

**OBJECTIUS**

Els membres de la família de les alcohol deshidrogenases es caracteritzen per ésser enzims que utilitzen el NAD(H) com a coenzim. El descobriment però, a la granota *Rana perezi*, d'una alcohol deshidrogenasa dependent de NADP(H) (ADH8), representà una interessant novetat en aquesta família enzimàtica. Aquest fet motivà l'objectiu general de la present Tesi Doctoral: l'estudi dels factors estructurals responsables de l'especificitat de coenzim de l'ADH8.

Per dur a terme l'aproximació a la base estructural, ens vàrem proposar la resolució de l'estructura tridimensional d'ADH8. Per fer-ho, es va establir una col.laboració amb el Grup *Estructura tridimensional de proteïnes implicades en processos patològics* del CSIC, dirigit pel Dr. Ignacio Fita. Per altra banda, l'anàlisi de la importància de diferents posicions de la seqüència d'ADH8 en l'especificitat de coenzim es realitzà mitjançant mutagènesi dirigida per PCR. Aquestes dues aproximacions a l'estudi de l'especificitat de coenzim d'ADH8 corresponen als dos capítols en els que es troba organitzat aquest treball. Els objectius parcials corresponents a cadascun dels capítols són els següents:

## **Capítol I:** Resolució de l'estructura tridimensional de l'ADH8

- 1** Obtenir l'estructura general de l'ADH8 i determinar les seves propietats característiques en comparació amb d'altres ADHs d'estructura coneguda.
- 2** Caracteritzar la butxaca d'unió al NADP(H). Estudiar les diferències existents entre la zona de la proteïna responsable de la unió amb l'adenosina-fosfat i la regió equivalent en ADHs dependents de NAD(H).
- 3** Descriure la butxaca d'unió al substrat. Identificar les propietats estructurals que confereixen l'especificitat de substrat, en especial per als retinoides.

**Capítol II: Reversió de l'especificitat de coenzim de l'ADH8**

**1** Obtenció de mutants dissenyats tant a partir de l'estructura del complex ADH8-NADP<sup>+</sup> (holoenzim), com d'estructures conegudes d'holoenzims d'ADHs dependents de NAD(H).

**2** Caracteritzar cinèticament els mutants amb substitucions en la regió d'unió de l'adenosina-fosfat, utilitzant NADP(H) i NAD(H) com a coenzims. Analitzar la importància individual de cadascuna de les posicions en l'especificitat d'ADH8 per al NADP(H). Identificar possibles efectes sinèrgics, entre els diferents residus, en l'especificitat per al NADP(H).

**3** Revertir l'especificitat de coenzim de l'ADH8. Identificar els trets indispensables que ha de presentar la butxaca d'unió al coenzim per esdevenir dependent de NAD(H).

# **CAPÍTOL I**

## **RESOLUCIÓ DE L'ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE L'ADH8**

# INTRODUCCIÓ

L'ADH gàstrica de l'amfibi *Rana perezi* presenta una clara preferència per al NADP(H) com a coenzim ( $k_{cat}/K_{m_{NADP}} = 5900 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  versus  $k_{cat}/K_{m_{NAD}} = 200 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Peralba i col., 1999a). Aquest enzim exhibeix un 60 % d'identitat seqüencial amb ADHs dependents de NAD(H). Les seves analogies estructurals i funcionals amb les ADH4 de mamífer feu que inicialment se l'anomenés *ADH4-like*. La seva especificitat de coenzim única, però, dins de la subfamília de les ADHs d'animals, juntament amb la seva posició en els arbres filogenètics, suggereixen la possibilitat de que aquest enzim representi una nova classe enzimàtica, que nosaltres hem anomenat ADH8 (Peralba i col., 1999a; Duester, 2000).

El descobriment en vertebrats d'una ADH dependent de NADP(H), obre diferents interrogants sobre el paper específic de l'enzim, la seva relació estructural i evolutiva amb les altres ADHs de vertebrat, totes elles dependents de NAD(H), i la raó per a la seva singular presència en amfibis.

