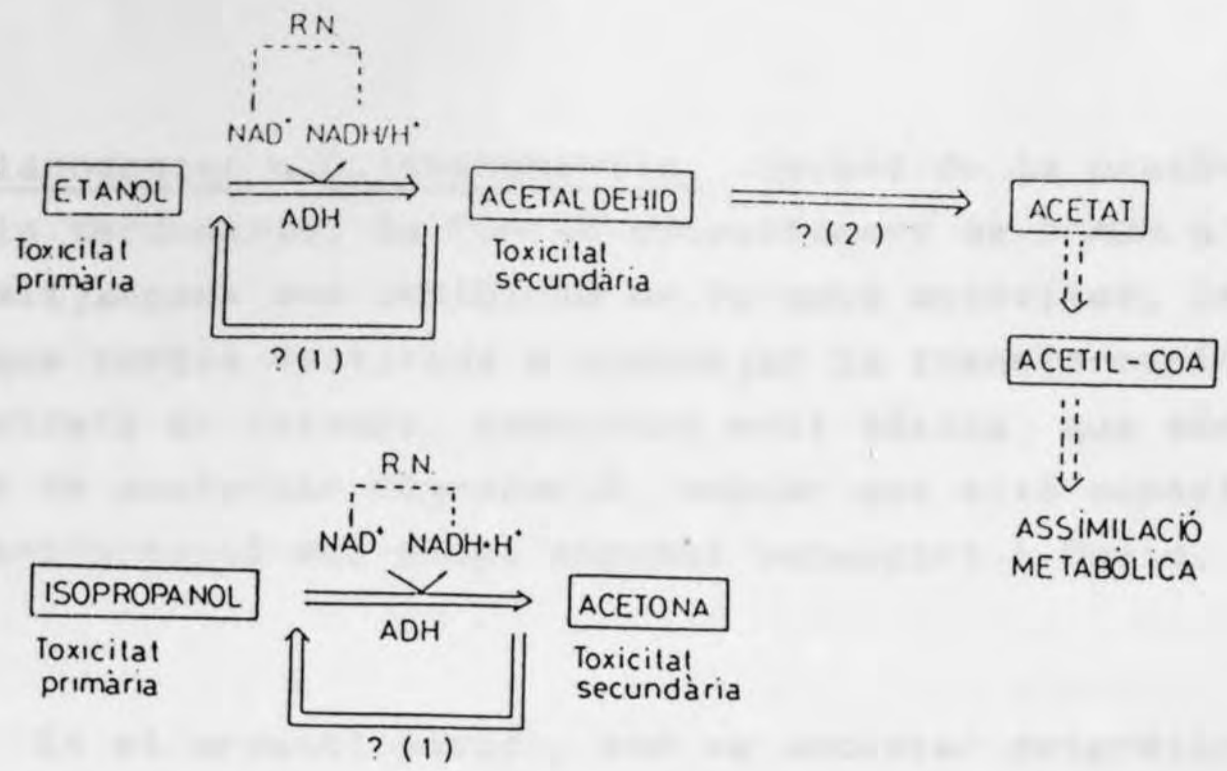
Barcelona, Març 1984.



8.4. METABOLISME DELS ALCOHOLS A DROSOPHILA.

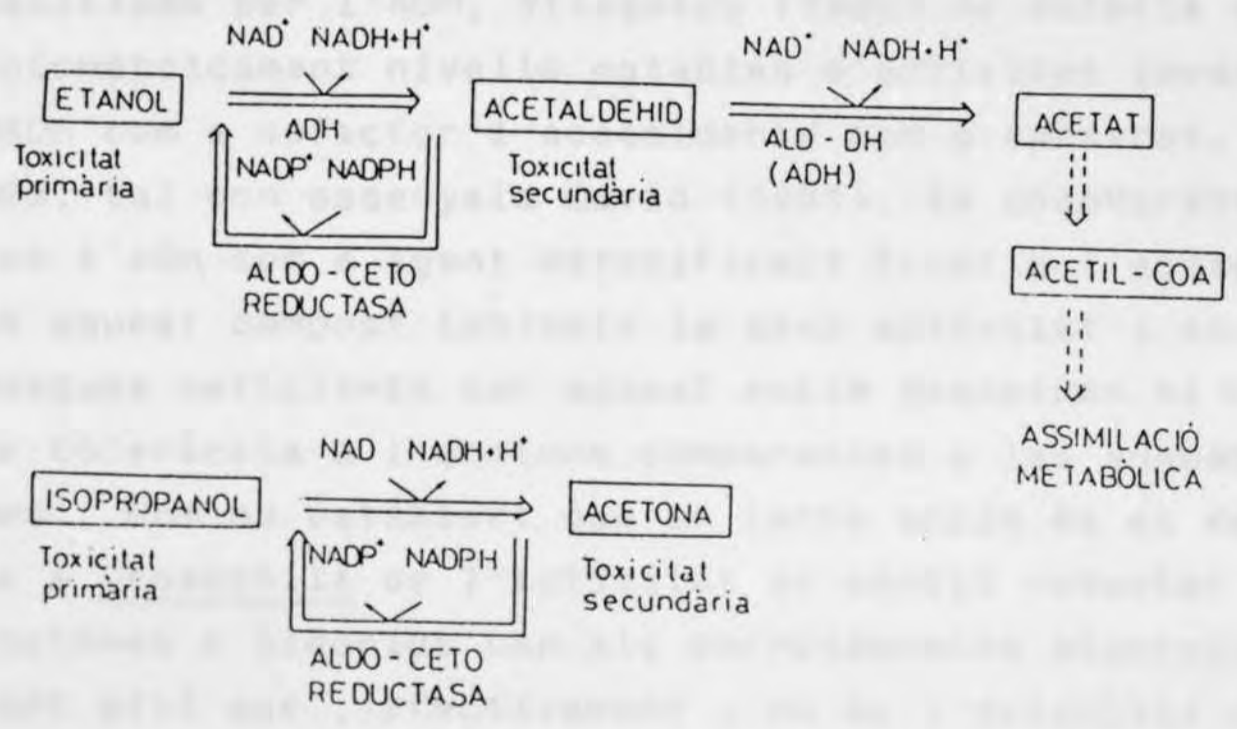
L'efecte de la ingesta d'alcohols (o dels seus productes d'oxidació) a Drosophila varia dràsticament segons les dosis emprades i la natura del producte en qüestió. Mentre a dosis baixes, l'etanol (1-2%) i l'acetaldehid (0.5-1%) són capaços d'allargar la mitjana de vida en absència de qualsevol altra nodrient, a dosis elevades, pròximes a LC/50, deixen sentir els seus efectes tòxics, causant la mort a l'individu (V. Herrewége i David, 1974; David i Fouillet, 1976). L'isopropanol i l'acetona (0.5-1%) retarden notablement el cicle vital de l'organisme, i, a dosis més elevades, causen ràpidament la mort. (David, 1976; Vilageliu, 1980). El paper de l'enzim ADH suposaria doncs efectes molt diferents en ambdós casos. mentre davant dosis limitades d'etanol -o acetaldehid- operaria subministrant compostos energètics hàbils per entrar en el cicle de Krebs, via acetat (Deltombe i Lietaert, 1979), davant dosis elevades d'etanol o davant d'alcohols secundaris, la seva funció passaria a ésser fonamentalment detoxificant, permetent la supervivència de l'individu per eliminació d'aquests productes tòxics. VanHerrewége i David (1980, 1981) insisteixen repetidament en la independència dels processos d'utilització energètica dels alcohols i la detoxificació, malgrat actui o pugui actuar en tots dos el mateix enzim ADH. La via de detoxificació tindria a la vegada comportaments diferents segons el compost que l'està provocant: en front a elevades quantitats d'etanol, la solució rau simplement en una potencialitat incrementada de metabolitzar aquest compost, en d'altres paraules, en una elevada activitat ADH. La dosi LC/50 és simplement un reflex d'aquesta potencialitat. Els indicis més recents semblen assenyalar que al llarg de l'evolució, les espècies amb major poder detoxificant front a l'etanol - les espècies amb major quantitat d'enzim ADH- haurien adquirit la possibilitat de colonització de nous hàbitats especialment rics en etanol, de manera que, secundàriament, l'ADH hauria tornat a adquirir així un paper d'enzim "energètic" per a espècies





R.N. Vies de regeneració NAD^+ =
 α -glicero - fosfat
malat - aspartat

METABOLISME ALCOHOLS A DROSOPHILA



METABOLISME ALCOHOLS A DROSOPHILA

FIGURA 8.8. Principals incògnites i solucions més versemblants en les vies de metabolització d'alcohols a Drosophila.