ADH8, com altres enzims dependents de NADP(H), participaria en el metabolisme reductiu. Degut principalment a la baixa relació  $[NADP^+]/[NADPH]$  en teixits d'amfibis (Bannister, 1967), i al fet que els aldehids són molt millors substrats, per a ADH8, que els corresponents alcohols (Peralba i col., 1999a). ADH8 podria jugar un paper significatiu en el metabolisme del retinal, car tots els isòmers de retinal assajats foren bons substrats per a aquest enzim (Peralba i col., 1999a). Particularment, l'eficiència catalítica per al tot-*trans*-retinal ( $33,8 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) és la més alta mai observada per a una ADH de vertebrat (Duester, 2000). Així, ha estat proposat que ADH8 actuaria com a retinal reductasa (Peralba i col., 1999a), convertint retinal, la principal forma de retinoide present en ous i en embrions d'amfibis, en retinol que, un cop esterificat, representa la principal forma de retinoide present en adults (Scadding i Maden, 1994; Costaridis i col., 1996).

Dins la subfamília d'ADHs d'animals, només han estat resoltes estructures d'enzims dependents de NAD(H) (Niederhut i col., 2001; Ramaswamy i col., 1996; Svensson i col., 2000; Yang i col., 1997; Sanghani i col., 2002; Xie i col., 1997). L'ADH és un enzim dimèric. Cada subunitat conté un domini catalític i un domini d'unió al coenzim. El domini d'unió al coenzim està format per 6 fulles  $\beta$  paral·leles, organitzades de manera similar a la trobada en altres deshidrogenases dependents de NAD(H) (Rossmann i col., 1974).

En aquest treball, les estructures tridimensionals de l'apoenzim d'ADH8 i del complex binari ADH8-NADP<sup>+</sup>, han estat determinades i refinades a 2,2 i 1,8 Å de resolució, respectivament. Aquestes són les primeres estructures resoltes d'una ADH dependent de NADP(H), membre de la subfamília de les ADHs d'animals. Els resultats d'aquest treball descriuen els elements de l'arquitectura molecular d'ADH8, que proporcionen la base per a l'especificitat de coenzim i de substrat d'aquest enzim d'amfibi. A més, donen suport a la classificació d'ADH8 com una nova classe d'ADH. També s'analitzen la relacions estructurals de l'ADH8 amb ADHs dependents de NAD(H), i amb poliol deshidrogenases microbianes dependents de NADP(H).

# MATERIALS I MÈTODES



## 1 CLONATGE DEL cDNA D'ADH8 EN EL VECTOR pGEX 4T-2

El cDNA d'ADH8 fou prèviament obtingut a partir de RNA poli(A)<sup>+</sup>, i clonat en el vector pBluescript II SK (+) (Peralba i col., 1999a). El present treball s'inicia amb el clonatge d'aquest cDNA en el vector d'expressió pGEX 4T-2 (Amersham Pharmacia Biotech).

### 1.1 OBTENCIÓ DEL PLASMIDI pBLUESCRIPT-ADH8

Un glicerinat d'*E. coli* que contenia el plasmidi pBluescript-ADH8 fou utilitzat per inocular 3 ml de medi LB (Luria-Bertani), amb ampicil.lina (75 µg/ml). El medi LB consta per a cada litre de: 10 g bacto-triptona, 5 g extracte de llevat, i 10 g NaCl. El pH del medi s'ajusta a 7,0 i s'esterilitza a 121 °C durant 20 min i a 1 kg/cm<sup>2</sup> de pressió. Per altra banda, la solució mare d'antibiòtic havia estat prèviament esterilitzada amb filtres de 0,22 µm (Millipore).

Els cultius es deixaren créixer a 37°C, a 200 rpm, durant 16 h. Passat aquest temps, es sedimentaren les cèl.lules per centrifugació. L'extracció del DNA plasmídic es realitzà utilitzant el *kit* GFX<sup>TM</sup> *Micro Plasmid Prep* (Amersham Pharmacia Biotech).

### 1.2 AMPLIFICACIÓ DEL cDNA DE L'ADH8

El cDNA clonat en el vector pBluescript II SK (+) fou amplificat mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Es varen utilitzar dos encebadors específics, RanaL (5'-TTATAGGATCCATGTGCACTGCGGGAAAAGAT-3') i RanaR (5'-CCACCTGAATTCTTAGTATATCATAATGCTTCG-3'). El primer oligonucleòtid presentava un seti de restricció (en negreta) per a *Bam*HI, i el segon, per a *Eco*RI. La PCR fou duta a terme en un termociclador PTC-100<sup>TM</sup> (MJ Research) utilitzant la polimerasa Expand<sup>TM</sup> High Fidelity (Roche Molecular Biochemicals). La reacció de PCR va incloure una etapa de *hot start* a 95 °C durant 1 min, desnaturalització a 94 °C durant 45 s, hibridació a 55 °C durant 1 min i extensió a 68 °C durant 12 min. Es realitzaren 11 cicles des del pas 2 fins al pas 4, i una etapa final d'extensió.