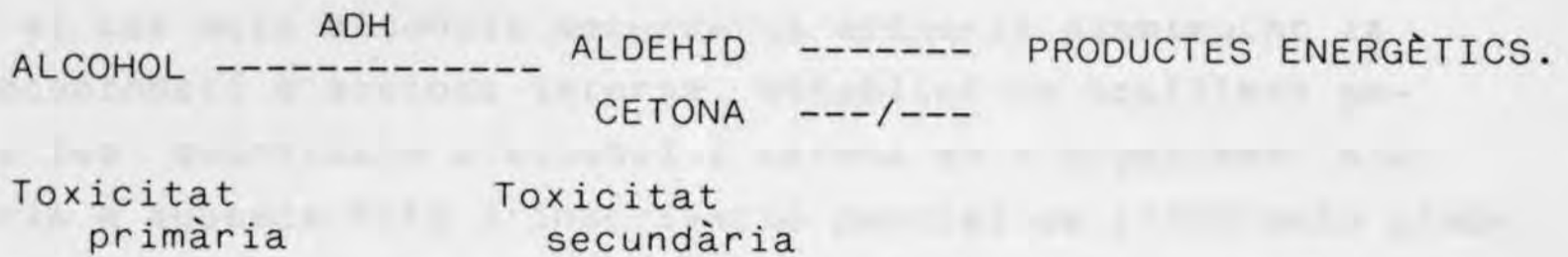
com D.melanogaster o D.lebanonensis. Davant de la presència d'alcohols secundaris, la funció detoxificant de l'ADH s'exerceix mitjançant una inhibició de la seva activitat, inhibició que sembla destinada a bloquejar la transformació dels substrats en cetones, compostos molt tòxics que són incapaces de posterior degradació, encara que això suposi la no transformació del propi alcohol secundari (David, 1981).

En el present estudi, hom va intentar determinar com responien els individus adults de l'espècie D.hydei, sotmesos a tractaments amb dosis no letals d'etanol (1%) i d'isopropanol (0.5%). Un dels punts més obscurs en els actuals estudis de detoxificació de alcohols a Drosophila és la metabolització dels productes de reacció de l'ADH: l'acetaldehid i l'acetona. No es coneix, o millor dit, hi ha grans discussions al respecte de quin és l'enzim que actua sobre l'acetaldehid per tal d'incorporar-lo al metabolisme cel·lular, i quin és l'enzim responsable de la tolerància a dosis baixes d'acetona. (Lietaert, 1982; David 1981, 1982). Malgrat la reversibilitat teòrica de la reacció catalitzada per l'ADH, Vilageliu (1980) no detectà espectrofotomètricament nivells notables d'activitat inversa usant NADH com a cofactor i acetaldehid com a substrat. A més a més, tal com assenyala David (1981), és incoherent pensar en l'ADH com a agent detoxificant front a l'acetona, quan aquest compost inhibeix la seva activitat i endemés mosques deficientes per aquest enzim posseïen nivells de tolerància a l'acetona comparables a les soques salvatges. Hom ha establert que un altre enzim és el responsable a Drosophila de l'activitat en sentit reductor envers cetones i aldehids cap als corresponents alcohols, confirmant així que, efectivament, no és l'activitat ADH inversa la que duu a terme aquestes transformacions. Aquest nou enzim és una aldo-ceto-reductasa, depenent de NADPH, que ha estat assejada electroforèticament amb diversos substrats: acetaldehid, acetona i p-nitro-benzaldehid, tant a D.melanogaster com a D.hydei. Els enzims amb funcions reductàsiques són àmpliament coneguts a mamífers, i es coneix-

xen sota la denominació d'aldo-ceto-reductases des de la classificació de Bachur (1976). Segons aquest autor, les aldehyd reductases i les ceto-reductases són oxido-reductases monomèriques, NADPH-depenents, que catalitzen la reducció dels grups carbonil d'un ampli espectre de substàncies als corresponents hidroxils, i la funció fisiològica de les quals presenta encara nombroses incògnites. La denominació d'aldehyd-reductasa o ceto-reductasa resta en funció del seu substrat preferencial, encara que no exclusiu. Actualment els enzims més estudiats d'aquest grup es poden considerar les aldehyd-reductases de cervell i de ronyó (Flynn, 1975, Turner i Tipton, 1972) la carbonil-reductasa (Wermuth, 1981) i les ceto-reductases de fetge (Sawada, 1980). L'aldo-ceto reductasa detectada a Drosophila presenta uns òptims d'actuació equivalents als de les reductases de mamífers, que a la vegada es troben molt allunyats dels de l'ADH, a saber: un pH òptim molt proper a la neutralitat -pH 7.0- i presumiblement proper també als pH fisiològics intracel·lulars; un nivell de saturació pel coenzim de rang micromolar ($\sim 10 \mu\text{M}$) front al nivell milimolar (1.8mM) de saturació de l'ADH pel seu cofactor. D'altres criteris confirmen la independència de l'aldo-ceto-reductasa respecte el sistema enzimàtic de l'ADH a Drosophila: primerament, l'activitat reductàsica no es veu en absolut afectada pel pirazol, potent inhibidor de l'ADH, i, en segon lloc, l'aldo-ceto-reductasa presenta nivells equivalents d'activitat enzimàtica tant en soques homozigòtiques Adh^S , com en soques deficientes per a aquest enzim - Adh^{n1} i Adh^{n4} - o semideficients -A-47- i encara en soques deficientes pel sistema aldehyd oxidasa-xantin-deshidrogenasa-piridoxal-oxidasa.

Fent un breu parèntesi, convé remarcar que, evidentment, les soques Adh^{n1} i Adh^{n4} no presenten nivells remarcables d'activitat alcohol-deshidrogenàsica, mentre que la soca A-47, en la qual només s'hi troba una de les dues còpies del gen, presenta nivells d'activitat d'aproximadament la meitat del valor salvatge en l'homozigot Adh^S , fet que fa pensar en la no existència de compensació de dosi per a aquest locus autosòmic.

El principal paper de les aldo-ceto reductases de Drosophila tindria doncs, segons els resultats obtinguts, un caràcter eminentment detoxificant. David (1976) assenyalava que la cadena d'incorporació dels alcohols a Drosophila seguiria un esquema:



Tant l'alcohol, per se, com els aldehyds i les cetones, són compostos tòxics que, en acumular-se en la cèl.lula causen importants transtorns metabòlics i estructurals, que duen a la degeneració i mort de l'organisme. La toxicitat primària dels alcohols es veu ràpidament contrarestada per l'acció prou coneguda de l'ADH, la qual impedeix la seva acumulació intracel.lular. Els aldehyds i cetones són tòxiques a concentracions molt més baixes per l'organisme, constituint un focus de toxicitat secundària si no són, a la vegada, metabolitzats. L'acció detoxificant de l'ADH no té cap sentit, o encara es torna en perjudicial, si els productes de la "seva" reacció no troben una via de sortida al menys tan ràpida com la de la seva formació. És ben conegut que, en els mamífers, l'enzim aldehyd-deshidrogenasa transforma l'aldehyd en acetat a una velocitat tal que no s'arriben a acumular nivells apreciables d'aquest compost, font d'espectaculars i coneguts símptomes. La via de metabolització de l'acetaldehyd a Drosophila ha estat, i és, punt de gran controvèrsia -vegeu la introducció- encara que finalment s'ha arribat a detectar una aldehyd-deshidrogenasa també en aquest organisme (Garcin, 1983). La toxicitat de les cetones prové bàsicament del fet de no tenir cap via de sortida: d'aquí la menor tolerància de Drosophila front als alcohols secundaris que primaris. Malgrat tot, tal com assenyalava David (1976), quan un producte tòxic s'incorpora a l'organisme, el seu efecte és el resultat de moltes interaccions, tals com la toxicitat directa del producte inicial, la toxicitat del producte transformat, la taxa de transfor-

mació enzimàtica i les vies de metabolisme subsegüents dels productes de la reacció. En atribuir a les aldo-ceto-reductases un paper eminentment detoxificant, hom no proposa res més que un mecanisme que equilibraria les toxicitats primàries i secundàries en els processos d'ingesta d'alcohols : en el cas dels alcohols secundaris actuaria disminuint la concentració d'acetona interna, establint un equilibri entre les quantitats d'alcohol i cetona en l'organisme. Ajudaria a aquesta fita l'inactivació parcial de l'ADH pels grups carbonil. En el cas dels alcohols primaris, les reductases podrien suposar un mecanisme de seguretat per evitar l'acumulació d'aldehids si l'ADH presenta una tasa de catàlisi tan que proporcionés aquests compostos a velocitats més elevades de les que podrien ésser metabolitzats. Coneguda com és la major toxicitat dels grups cetona i aldehid respecte els alcohols, és lògic pensar que si hi ha impossibilitat d'eliminació total del producte, aquest s'acumuli sota la forma menys tòxica, o sigui, com a alcohol. Un paper detoxificant de les aldo-ceto-reductases, concordaria perfectament amb la funció detoxificant atribuïda per Bachur (1976) a aquest tipus d'enzims en els mamífers : "enzims inactivadors de compostos xenobiòtics portadors de grups aldehid o cetona", i també amb d'altres funcions que es van determinant recentment , com l'autodefensa dels tèrmits contra el seu propi verí (Prestwich, 1983), que és un compost amb nombrosos grups aldo-cetònics. Leibman (1971) descriu en el fetge de conill, un aldo-ceto-reductasa metabolitzadora, concretament, d'acetona, NADPH-depenent. Hom troba en la bibliografia la descripció per Faulkner (1958), d'una poliol-deshidrogenasa-NADPH-depenent, que contribueix a la resistència al fred en els insectes, en reduir aldehids i cetones a alcohols, que en acumular-se en la sang, tenen un efecte d'anticongelant. Aquest enzim podria perfectament emmarcar-se dins de les aldo-ceto-reductases de Drosophila.

Els tractaments amb etanol i isopropanol que s'han realitzat en aquest treball, permeten intentar donar una in-

terpretació global de les vies de detoxificació i/o utilització metabòlica que segueix l'organisme en aquests casos. Un punt clau en les determinacions d'aquests estudis ha estat la disponibilitat de realitzar mesures de contingut d'alcohols i llurs metabolits en el medi intern de Drosophila. Evidentment, cal postular que si hi ha algun control sobre els enzims responsables del metabolisme d'aquests productes respongui a les variacions en les seves concentracions internes, inter o intra-cel·lulars, abans que a les del medi extern on es troba la mosca. Aquestes determinacions havien resultat impracticables si s'hagués hagut d'extreure a partir de l'homogenat inicial de Drosophila una fracció apta per a la injecció en un cromatògraf de gasos clàssic. Deixant a part la complexitat de l'operació, fóra molt difícil d'impedir la pèrdua durant la manipulació de la mostra i per simple evaporació dels baixos nivells de metabolits que s'arriben a detectar. La disponibilitat d'un cromatògraf de gasos per "head space", on es pot considerar que l'extracció de la mostra és realitzada pel propi aparell -vegeu material i mètodes-, ha permès doncs realitzar aquestes mesures, amb els valors de les quals caldrà correlacionar les variacions de nivells d'activitat enzimàtica. Les concentracions de metabolits en el medi no serà la causa, sinò la conseqüència d'aquesta activitat.

Una anàlisi de les condicions de control (individus sotmesos a dieta exclusiva de sacarosa durant el temps de duració de les proves) demostra que les activitats ADH i ACR sofreixen ja una regulació, atribuïble bé al tipus de nodriment, bé a l'adaptació a les condicions d'anaerobiosi progressiva que s'estableixen en l'interior del vial d'experimentació. Aquesta regulació, equivalent per als dos enzims, suposa una primera disminució de l'activitat enzimàtica, seguida per un increment progressiu que ateny el seu màxim abans per l'ADH (48h) que per l'ACR (72h) i una posterior davallada (96h) i estabilització fins al final del tractament. Els individus sotmesos a dieta de sacarosa no presenten en cap cas nivells basals d'etanol,

acetaldehid, isopropanol ni acetona, en el límit de detecció de l'equip cromatogràfic emprat (nivell nanomolar). La conversió espontània dels alcohols durant els temps equivalents als de tractament varen atenyer com a màxim un 0.10% d'autooxidació de l'etanol a 192h, i un 1.76% per l'isopropanol en el mateix temps. La pèrdua per evaporació en els tractaments respecte el màxim teòric no pren tampoc valors significatius que puguin interferir amb les conversions realitzades pels organismes.

El tractament amb etanol (1%) provoca un increment d'activitat ADH i ACR, que mostren un màxim a les 48h de tractament, seguint, però, un perfil equivalent al dels controls. L'increment d'activitat ADH es tradueix en una ràpida i completa metabolització de l'etanol present en el medi, que és indetectable a partir de les 72h. Ja que l'acetaldehid és un intermediari metabòlic que no s'acumula, és totalment indetectable també en el medi extern. Gibson (1970) va descriure ja un increment d'activitat ADH quan larves de D.melanogaster eren sotmeses a dosis d'etanol. Sembla que cal considerar el primer període de tractament com d'adaptació a les noves condicions a les que els individus es veuen sotmesos, període durant el qual l'activitat ADH i ACR disminueixen, l'etanol no es metabolitza ostensiblement i hi ha algun cert indicatiu d'acetaldehid extern, possiblement mercès al poc etanol que és degradat. Paral·lelament, durant aquest període d'adaptació, l'etanol intern sofreix un increment que cal atribuir a la incorporació a l'organisme sense subsegüent metabolització. Entre les 8h i 72h, l'etanol extern és, doncs, consumit en la seva totalitat. L'activitat ADH presenta un màxim a les 48h, que suposaria el punt àlgid en el procés de metabolització de l'etanol. L'activitat ACR, que s'aplicaria sobre l'acetaldehid constantment produït per l'ADH, dóna també un màxim en aquest temps. Durant aquest període, els nivells interns d'etanol es mantenen constants, possiblement a causa d'un compromís incorporació/degradació. Quan no resta etanol extern, i per tant cesa la incorporació, paradoxal-

ment, es detecta un lleuger increment en l'etanol intern, que es manté fins a les 192h, a la vegada que la presència d'acetaldehid. Aquest fenomen podria rebre diverses interpretacions: Hom podria assumir que com que l'activitat ADH es troba deprimida, no pot metabolitzar l'alcohol que s'acaba d'incorporar a l'organisme; però aquesta solució és poc satisfactòria, ja que, casualment, pujarien els nivells d'etanol intern quan aquest ja no és present en el medi extern, fet que, al contrari, tendiria a facilitar per difusió l'eliminació de l'etanol de l'organisme. Tot fa pensar doncs, en el concurs de l'ACR en aquest fenomen, enzim que estaria subministrant un etanol a partir d'acetaldehid que la deprimida activitat ADH no podria metabolitzar.

En el tractament amb isopropanol, els paràmetres canvien totalment, en tractar-se d'un alcohol secundari, el producte d'oxidació del qual no és incorporable al metabolisme intermediari, i és només susceptible d'eliminació per excreció o respiració. El descens en la concentració externa d'isopropanol i l'aparició progressiva d'acetona en el medi confirmen l'acció de l'enzim ADH sobre l'alcohol i la lliberació del producte de la reacció -l'acetona-, al medi extern. Aquesta acetona va inhibint el mateix enzim en un efecte àmpliament descrit en d'altres espècies de Drosophila, com D.melanosgaster (Schwartz i Sofer, 1976) o D.immigrans (Vilageliu, 1980), però no del tot unànimement interpretat. L'acetona subministrada directament en la dieta causa la mateixa desactivació (Papell, 1979). Quan l'activitat ADH es troba a nivells basals, l'acetona externa quasi no sofreix increment, i de fet, hom pot considerar el nivell d'acetona externa com a imatge especular de l'activitat ADH. El fet que als nivells d'acetona externa corresponguin exactament a l'isopropanol desaparegut, indueixen a pensar que no hi ha efectivament via de sortida al tandem isopropanol/acetona. Els nivells d'activitat ACR sofreixen un brusc increment durant el tractament, amb màxims d'activitat entre les 72h i les 96h. Aquests són també els punts de màxima acetona, tant externa com interna, acetona que seria el substrat de l'activitat ACR. La seva

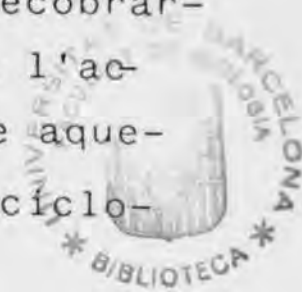
acció preservaria el medi intern de concentracions massa elevades d'aquest compost, encara que això fos a expenses de la producció d'isopropanol. De fet, els grups hidroxil són de reactivitat molt més baixa en la cèl.lula que els carbonil, i per tant, molt menys tòxics. L'anàlisi de les concentracions internes d'acetona i isopropanol demostra que l'alcohol és, de bell antuvi, absent del medi intern de l'organisme, no detectant-se'n fins 8h després d'iniciar-se la dieta. A partir d'aquest moment, s'incrementa fins a les 72h, punt en el qual comença a decreixer. Hom podria suposar que la presència creixent d'isopropanol fóra deguda a la seva incorporació a velocitat superior a la que pot ésser metabolitzat, considerant els nivells mínims de l'activitat ADH. La hipòtesi no explica, però, com ni perquè l'isopropanol decreix a partir de les 72h de tractament. Si introduïm en les nostres consideracions l'acció de l'ACR sobre l'acetona, com a responsable de l'isopropanol detectat en el medi intern podrem donar una raó vàlida de perquè l'aparició d'isopropanol intern és posterior al de l'acetona interna. Els nivells d'activitat ACR confirmen també aquesta hipòtesi. Els nivells d'acetona interna semblen sotmesos a un equilibri oscil·lant amb l'isopropanol. Aquest fenomen va ésser observat per Vilageliu (1980) en el medi extern, i sembla trobar una explicació en un equilibri entre activitats ADH i ACR que no permetria la superació d'un determinat sostre d'acetona. Un punt realment sorprenent fou l'aparició en les anàlisis de medi intern d'individus sotmesos a dieta d'isopropanol, de nivells mínims, però detectables, d'etanol i acetaldehid després de 96h i 192h de tractament. L'única explicació plausible d'aquest fet es basa en la suposició que l'activitat reductàsica incrementada que ha presentat l'organisme ha estat capaç de desplaçar part dels compostos del metabolisme intermediari -acetats- als seus estats reduïts d'acetaldehid i etanol. El mateix fet seria probablement el responsable de l'aparició de l'acetaldehid intern en les darreres etapes del tractament amb aquest alcohol. En els mamífers, s'ha descrit una resposta equi-

valent, ja que Gersham (1975) recupera etanol marcat radioactivament després de subministrar acetaldehid C-14 a micos nodrits exclusivament amb etanol; i Rognstad (1976) recupera etanol marcat a partir de rates alcohòliques alimentades amb lactat-H-3.