La PCR era comprovada per electroforesi en gel d'agarosa al 0,7 %, i el producte resultant purificat a partir del mateix gel utilitzant el *Concert Rapid Gel Extraction System* (Life Technologies). Un cop purificat, el cDNA va ésser doblement digerit amb *Bam*HI i *Eco*RI (Roche Molecular Biochemicals). Aquests mateixos enzims foren utilitzats per a la digestió de pGEX 4T-2. La correcta digestió del vector era comprovada per electroforesi en gel d'agarosa a l'1%. La banda corresponent al vector linealitzat era purificada de la mateixa manera que l'insert.

Finalment, es realitzà la lligació entre ambdós fragments utilitzant la DNA lligasa de T4 FLPC*pure* (Amersham Pharmacia Biotech). La reacció de lligació es va fer a 16 °C durant 16 h.

### **1.3 PREPARACIÓ DE CÈL.LULES BL21 COMPETENTS. TRANSFORMACIÓ AMB EL PLASMIDI pGEX - ADH8**

Per preparar cèl.lules competents (permeabilització de la paret i de la membrana de les cèl.lules) s'inoculà medi LB amb un glicerinat comercial de cèl.lules BL21. El cultiu es va incubar a 37 °C, a 300 rpm, durant 16 h. Passat aquest temps, 100 ml de LB fresc eren inoculats amb 1 ml del cultiu anterior. Aquest nou cultiu s'incubava també a 37 °C i 300 rpm, però durant 4-5 h, temps necessari per obtenir uns valors de densitat òptica de 0,45-0,55. El cultiu, en fase de creixement exponencial, es transferí a un tub estèril, incubant-se en bany de gel durant 15 min. Les cèl.lules foren sedimentades per centrifugació a 4000xg a 4 °C durant 10 min. El sobrenedant era descartat, i el sediment era resuspès amb 50 ml d'una solució estèril de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M. La resuspensió cel.lular era incubada novament en bany de gel durant 15 min, les cèl.lules sedimentades en les condicions anteriors, i el sediment cel.lular resuspès amb 3,5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M. Les cèl.lules competents eren aliquidades (200 µl) i conservades a - 80 °C, en presència de glicerol 15 %, fins a la seva utilització.

Per realitzar la transformació de les cèl.lules BL21 competents amb el plasmidi pGEX-ADH8, s'afegiren 10 µl de la barreja de lligació a una aliquidada de BL21. Les cèl.lules es deixaren incubar en bany de gel durant 30 min. Seguidament s'aplicà un xoc tèrmic a 42°C durant 90 s, i tot seguit, la mostra es transferia a un bany de gel durant 2 min. Passat aquest temps, s'agegí 1 ml de LB al tub, permetent la recuperació de les

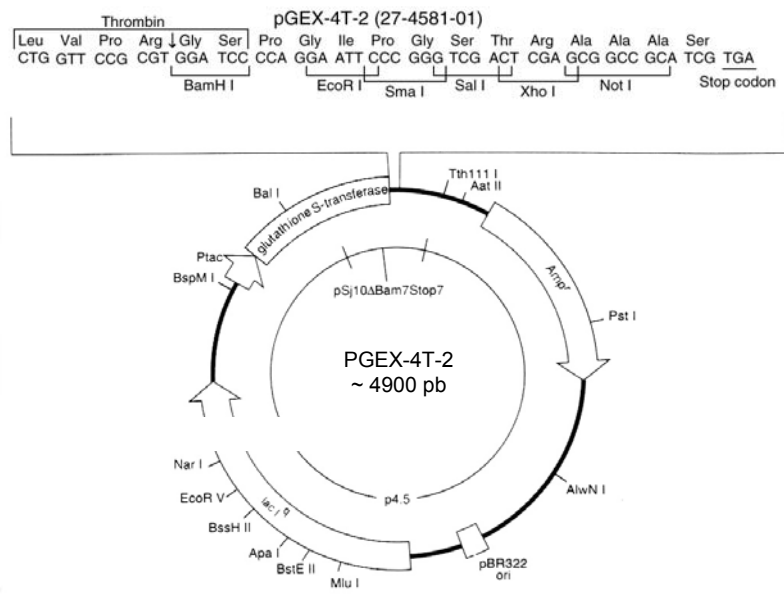
cèl.lules durant 1 h a 37 °C i 200 rpm. Transcorregut aquest període es sedimentaren les cèl.lules a 4000xg, a 4 °C, durant 15 s. El sediment cel.lular fou resuspès amb 100 µl de LB, i fou utilitzat per a sembrar plaques de LB-agar amb 75 µg/ml d'ampicil.lina. Aquestes es deixaren a 37 °C durant 12-18 h fins que les colònies es feren visibles.