Recuperació de l'activitat ADH després de dietes d'isopropanol.

L'inhibició de l'ADH causada per l'acetona és reversible i l'activitat enzimàtica es recupera quan les mosques són retornades a medi sense suplementar (Papell, 1979). Des dels treballs de Schwartz i Sofer (1976) es coneix el responsable d'aquesta desactivació de l'ADH: l'intercanvi en les quantitats relatives de cada un dels conformers de l'enzim, que presenten grans diferències de capacitat catalítica.

S'ha intentat establir si la recuperació de l'activitat era el procés invers de la inhibició, o sia, un altre canvi en la conformació de les molècules de l'enzim, o bé implicava nova síntesi de proteïna, que adoptava ja la forma més activa. Hom ha comprovat una resposta diferencial en la recuperació de l'activitat, segons el medi nutritiu estés o no suplementat amb cicloheximida, inhibidor de la síntesi proteica. En els casos on aquest compost no era present, el valor d'activitat enzimàtica creixia regularment, convergint cap a un nivell equivalent al que mostaven els individus on no s'havia inhibit l'enzim, pertanyents al mateix temps de tractament. Aquest nivell de "referència" vindria determinat únicament pel temps de permanència dins del vial d'experimentació. És clar, també, que la cicloheximida, per si sola, no sembla afectar els nivells d'ADH dins dels temps de les nostres proves. Els individus, l'activitat ADH dels quals ha estat inhibida per tractament previ amb isopropanol, són incapaços de recobrar-la en presència de 0.5% de cicloheximida en el medi: l'activitat enzimàtica resta a valors del 27.5% respecte aquella on hi ha hagut recuperació. Ja que un 0.5% de ciclo-



heximida per via oral inhibeix la síntesi proteica a un valor 10-20% del seu valor normal (Dingley i Maynard-Smithh 1968), sembla clar que la recuperació de l'activitat ADH opera per una nova síntesi de l'enzim, i no per reconversió d'un a altre conformòmer.

-8- CONCLUSIONS.

CONCLUSIONS.

Propietats bioquímiques de l'enzim ADH en extracta cru en diverses espècies de Drosophila.

1) L'enzim ADH conserva la seva estructura de dímer actiu de pes molecular 94.000 en tots els casos analitzats, i que respon a la molècula de funció alcohol-dehidrogenàsica característica d'aquest gènere.

2) Moltes de les propietats variables de l'enzim ADH entre espècies de Drosophila analitzades lligades a la posició filogenètica de l'espècie dins del gènere.

3) No existeix una relació única entre els nivells d'activitat ADH de cada una de les espècies i la tolerància en front a alcohol amb l'etanol i l'isopropanol. Cal considerar aquesta tolerància com una resposta orgànica on es troben implicats nombrosos paràmetres dels quals l'activitat ADH només n'és un, i que només adquirirà preponderància si presenta característiques extremes respecte la mitjana general.

4) Existeixen en l'homogenat cru, i per tant, en l'organisme de Drosophila, múltiples factors que influeixen en l'acció de l'enzim, modulant propietats tals com la seva estabilitat o el seu pH òptim d'activitat.

-9- CONCLUSIONS.

5) La majoria d'espècies analitzades no presenten variants electroforètiques per l'ADH, i en totes elles, aquest enzim és present sota la forma de tres conformacions actives.

CONCLUSIONS.

Propietats bioquímiques de l'enzim ADH en extracte cru en diverses espècies de Drosophila .

- 1) L'enzim ADH conserva la seva estructura de dímer actiu de pes molecular 54,000d en tots els casos analitzats, i que respon a la molècula de funció alcohol-des-hidrogenàsica característica d'aquest gènere.
- 2) Moltes de les propietats variables de l'enzim ADH entre espècies de Drosophila apareixen lligades a la posició filogenètica de l'espècie dins del gènere.
- 3) No existeix una relació unívoca entre els nivells d'activitat ADH de cada una de les espècies i la tolerància en front a alcohols com l'etanol i l'isopropanol. Cal considerar aquesta tolerància com una resposta orgànica on es troben implicats nombrosos paràmetres dels quals l'activitat ADH només n'és un, i que només adquirirà preponderància si presenta característiques extremes respecte la mitjana general.
- 4) Existeixen en l'homogenat cru, i per tant, en l'organisme de Drosophila, múltiples factors que influeixen en l'acció de l'enzim, modulant propietats tals com la seva estabilitat o el seu pH òptim d'activitat.
- 5) La majoria d'espècies analitzades no presenten variants electroforètiques per l'ADH, i en totes elles, aquest enzim és present sota la forma de tres conformòmers actius.

Purificació i caracterització de l'enzim ADH de *D.hydei*.

- 1) El sistema de purificació aplicat ha permès l'obtenció de l'enzim ADH de *D.hydei* amb un grau de puresa molt satisfactori i apropiat per als estudis funcionals i estructurals que hom preveia.

- 2) Ja que per composició d'aminoàcids, l'espècie *D.hydei* és propera a *D.immigrans* i *D.funnebris*, cal admetre que la similitud de les propietats cinètiques entre l'enzim de *D.hydei* i *D.simulans* que hom observa obeeix a un criteri de convergència biològica per adaptació a característiques ambientals concretes.

- 3) En l'intent d'estudi més detallat de la molècula mitjançant caracterització de pèptids tríptics, s'ha determinat com a idònia l'aplicació de les recentment desenvolupades tècniques de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en columnes de fase reversa octa- o decaocta-carbonades, en front a les tècniques clàssiques de separació per mapatge bidimensional sobre paper. Hom basa aquesta afirmació sobre els següents avantatges:
 - no pèrdua selectiva de pèptids poc solubles
 - separació de pèptids no discernibles per d'altres tècniques.
 - obtenció de pèptids lliures de contaminants.
 - estalvi de múltiples etapes en la purificació que provoquen la pèrdua contínua de material.

- 4) Les porcions de la molècula d'ADH de *D.hydei* identificades respecte a la seva homòloga de *D.melanogaster*, permeten detectar un percentatge de substitucions que concorda amb les dades d'anàlisi de semblança d'aquesta regió del genoma que hom coneix. Tot sembla indicar que, mentre no s'afectin els punts actius de la molècula, la variabilitat permesa és relativament elevada, i no es centra en cap regió específica de la cadena proteica.

Resta palès que la solució a molts dels problemes comparatius plantejats per l'ADH dins del gènere Drosophila a nivell estructural, funcional i de regulació, necessiten una anàlisi a nivell genòmic que , ultra exons del gen Adh inclogui introns i seqüències adjacents.

Metabolisme dels alcohols a Drosophila i enzim ADH.

1) Hom entén que l'acció catalítica de l'ADH sobre els alcohols a Drosophila , ha d'ésser imprescindiblement interpretada com a una doble funció:

- la funció nutritiva, que permet l'assimilació d'uns productes que proporcionen potencial reductor i energètic, i que serà possible sempre que ho permeti la natura dels productes (alcohols primaris) o la seva concentració limitada en el medi (no superior a la Km)
- la funció detoxificant, que permet l'eliminació i tolerància a altres concentracions d'alcohols en el medi o a alcohols no assimilables (alcohols secundaris).

És aquesta segona funcionalitat la que facilitaria la colonització de nous hàbitats especialment rics en alcohols. Els paràmetres que la determinen semblen ésser la quantitat d'enzim present en l'individu i la velocitat màxima d'aquest enzim; i no, per al contrari les constants de Michaelis envers coenzim o substrats.

2) En analitzar la funció detoxificant de l'enzim ADH, es comprovà que eren moltes les incògnites per resoldre al voltant de les vies metabòliques que completen l'acció d'aquest enzim sobre els alcohols. Els resultats obtinguts n'han permès aclarir una: el sistema responsable de la conversió d'aldehids i cetones a alcohols ,

conversió que no és duta a terme per l'activitat inversa de l'ADH, sinó per un sistema descrit en aquest treball, denominat aldo-ceto reductasa, per analogia amb els sistemes descrits a mamífers amb els quals comparteix les característiques cinètiques bàsiques: ús de NADPH com a coenzim a concentracions micromolars, i pH neutre com a òptim d'activitat. L'esmentat sistema ha estat detectat també per tinció específica després d'electroforesi en gels de midó, i s'ha comprovat la seva independència respecte als sistemes ADH i aldehyd-oxidasa per anàlisi de soques nulls per a aquests enzims.

2) L'anàlisi de les activitats enzimàtiques ADH i ACR i nivells de metabolits en el medi i en l'organisme, es revela essencialment diferent en la ingesta d'alcohols primaris (etanol) o secundaris (isopropanol). En el primer cas, i d'acord amb les vies de metabolització postulades, té lloc una total assimilació del producte i, per tant, la seva desaparició del medi, amb un increment moderat de les activitats enzimàtiques ADH i ACR. En la ingesta d'isopropanol, no hi ha desaparició de productes del medi extern, d'acord amb la manca de sortida de la via isopropanol/acetona. Si hom analitza els nivells de metabolits interns, fet que ha estat possible mercès a l'aplicació de les tècniques de Cromatografia de Gasos per Head Space, resta clar que tant l'etanol, com l'isopropanol i l'acetona tenen un sostre de concentració màxima, que estaria controlat pels nivells d'activitat ADH i ACR ultra tots els enzims que potencialment poden intervenir en el metabolisme dels alcohols.

3) Per últim, tractaments amb inhibidors de síntesi proteica, tals com la cicloheximida, permeten afirmar que si bé la inhibició de l'activitat enzimàtica ADH per ingesta d'isopropanol sembla provenir de la conversió d'un conformòmer més actiu a un de menys actiu, la recuperació quan s'elimina l'isopropanol de la dieta opera per síntesi proteica de nou enzim, que adoptarà la conformació més activa. Corrobora aquesta afirmació, el fet que mentre la

inhibició és relativament ràpida, la recuperació de nivells normals d'activitat suposa uns intervals més llargs compatibles amb la necessitat de nova síntesi proteica.

-Aldrich, S.W., 1973.

"Adaptation of Drosophila to temperature IV. Natural selection at the Adh locus." Genetics 59, 21-29.

-Ainsley R. & Barrie Killo G., 1975.

"Selection mechanisms maintaining Adh polymorphism in Drosophila melanogaster". Isolymen 11, 14, by Markert-Clement, Ac. Press, N.Y., 733-742.

-Ambler, R.P., 1972.

"Enzymatic hydrolysis with carboxypeptidases". Methods of Enzymology 25, 143-146.

-Anderson, S.M.; McDonald, J.F. & Santos, M., 1981.

"Selection at the Adh locus in Drosophila melanogaster: Adult survivorship-mortality in response to ethanol" Experientia 37, 463-464.

-Anderson, J.K. & Hole, J.E., 1982.

"Adaptation of Reverse-Phase HPLC for the isolation and sequence analysis of peptides from Plasma Amyloid P-Component". Analytical Biochemistry 123, 419-421.

-Anderson, S.M. & McDonald, J.F., 1983.

"Biochemical and molecular analysis of naturally occurring Adh variants in Drosophila melanogaster". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 4798-1002 - BIBLIOGRAFIA-.

-Arahalan, M.J.; Paoletti, E. & Reinhold, J.G., 1971.

Biochemical Journal 125, 1039.

-Atkinson, W. & Sherrocks, S., 1977.

"Breeding site specificity in the domestic species of Drosophila". Oecologia 28, 223-232.

-Auffret, A.O., Williams, G.M. & Thatcher, P.R., 1978.

"Identification of the blocked N-terminus of an alcohol dehydrogenase from D. melanogaster #71. FEBS LETTERS 80 (2), 51-58.

-Alahiotis, S.N.; 1982.

"Adaptation of Drosophila to temperature.IV. Natural selection at the Adh locus." Genetica 59, 81-89.

-Ainsley R. & Barrie Kitto G.;1975.

"Selection Mechanisms maintaining ADH polymorphisms in Drosophila melanogaster". Isozymes II, Ed, by Markert-Clement , Ac.Press, N.Y.,733-742.

-Ambler,R.P.;1972.

"Enzymatic hydrolysis with carboxypeptidases".Methods of Enzymology 25 , 143-145.

-Anderson, S.M.; McDonald, J.F. & Santos,M.;1981.

"Selection at the Adh locus in Drosophila melanogaster : Adult survivorship-mortality in response to ethanol" Experientia 37,463-464.

-Anderson, J.K. & Mole, J.E.;1982.

"Adaptation of Reverse-Phase HPLC for the isolation and sequence analysis of peptides from Plasma Amyloid P-Component". Analytical Biochemistry 123, 413-421.

-Anderson, S.M. & McDonald, J.F.;1983.

"Biochemical and molecular analysis of naturally occurring Adh variants in Drosophila melanogaster". Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A. 80 , 4798-4802.

-Arslanian, M.J.; Pascoe, E. & Reinhold, J.G.; 1971.

Biochemical Journal 125, 1039.

-Atkinson,W. & Shorrocks, B. 1977.

"Breeding site specificity in the domestic species of Drosophila". Oecologia 29, 223-232.

-Auffret, A.D., Williams, D.H. & Thatcher, D.R,. 1978.

"Identification of the blocked N-terminus of an alcohol dehydrogenase from D.melanogaster n-11. FEBS LETTERS 90 (2), 51-58.

-Bachur, N.R.; 1976.

"Cytoplasmic Aldo-Keto Reductases: A class of Drug Metabolizing Enzymes". *Science* 193 , 595.

-Barnes, B.W. & Birley, A.J.; 1978.

"Genetical variation for enzyme activity in a population of D.melanogaster. IV Analysis of alcohol dehydrogenase activity in chromosome substitution lines!" *Heredity* 40 , 51-58.

-Benyajati, C.; Wang, N.; Reddy, A.; Weinberg, E. & Sofer, W. 1980.

"Alcohol dehydrogenase in Drosophila: isolation and characterization of messenger RNA and cDNA clone." *Nuc.Ac. Res.* 23, 5649-5667.

-Benyajati, C.; Place, A.R.; Powers, D.A. & Sofer, W.; 1981.

"Alcohol dehydrogenase gene of Drosophila melanogaster : Relationship of intervening sequences to functional domains in the protein." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 , 2717-2721.

-Benyajati, C.; Place , A.R. ; Wang, N.; Pentz, E. & Sofer, W. 1982.

"Deletions at intervening sequence splice sites in the alcohol dehydrogenase gene of Drosophila ." *Nuc. Ac. Res.* 10, 22, 7261-7272

-Benyajati, C.; Spoerel. N.; Haymerle, H. & Ashburner, M.; 1983.

"The messenger RNA for Alcohol Dehydrogenase in Drosophila melanogaster differs in its 5'end in different developmental stages." *Cell*, 33 , 125-133.

-Bonnichsen, R.K. & Wassen, A.M.; 1948.

ABB 18 , 361.

-Bränden, C.I.; Jörnvall, H.; Eklund, H. & Furungen, B.; 1975

"Alcohol dehydrogenases". in "The Enzymes", 11, 103-186, Ed. by P.D. Boyer, Ac. Press .

- Briscoe, P.A.;Robertson, A. & Malpica, J.M.;1975.
 "Dominance at the Adh locus in response of adult Drosophila melanogaster to environmental alcohol." Nature, 255, 148-149.
- Caverner, D.R.& Clegg,M.T. ;1978.
 "Dynamics of correlated genetic systems. IV. Multilocus effects of ethanol stress environments." Genetics,90,3, 629-644.
- Clarke,B.;1975.
 "The contribution of ecological genetics to evolutionary theory: Detecting the direct effects of natural selection on particular polymorphic loci." Genetics,79, 101-103.
- Courtright, J.B.; Imbersky, R.B. & Ursprung, H.;1966.
 "The genetic control of alcohol dehydrogenase and octanol dehydrogenase isozymes in Drosophila". Genetics, 54, 1251-1260.
- Crestfield, A.M.; Moore,S. & Stein, W.H., 1963.
 "The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated Proteins." The J. of Biol. Chem.,238, 2,622-627.
- Cseko, Y.M.T.; Dower, N.A.; Minoos,P.;Lowenstein, L., Smith, G.R.; Stone, J. & Sederoff,R.;1979.
 "Evolution of polypyrimidines in Drosophila ." Genetics, 92, 459-484.
- Daly,A.K. & Mantle, T.J.;1982.
 "Purification and characterization of the multiple forms of aldehyde reductase in ox kidney." Bioch.Jour. 205,373-380.
- David,J.Fouillet, P. & Arens, M.F.;1974.
 "Comparaison de la sensibilité a l'alcool éthylique des six espèces de Drosophila du sous-groupe melanogaster." Arch.Zool.Exp.Gen. 115, 401-410.

-David, J. & Bocquet, Ch.; 1975.

"Similarities and differences in latitudinal adaptation of two Drosophila sibling species.", *Nature*, 257, 588.

-David, J.R.; Bocquet, Ch.; Arens, M.F. & Fouillet, P.; 1976.
"Biological role of alcohol dehydrogenase in the tolerance of D.melanogaster to aliphatic alcohols: utilization of an Adh-null mutant." *Bioch. Gen.* 14, 989-997.

-David, J.; 1977.

"Métabolisme de l'alcool chez Drosophila melanogaster. I Rôle de la deshydrogenase alcoolique dans la détoxification de ce produit". *Bull. Soc. Zool. de France*, 102, 298.

-David, J.; Van Herrewege, J.; Monclús, M. & Prevosti, A.; 1979.
"High ethanol tolerance in two distantly related Drosophila species: a probable case of recent convergent adaptation." *Comp. Bioch. Physiol.*, 63c, 53-56.

-David, J.; Bocquet, Ch.; Van Herrewege, J.; Fouillet, P. & Arens, M.F.; 1978.
"Alcohol metabolism in Drosophila melanogaster : Uselessness of the most active Aldehyde Oxidase produced by the *Aldox lucus*." *Bioch. Gen.* 16, 3/4, 203-211.

-David, J.R.; Van Herrewege, J.; Scheemaeker-Louis, M. & Pla, E.; 1981.

"Drosophila alcohol dehydrogenase: Detoxification of isopropanol and acetone, substances not used in energy metabolism". *Heredity*, 47, 2, 263-268.