#### 1.4 ANÀLISI DELS TRANSFORMANTS I SELECCIÓ DELS CLONS

Les diferents colònies crescudes en les plaques de LB-agar eren utilitzades per inocular 5 ml de medi LB líquid amb ampicil.lina 75 µg/ml. Els cultius es cultivaren a 37 °C i 300 rpm en un incubador orbital durant 16 h. Passat aquest temps, 3 ml foren utilitzats per realitzar l'extracció de DNA plasmídic amb el *kit* GFX<sup>TM</sup> *Micro Plasmid Prep*. El DNA plasmídic obtingut era doblement digerit amb *Bam*HI i *Eco*RI per comprovar la presència del cDNA d'ADH8 clonat. Es prepararen glicerinars de cadascuna de les colònies positives. Per fer-ho, s'utilitzaren 800 µl del corresponent cultiu, afegint glicerol a una concentració final del 15 %. Aquets glicerinars es guardaren a -80 °C fins al moment de la seva utilització.

## 2 EXPRESSIÓ HETERÒLOGA I PURIFICACIÓ DE L'ADH8

L'expressió i la purificació es realitzaren utilitzant el *GST Gene Fusion System* (Amersham Pharmacia Biotech). Aquest mètode es basa en l'ús del vector pGEX 4T-2 (Fig. 8). Gràcies a les característiques d'aquest plasmidi, l'enzim s'expressa en forma de proteïna de fusió amb la glutatió S-transferasa (GST). La posterior utilització de la reïna Glutatió Sepharose 4B, que presenta afinitat per la GST, permet l'aïllament de la proteïna de fusió. Finalment, i aprofitant la presència d'una diana per a trombina (Fig. 8), la digestió amb aquesta proteasa permet la separació de l'ADH8 de la GST, deixant únicament dos residus addicionals (Gly i Ser) a l'extrem N-terminal.



**Figura 8.** Estructura del vector *pGEX-4T-2*. En l'esquema es troben representades les principals característiques, detallant-se la seqüència del lloc de clonatge múltiple.

## 2.1 PREPARACIÓ DEL MEDI DE CULTIU

El medi utilitzat per a l'expressió d'ADH8 fou el 2xYT. Consta, per cada litre, de: 16 g bacto-triptona, 10 g extracte de llevat, i 5 g NaCl. El pH del medi s'ajusta a 7,0 i s'esterilitza a 121 °C durant 20 min i a 1 kg/cm<sup>2</sup> de pressió.

Un cop esterilitzat s'afegeix ampilicilina a una concentració final de 75 µg/ml. La solució mare d'antibiòtic havia estat prèviament esterilitzada utilitzant filtres de 0,22 µm.

## 2.2 EXPRESSIÓ

A partir dels glicerins de BL21 que contenen el plasmidi pGEX-ADH8, s'inoculà un primer cultiu de 30 ml de 2xYT amb 75 µg/ml d'ampilicilina. Aquest cultiu es deixà créixer a 37 °C i 300 rpm durant 16 hores. Passat aquest temps, el cultiu fou utilitzat per inocular 3 litres de 2xYT (dilució 1:100), amb 75 µg/ml d'ampilicilina. Les cèl·lules es cultivaren a 23°C i 300 rpm fins a obtenir valors d'absorbància a 600 nm de 0,8-1,0. En aquest moment, s'induí l'expressió d'ADH8 amb l'addició d'isopropil-β-D-tiogalactòsid, a una concentració en el cultiu de 0,1 mM. La inducció es realitzà a 23 °C i 300 rpm durant 15 h. Un cop finalitzada l'expressió, el cultiu fou centrifugat a 12400 x g

a 4 °C durant 20 min. El sediment cel.lular resultant era conservat a -80 °C fins a la seva utilització.