-David, J. & Van Herrewege, J.; 1983.

"Adaptation to alcoholic fermentation in Drosophila species: relationship between alcohol tolerance and larval habitat". *Comp. Bioch. Physiol.*, 74A, 2, 283.

-Day, T.H. & Needham, L.; 1974.

"Properties of alcohol dehydrogenase isozymes in a strain of Drosophila melanogaster homozygous for the Adh-slow allele.", Bioch. Gen., 11, 2, 167-175.

-Day, T.H.; Hillier, P.C. & Clarke, B.; 1974.

"Properties of genetically polymorphic isozymes of alcohol dehydrogenase in Drosophila melanogaster". Bioch. Gen. 11, 2, 141-153.

-Day, T.H.; Hillier, P.C. & Clarke, B.; 1974.

"The relative quantities and catalytic activities of enzymes produced by alleles at the alcohol dehydrogenase locus in Drosophila melanogaster." Bioch. Gen. 11, 155-166.

-De Duve, C. & Baudhuin, P.; 1966.

Physiol. Rev. 46, 323.

-Deltombe-Lietaert, M.C.; Delcour, J.; Lenelle-Monfort, N. & Elens, A.; 1979.

"Ethanol metabolism in D. melanogaster." Experientia 35, 579-581.

-Dent

-Dickinson, F.M. & Daziel, K.; 1967.

Nature, 214, 31.

-Dickinson, F.M. ; 1970.

Bioch. Journal 120, 821.

-Dickinson, F.M.; 1972.

Bioch. Journal 126, 133.

-Dingley, F. & Maynard Smith, J.; 1968.

"Temperature acclimatization in the absence of protein synthesis in Drosophila subobscura". J. of Insc. Physiol. 14, 1185-1194.

- Duley, J.A. & Holmes, R.S.; 1982.
 "Biochemical Genetics of Aldehyde Reductase in the Mouse: Ahr-1. A new locus linked to the alcohol dehydrogenase gene complex on chromosome 3." Bioch.Gen. 20, 11/12, 1067-1083.
- Dunker, A.K. & Rueckert, R.R.; 1969.
 "Observations on molecular weight determinations on polyacrylamide gel". J. of Biol. Chem. 241, 5074-5079.
- Dunn, G.R.; Wilson, T.G. & Jacobson, K.B.; 1969.
 "Age-dependent changes in alcohol dehydrogenase in Drosophila." The J. of Exp. Zool. 171, 2, 185-189.
- Eisenthal, R & Cornish-Bowden, A.; 1974.
 "The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters." Bioch. Journal, 139, 715-720.
- Eisses, K.T.; vanDijk, H. & vanDelden, W.; 1979.
 "Genetic differentiation within the melanogaster species group of the genus Drosophila (Sophophora)." Evolution 33, 4, 1063-1068.
- Eklund, H.; Nordström, B.; Zeppezauer, E; Söderlund, G; Ohlsson, I; Boiwe, T & Bränden, C.I.; 1974.
FEBS Lett. 44, 200.
- Faulkner, P.; 1958.
 "Polyol dehydrogenase of the Silkworm." Biochem. Journal, 68, 374-379.
- Fletcher, T.S.; Ayala, F.J.; Thatcher, D.R. & Chambers, G.K.; 1978.
 "Structural analysis of the ADH^S electromorph of Drosophila melanogaster". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5609-5612.
- Flynn, T.G.; Shires, J. & Walton, D.J.; 1975.
 "Properties of the nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent aldehyde reductase from pig kidney"

J. Biol. Chem. 250, 2933.

-Flynn, T.G.; Cromlish, J.A. & Davidson, W.S.; 1982.
"Aldehyde reductase from Pig kidney", Meth. in Enzym. 89,
501-506, Ed. by W.A. Wood, Ac. Press.

-Fowler, P.W.; Ball, A.J.S. & Griffiths, D.E.; 1972.
Can. J. Biochem. 50, 35.

-Garcin, F.; Côté, J.; Radouco-Thomas, S.; Chawla, S.S. & Radouco-Thomas, C.; 1983.
"Drosophila ethanol metabolizing system. Acetaldehyde oxidation in ALDOX-null mutants." *Experientia* 39, 1122.

-Gershman. 1975.
Arch. Biochem. Biophys. 168, 327.

-Gibson, J.B.; 1970.
"Enzyme flexibility in Drosophila melanogaster." *Nature*,
227, 959-960.

-Gibson, J.B.; Lewis, N.; Adena, M.A. & Wilson, S.R.; 1979.
"Selection for ethanol tolerance in two populations of Drosophila melanogaster segregating alcohol dehydrogenase allozymes." *Aust. J. Biol. Sci.* 32, 387-398.

-Gibson, J.B.; May, T.W. & Wilks, A.V.; 1981.
"Genetic variation at the alcohol dehydrogenase locus in Drosophila melanogaster in relation to environmental variation: Ethanol levels in breeding sites and alloenzyme frequencies." *Oecologia* 51, 191-198.

-Goldberg, D.A.; 1980.
"Isolation and partial characterization of the Drosophila alcohol dehydrogenase gene." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 10, 5749-5798.

-Goldberg, D.A.; Posakony, J.W. & Maniatis, T.; 1983.
"Correct developmental expression of a cloned Alcohol Dehydrogenase gene transduced into the Drosophila germ

line."Cell 34, 59-73.

-Gower, J.C.;1966.

"Some distance properties of latent root and vectors methods in multivariate analysis." Biometrika 53,315-328.

-Grell,E.H.; Jacobson,K.B. & Murphy,J.B.;1965.

"Alcohol dehydrogenase in D.melanogaster : Isozymes and genetic variants." Science, 149, 80-82.

-Grell,E.H.;Jacobson,K.B. & Murphy,J.B.;1968.

"Alterations of genetic material for analysis of alcohol dehydrogenase isozymes of D.melanogaster ."Annals New York Acad. of Sciences, 151,441.

-Gray, W.R.;1967.

"Dansyl Chloride procedure". Meth. in Enzym. 11, 139-151.

-Grossman,A.J.;Korenova, L.G. & Ulitskaya, L.E.;1970.

"Variation of the alcohol dehydrogenase locus in natural populations of Drosophila melanogaster (in Russian)". Genetika 6,2,91-96.

-Heinstra, P.W.H.; Eisses, K.Th.; Schoonen, W.G.E.J.; Aben, W.;de Winter, A.J.;van der Horst, D.J.;Marrewijk, W.J.A.; Beenackers, A.M.Th.; Scharloo,W. & Thörig,G.E.W; 1983.

"A dual function of alcohol dehydrogenase in Drosophila ." Genetica 60,129-137.

-Hirs, C.H.W.;1956

J. Biol. Chem. 219, 611.

-Hougouto,N.; Liétaert,M.C.; Libion-Mannaert, M, Feytmans,E.; & Elens, A.; 1982.

"Oviposition-site preference and ADH activity in Drosophila melanogaster." 58,121-128.

-Imbersky, R.B.; Sofer, W.H. & Ursprung, H.; 1968.

"Drosophila alcohol dehydrogenase isozymes: identity of molecular size." *Experientia* 24, 504-505.

-Imbersky, R.B. & Strommen, C.; 1972.

"Developmental changes in alcohol dehydrogenase activity in Drosophila hydei." *D.I.S.* 48, 74.

-Imbersky, R.B.; 1972.

"A age-specific isozyme of alcohol dehydrogenase in Drosophila hydei ."; *Isoz.Bull* 5, 48.

-Imbersky, R.B. & Olds, R.T.; 1973.

"Electrophoretic analysis of Adh and Odh in D.hydei and related species". *D.I.S.* 50, 95.

-Ingram, V.M.; 1963.

"Sequence methods". *Meth. in Enzymology* VI, 831-848.

-Jacobson, K.B.; 1968.

"Alcohol dehydrogenase of Drosophila: Interconversion of Isozymes." *Science* 149, 324-325.

-Jacobson, K.B.; Murphy, J.B. & Hartman, F.C.; 1970.

"Isozymes of Drosophila alcohol dehydrogenase. I Isolation and interconversion of different forms." *J.Biol. Chem.* 245, 5, 1075-1083.

-Jacobson, K.B. & Pfuderer, P.; 1970.

"Interconversion of isozymes of Drosophila alcohol dehydrogenase. II Physical characterization of the enzymes and its subunits." *J. Biol.Chem.* 245, 15, 3938-3943.

-Jacobson, K.B.; Murphy, J.B.; Knopp, J.A. & Ortiz, J.R.; 1972.

" Multiple forms of Drosophila alcohol dehydrogenase; III Conversion of one form to another by Nicotinamide Adenine Dinucleotide or Acetone." *Arch. of Bioch. and Bioph.* 149 , 22-35.

-Johnson, F.M. & Denniston, C.; 1964.

"Genetic variation of alcohol dehydrogenase in Drosophila melanogaster." Nature 204, 906-907.

-Johnson, G.B.; 1978.

"Structural flexibility of isozyme variants: Genetic Variants in Drosophila disguised by cofactor and subunit binding." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 395-399.

-Jörnvall, H.; 1970.

"Horse liver alcohol dehydrogenase. The primary structure of the protein chain of the ethanol active isozyme." Eur. J. Bioch. 16, 25-40.

-Jörnvall, H.; 1973.

"Partial similarities between yeast and liver alcohol dehydrogenases." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2295.

-Jörnvall, H.; 1977.

"The primary structure of yeast alcohol dehydrogenase." Eur. J. Bioch. 72, 425-442.

-Juan, E.; 1980.

"Estudio bioquímico y estructural del enzima alcoholdehidrogenasa en tres especies de Drosophila: D.melanogaster Adh^S, D.simulans y D.virilis ." Tesis Doctoral.

-Juan, E. & González-Duarte, R.; 1980.

"Purification and enzyme stability of alcohol dehydrogenase from Drosophila simulans, D.virilis and D.melanogaster Adh^S." Biochem. Journal, 189, 105-110.

-Juan, E. & González-Duarte, R.; 1981.

"Determination of some biochemical and structural features of alcohol dehydrogenases from Drosophila simulans and Drosophila virilis ." Biochem. Journal, 195, 61-69.

-Karlsson, Ch.; Davies, H. Öhman, J. & Anderson, U.; 1973.

Application note LKB nº 75:

-Keilin, D. & Hartree, E.F.; 1945.

Biochem. Journal 39, 293.

-King, J. & Laemmli, U.K.; 1971.

J. Molec. Biol. 62, 465-477.

-Kolb, E. & Harris, J.I., 1973.

FEBS Lett. 33, 1.

-Kreitman, M.; 1983.

"Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of Drosophila melanogaster." Nature, 304, 412-417.

-Langley, Ch.H.; Montgomery, E. & Quattlebaum, W.F.; 1982.

"Restriction map variation in the Adh region of Drosophila". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5631-5635.

-Laver, W.G.; Downie, J.C. & Webster, R.G.; 1974.

Virology 34, 193-202.

-Lewis, N. & Gibson, J. ; 1978.

"Variation in amount of enzyme protein in natural populations". Bioche. Gen. 16, 159-170.

-Lietaert, M.C.; Libion-Manaert, M.; Hougouto, N. & Elens, A. 1982.

"How can Drosophila flies without aldehyde oxidase detoxify acetaldehyde ?." Experientia, 38, 651-652.

-Lineweaver, H. & Burk, J. ; 1934.

J. Amer. Chem. Soc. 58, 658.

-Liu, T.Y. & Chang, T.H.; 1971.

"Hydrolysis of proteins with p-toluensulfonic acid." J. Biol. Chem. 246, 2842-2848.

-Lowry, R.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J.; 1951.

"Protein measurement with the folin phenol reagent".

J. Biol. Chem. 193, 265-275.

-Marchalonis, J.J.;1972.

"Conservatism in the evolution of Immunoglobulin."
Nature New Biology 236, 84-86.

-Markovic, O. ; Theorell, H. & Rao, S.;1971.

Acta Chem. Scand., 25,195.

-Maroni,C.;1978.

"Genetic control of alcohol dehydrogenase levels in
Drosophila ." Biochem. Gen. 16, 509-523.

Maroni, G. ; Laurie-Ahlberg, C.C.; Adams, D.A. & Wilton,
A.N.; 1982.

"Genetic variation in the expression of ADH in Drosophila melanogaster." Genetics 101, 431-446.

-McDonald, J.F. & Avise, J.C.;1976.

"Evidence for the adaptative significance of enzyme activity levels: Interspecific variation in -GDPH and ADH in Drosophila." Biochem.Gen. 14, 347-355.

-McDonald, J.F.; Chambers, G.K.;David,J. & Ayala, F.J.
1977.

"Adaptative response due to changes in gene regulation. A study with Drosophila." Proc. Natl. Acad.Sci. USA 74, 4562-4566.

-Mc Donald, J.F. & Ayala, F.J.;1978.

"Genetic and biochemical basis of enzyme activity variation in natural populations. I. Alcohol dehydrogenase in D.melanogaster." Genetics, 89, 371-388.

-McDonald, J. ; Anderson, S. & Santos, M.;1980.

"Biochemical differences between products of the Adh locus in Drosophila". Genetics 95,1013-1022.

-McKenzie, J.A. & Parsons, P.A.;1972.

"Alcohol tolerance:A biological parameter in the relative success of D.melanogaster and D.simulans." Oecologia 10, 373-388.

-McKenzie, J.A. & McKechnie, S.W.;1978.

"Ethanol tolerance and the Adh polymorphism in a natural population of D.melanogaster." Nature 272,75-76.

-McKechnie, S.W. & Morgan,P.;1982.

"Alcohol dehydrogenase polymorphism of D.melanogaster: Aspects of alcohol and temperature variation in the larval environment." Aust.J.Biol.Sci. 35,85-93.

-McKinley-McKee, J.S.; Winferg, J.O. & Hovik, R.;1983.

"Alloenzymes and Izoenzymes of Drosophila Alcohol Dehydrogenase". Abstracts of 8th.European Drosophila Research Conference. Cambridge 1983.

-Milkman, R.;1975.

"Further evidence of Thermostability variation within electrophoretic mobility classes of enzymes." Bioch. Gen. 14, 3/4, 383.

-Monclús, M.;1964.

"Distribución y ecología de los Drosophílidos en España." Genética Ibérica 16, 143-166.

-Monclús, M. & Prevosti, A.;1979.

"Cellars habitat and Drosophila populations." Genética Ibérica, 30-31, 189-201.

-Mourad,N. & Woronick,C.L.;1967.

Archiv. of Bioch. and Biophy. 121, 431.

-Morgan, P.;1975.

"Selection acting directly on an enzyme polymorphism". Heredity,34,1,124-127.

-Moxon, L.N.;Holmes,R.S. & Parsons, P.A.;1982.

"Comparative studies of aldehyde oxidase, alcohol dehydrogenase and aldehyde resource utilization among australian Drosophila species." Comp.Biochem. Physiol. 71B, 387-395.

-Oakeshott,J.G.; Chambers, G.K.;East, P.D.;Gibson,J.B. & Barker, J.S.F.;1982.

"Evidence for a genetic duplication involving alcohol dehydrogenase genes in Drosophila buzzatii and related species." Aust. J. Biol. Sci. 35, 73-84.

-Oray,B.; Jahani, M. & Gracy, R.W.;1982.

"High-sensitivity peptide mapping of triosephosphate isomerase: A Comparaisn of High-Performance Liquid Chromatography with two-dimensional thin-layer methods." Anal.Bioch. 125, 131-138.

-Orme-Johnson, W.H. & Ziegler, D.M.;1975

BBRC 21, 78.

-Papal,I.; Henderson,M.; vanHerrewegw, J.;David,J. & Sofer, W.;1979.

"Drosophila alcohol dehydrogenase activity in vitro and in vivo:Effects of acetone feeding." Biocem. Gen. 17, 553-563.

-Patterson, J.T. & Stone, W.S.;1952.

"Evolution in the genus Drosophila." The McMillan Company New York.

-Pietrusko, R. & Theorell, H.;1969.

ABB 131,288.

-Pipkin, S.B.; Rhodes,C. & Williams,N.;1973.

"Influence of temperature on Drosophila alcohol dehydrogenase polymorphism. " The J. of Heredity 64, 181-185.

- Pipkin, S.B.; Potter, J.H.; Lubega, S. & Springer, E.; 1975
 "Further studies of alcohol dehydrogenase polymorphism
 in mexican strains of D.melanogaster." Isozymes 4, 547-561.
 Acad. Press. N.Y.
- Prestwich, G.D.; 1983.
 "Las defensas químicas de los termes". Inv. y Ciencia 85,
 54-64.
- Retzios, A.D. & Thatcher, D.R.; 1979.
 "Chemical basis of the electrophoretic variation observed
 at the alcohol dehydrogenase locus of Drosophila melano-
gaster." Biochimie 61, 701-704.
- Richmond, R.C. & Gerking, J.I.; 1979.
 "Ovoposition site preference in Drosophila." Beh. Gen. 9
 3, 233-242.
- Rongstan.; 1976.
 2nd. Int. Symp. on Alcohol and Aldehyde Metabolism Sys-
 tems. Abstract 31. Philadelphia 1976.
- Rossman, M.G.; Liljas, A.; Bränden, C.I. & Banaszak, L.J.;
 1975.
 "Evolutionary and structural relationships among dehydro-
 genases." The Enzymes 11, 61-102. Ed. by P. Boyer. Acad.
 Press. N.Y.
- Sacktor, B. & Dick, A.J.; 1962.
J. Biol. Chem. 237, 3259.
- Sampsell, B.; 1977.
 "Isolation and genetic characterization of alcohol dehydro-
 genase thermostability variants occurring in natural popu-
 lations of Drosophila melanogaster." Biochem. Gen. 15, 9/10,
 971-988.