### 2.3 RESUSPENSIO I LISI CEL.LULAR

El primer pas consistí en la resuspensió dels sediments bacterians amb tampó fosfat salí (1x PBS:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,3). Concretament, es realitzà utilitzant 100 ml de tampó per cada litre de cultiu. Aquest pas fou realitzat a 4 °C, i en presència de ditiotretitol (DTT) en el tampó a una concentració de 2,5 mM. Les cèl.lules, un cop resuspeses, foren tractades amb lizozim (1 mg per ml de resuspensió) durant 30 min a 4 °C, i sotmeses a 10 cicles de sonicació amb un sonicador Sonifer 454 (Branson). Per eliminar la viscositat originada pel DNA, les cèl.lules foren incubades amb DNasa bovina durant 30 min a 4 °C. Finalment, per permetre una millor solubilització de la proteïna de fusió, la mostra va ésser incubada amb Triton X-100 1 % (v/v) durant 30 min a 4 °C. L'obtenció de la fracció de proteïna soluble es realitzà centrifugant el lisat bacterià a 12.000 x g durant 15 min a 4 °C.

### 2.4 PURIFICACIÓ DE L'ADH8

El sobrenedant resultant de la centrifugació anterior era incubat amb la reïna Glutatió Sepharose 4B (2 ml de matriu al 50% (v/v) per cada litre de cultiu bacterià), a temperatura ambient durant 90 min i amb agitació. Passat aquest temps, la suspensió fou centrifugada a 500 x g durant 5 min a 4 °C, descartant-se el sobrenedant. Per eliminar restes del lisat bacterià, la matriu amb la proteïna de fusió unida va ésser rentada. Per fer-ho, s'afegien a la reïna 10 volums de 1xPBS amb DTT 2,5 mM, deixant-se en agitació durant 10 min a temperatura ambient. Seguidament, es centrifugava a 500 x g durant 5 min a 4 °C. Aquest procés es realitzà 3 vegades.

Per separar l'ADH8 de la GST, la proteïna de fusió unida a la matriu fou digerida amb trombina (50 U per cada litre de cultiu bacterià). Aquesta digestió fou duta a terme en tampó 1xPBS amb DTT 2,5 mM, amb agitació i durant 15 h a temperatura ambient.

Un cop finalitzada, la suspensió va ésser centrifugada a 500 x g durant 5 min a 4°C. El sobrenedant resultant contenia l'ADH8 lliure de GST. Degut a que la digestió amb trombina s'havia de fer a temperatura ambient, i l'ADH8 no es mostrava totalment estable en aquestes condicions, es realitzà una segona cromatografia d'afinitat per a separar l'enzim actiu de la fracció inactiva. La reïna utilitzada en aquest segon pas fou la Red Sepharose CL-6B (Amersham Pharmacia Biotech). Aquesta matriu, presenta unit covalentment a la Sepharose CL-6B el lligand Procion RED HE-3B, que estructuralment és molt semblant als dinucleòtids de nicotinamida-adenina, mostrant enzims dependents de NADP(H) una especial afinitat per aquest lligand. La proteïna fou llavors concentrada i emmagatzemada a - 80°C.

Aquesta segona cromatografia d'afinitat es realitzà amb tampó fosfat monosòdic/NaOH 10 mM, DTT 2,5 mM, pH 6,5. Així doncs, es canvià per centrifugació el tampó 1xPBS en el que es trobava la mostra, utilitzant els tubs Centricon Plus-20 (Millipore). Un cop la proteïna es trobava en les condicions adients, s'incubava la mostra amb la Red Sepharose (1 ml de reïna al 75 % per a cada 3,5 mg de proteïna activa), amb agitació, a 4 °C i durant 90 min. Passat aquest temps, la suspensió fou centrifugada a 500 x g durant 5 min a 4 °C, descartant-se el sobrenedant. La matriu amb l'ADH8 unida va ésser rentada amb 5 volums de tampó fosfat monosòdic amb DTT 2,5 mM, deixant-se en agitació durant 10 min a temperatura ambient. Seguidament, es centrifugava a 500 x g durant 5 min a 4 °C. Aquest procés es dugué a terme 3 vegades.

L'elució d'ADH8 es realitzà incubant la reïna amb 5 volums de NaCl 0,6 M, amb agitació, a 4 °C i durant 10 min. Seguidament, la suspensió era centrifugada a 500 x g durant 5 min a 4 °C, recuperant-se el sobrenedant. El procés d'elució es realitzava tres vegades amb l'objectiu de recuperar la major quantitat d'enzim possible. La mostra es va concentrar per centrifugació, utilitzant els tubs Centricon Plus-20 (Millipore), fins a 12 mg/ml. La concentració de proteïna va ésser determinada per el mètode del Coomassie-Blue (Bradford, 1976), utilitzant albúmina de sèrum boví (BSA) com a patró. Es determinà també l'activitat estàndard d'ADH8 en aquesta fracció, calculant-se l'activitat específica de l'enzim (U/mg de proteïna).