- Sanger, F. & Thompson, E.O.P.; 1963.
 "Halogenation of tyrosine bonds during acyd hydrolisis".
 Biochem. and Biophys. Acta 71, 468-471.
- Sangiorgi, S.; Pieragostini, E.; Prospero, L.; Leggieri, P.
 & Cavicchi, S.; 1981.
- Schwartz, M.; Gerace, L.; O'Donnell, J. & Sofer, W.; 1975.
 "Drosophila alcohol dehydrogenase origin of the multiple
 forms." Isozymes 1, 725-751. Acad. Press. N.Y.
- Schwartz, M. & Sofer, W.; 1976.
 "Diet induced alterations in distribution of the multiple
 forms of alcohol dehydrogenase in Drosophila." Nature, 263
 129-130.
- Schwartz, M. & Jörnvall, H.; 1976.
 "Structural analysis of mutant and wild-type alcohol de-
 hydrogenase of Drosophila melanogaster ." Europ. J. Bioch.
68, 159-168.
- Schimpfessel, L.; 1967.
 Arch. Int. Physiol. Biochim. 75, 368.
- Smith, M.; Hopkinson, D.A. & Harris, H.; 1971.
 Ann. Hum. Genet. 34, 251.
- Sofer, W. & Ursprung, H.; 1968.
 "Drosophila alcohol dehydrogenase. Purification and par-
 tial characterization." J. Biol. Chem. 243, 3110-3115.
- Sokal, R.R. & Michener, C.D.; 1958.
 "A statistical method for evaluating systematic relation-
 ships." Univ. Kansas Sci. Bull. 38, 1409-1438.
- Sokal, R.R. & Sneath, P.H.A.; 1963
 "Principles of Numerical Taxonomy". W.H. Freeman and Co.;
 San Francisco.

-Sturtevant, A.H.;1921.

"The North American species of Drosophila." Carne.Inst. Publ. 301, 1-50.

-Strydom,D.J. & Vallee, B.L.; 1982.

"Characterization of human alcohol dehydrogenase iso-enzymes by High-Performance Liquid Chromatographic Peptide mapping".Anal. Bioch. 123, 422-429.

-Sund,H. & Theorell,H.;1963.

The Enzymes, 7, 2nd Ed. ,25.

-Thatcher, D.R.;1977.

"Enzyme instability and proteolysis during the purification of an alcohol dehydrogenase from Drosophila melanogaster." Bioch. Journal 163, 317-323.

-Thatcher,D.R.;1980.

"The complete amino acid sequence of three alcohol dehydrogenase alleloenzymes (Adh^{n-11} , Adh^S , Adh^{uf}) from the fruitfly D.melanogaster ." Biochem. Journal 187,875-886.

-Theorell,H.;1970.

"Pyridine nucleotide-dependent dehydrogenases" Ed. by E.Sund ,Springer-Verlag ,Berlin-New York, 121.

-Thompson,J.N. & Kaiser , T.N.;1977.

"Selection acting upon slow-migrating ADH alleles differing in enzyme activity." Heredity 38,2,191-195.

-Thörig G.E.W.;Schoone,A.A. & Scharloo,W.;1975.

"Variation between electrophoretically identical alleles at the alcohol dehydrogenase locus in D.melanogaster ." Biochem.Gen. 13,721-731.

-Throckmorton,L.H.;1975.

"The Phylogeny, Ecology and Geography of Drosophila." Handbook of Genetics 3, 421-587.

-Turner ,A.J. & Tipton, K.F.;1972.

"The characterization of two reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-linked aldehyde reductases from pig brain." Biochem. Journal 130, 765-772.

-Ursprung,H.& Leone,J.;1965.

"Alcohol dehydrogenase: A polymorphism in Drosophila mela-
nogaster." J.Exp.Zool. 160, 147.

-Ursprung,H. & Carlin, L.;1968.

"Drosophila alcohol dehydrogenase: in vitro changes of isoenzyme pattern." Ann. N.Y.Acad. Sci. 151,456.

-Ursprung,H.; Sofer, W.H. & Burroughs, N.; 1970.

"Ontogeny and tissue distribution of alcohol dehydrogenase in D.melanogaster." Wilhelm Roux Archiv. 164, 201-208.

-Vallee ,B.L.; Li,T.K.; Bosron,W.P. ;Dafeldecker, W.P. ;
Lange,L.G. ;1977.

Proc. Natl. Acad. Sci.USA 74, 4378.

-Vilageliu, Ll. & Gonzalez-Duarte, R.;1980.

"Effect of ethanol and isopropanol on the activity of alcohol dehydrogenase, viability and life-span in Drosophila melanogaster and Drosophila funebris ." Experientia 36
828-829.

-Vilageliu,Ll.; Juan,E. & Gonzalez-Duarte,R. ;1982.

"Determination of some biochemical features of alcohol dehydrogenase from Drosophila melanogaster, D.simulans, D.virilis, D.funebris, D.immigrans and D.lebanonensis. Comparison of their properties and estimation of the homology of the ADH enzyme of different species." Advances in Genetics,Development,and Evolution of Drosophila. Ed. by Seppo Lakovaara, PlenumPress, N.Y. 237-251.

- Vilageliu, Ll.;1981.
 "Purificación y caracterización del enzima alcohol deshidrogenasa de dos especies de Drosophila: D.funnebris y D.immigrans. Estudio comparativo del efecto de algunos substratos del enzima respecto diversos parámetros biológicos en ambas especies." Tesis Doctoral.
- Van Delden, W.; Kamping ,A. & Van Dijk,H.;1975.
 "Selection at the alcohol dehydrogenase locus in Drosophila melanogaster." Experientia, 31 ,418-419.
- VanHerrewege, J. & David, J.;1974.
 "Utilisation de l'alcool ethylique dans le metabolisme energetique d'un insect:Influence sur la durée de survie des adults de D.melanogaster." Compt. rend. Acad. Sci. Paris 279, 335.
- VanHerrewege, & David, J.;1978.
 "Feeding and insect through its respiration: Assimilation of alcohol vapors by D.melanogaster adults." Experientia 34, 163.
- Vigue, C.L. & Johnson, F.M.;1973.
 "Isozyme variability in species of the genus Drosophila. VI. Frequency-property-environments relationships of allelic alcohol dehydrogenase in D.melanogaster." Biochem. Gen. 9 , 213-227.
- Ward, R.D. & Herbert, P.D.N.;1972.
 "Variability of alcohol dehydrogenase activity in a natural population of Drosophila melanogaster." Nature New Biology 236, 243-244.
- Ward,R.D.;1975.
 "Alcohol dehydrogenase activity in Drosophila melanogaster a quantitative character." Genet. Res.26, 81-93.



-Wartburg, J.P. ;Bethune, J.L.& Vallee, B.L.;1964.
Biochemistry 3,1775.

-Wartburg, J.P.v. & Wermuth, B.;1982.
"Aldehyde reductase from human tissues." Meth. in Enzym.89,
506-515.

-Winberg, J.O.;Thatcher, D.R. & McKinley-McKee, J.S.;
1982 (a).
"Alcohol dehydrogenase from the fruitfly Drosophila me-
lanogaster. Inhibition studies of the alleloenzymes
Adh^S and Adh^{uf}." Bioch. et Biophy. Acta 704 ,17-25.

-Winberg, J.O.; Thatcher, D.R. & McKinley-McKee, J.S.;
1982 (b).
"Alcohol dehydrogenase from the fruitfly Drosophila me-
lanogaster. Substrate specificity of the alleloenzymes
Adh^S and Adh^{uf}." Bioch. et biophy. Acta 704, 7-16.

-Woodruff, R.C. & Ashburner, M. ;1979.
"The genetics of a small autosomal region of D.melanogas-
ter containing the structural gene for alcohol dehydroge-
nase. I Characterization of deficiencies and mapping of
Adh and visible mutations." Genetics 92, 117-132.

-Yost, R.W.;Ettre, L.S. & Conlon, R.D.;1980.
"Introducción a la cromatografía líquida práctica". Perkin
Elmer.

-Ziolo, L.K. & Parsons, P.A.;1982.
"Ethanol tolerance, alcohol-dehydrogenase activity and Adh
allozymes in Drosophila melanogaster". Genetica 57 ,231-
237.

-Zwiebel, L.J.; Cohn, V.H.; Wright, D.R. & Gordon, P.M.;1982
"Evolution of single-copy DNA and the ADH gene in seven
Drosophilids." J.Mol. Evol. 19, 62-71.



Per omisió no figuren en la seva posició correcta les següents cites bibliogràfiques:

- Chambers,G.K.; Wilks,A.V. & Gibson, J.B.;1981.
"An electrophoretically cryptic alcohol dehydrogenase variant in Drosophila melanogaster .III.Biochemical properties and comparaisn with common enzyme forms." Aust. J.Biol. Sci. 34, 625-637.
- Chambers, G.K.; Laver, W.G.; Campbell,S. & Gibson,J.B.; 1981.
"Structural analysis of an electrophoretically cryptic alcohol dehydrogenase variant from an australian population of Drosophila melanogaster."/Proc. Natl.Acad. Sci. USA 78, 3103-3107.
- Hachenberg ,H. & Schmidt, A.P.;1979.
"Gas Chromatographic Headspace Analysis". Heiden. London.
- Jentzsch,D.; Krüger,H & Lebrecht,G.;1967.
"Angewandte Gaschromatographie" P.10.Badenseewerk.Perkin Elmer.
- Machata, G.; 1964.
Microchem. Acta 262.
- Gross,E.;1967.
"The cyanogen bromide reaction". Methods in Enzymology XI, 238-255.



BARCELONA, MARÇ 1984.