La puresa d'aquesta fracció va ésser comprovada per electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), en un sistema de minigel vertical (Bio-Rad, Miniprotein III), de 0,5 mm de gruix i amb un 11 % d'acrilamida. Les bandes de

proteïna foren revelades per tinció del gel amb Coomassie Brilliant Blue R250 (Bio-Rad).

L'ADH8 pura fou utilitzada pel grup *Estructura tridimensional de proteïnes implicades en processos patològics* (CSIC), dirigit pel Dr. Ignacio Fita, per a la cristal·lització de l'apoenzim d'ADH8 i del complex binari ADH8-NADP<sup>+</sup>. L'estructura tridimensional de l'apoenzim d'ADH8 fou resolta per reemplaçament molecular, utilitzant com a model les coordenades de l'ADH1B1 humana (Hurley i col., 1991), enzim amb el que ADH8 mostra una identitat seqüencial del 60% (Peralba i col., 1999a). Per altra banda, les coordenades de l'estructura de l'apoenzim d'ADH8 foren utilitzades per a la resolució del complex binari ADH8-NADP<sup>+</sup>.

### 3 ASSAJOS ENZIMÀTICS

#### 3.1 MESURA DE L'ACTIVITAT ADH

L'activitat ADH fou determinada espectrofotomètricament a 25 °C, monitoritzant el canvi d'absorbància a 340 nm amb un espectrofotòmetre VARIAN, Cary 400 Bio. Una unitat d'activitat enzimàtica (U) correspon a 1 μmol de NADPH utilitzat per minut, tenint en compte que el coeficient d'extinció molar del NADPH a 340 nm és de 6620 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Les mesures es realitzaren utilitzant cubetes de 1 cm de pas òptic.

L'activitat estàndard de l'ADH8 es mesurà utilitzant etanol 1M com a substrat, i NADP<sup>+</sup> 1,2 mM com a coenzim, en tampó glicina/NaOH 0,1 M, pH 10.

#### 3.2 DETERMINACIÓ DE LES CONSTANTS CINÈTIQUES PER AL GLICEROL

El seti actiu del complex ADH8-NADP<sup>+</sup> presentava una molècula de glicerol unida. Per poder considerar o refusar el glicerol com a substrat fisiològic de l'enzim, determinarem les constants cinètiques d'ADH8 per a aquest alcohol. L'activitat glicerol deshidrogenasa es mesurà utilitzant glicerol com a substrat (0,1, 0,5, 2 i 4 M), i NADP<sup>+</sup> 1,2 mM com a coenzim, en tampó glicina/NaOH 0,1 M, pH 10. Per a cada concentració

de glicerol, es feren dues mesures. Les dades es tractaren utilitzant el programa GRAFIT 5.0 (Erithacus Software Ltd.)

### **3.3 INHIBICIÓ DE L'ACTIVITAT ETANOL DESHIDROGENASA AMB GLICEROL**

L'estructura de l'apoenzim presentava una molècula de glicerol que interaccionava amb el seti d'unió al coenzim. Amb l'objectiu d'estudiar si es produïa algun tipus de competició entre el glicerol i el NADP<sup>+</sup>, es mesurà l'activitat etanol deshidrogenasa de l'ADH8 amb etanol 1 M i NADP<sup>+</sup> 50 µM (Km a pH 10), sense glicerol i amb glicerol 50 µM, 100 µM i 500 µM. Les activitats es van determinar per duplicat, i en tampó glicina/NaOH 0,1 M, pH 10.



# RESULTATS I DISCUSSIÓ

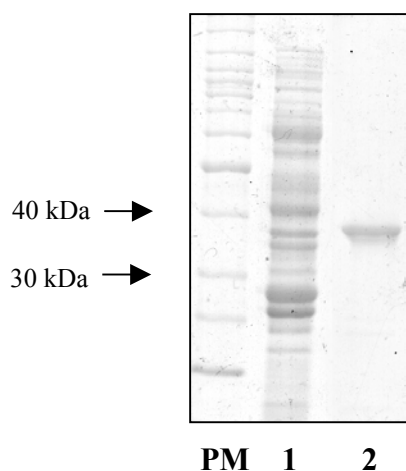
## 1 EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE L'ADH8

La inducció de l'expressió d'ADH8 en 3 l de cultiu originà 127 mg d'aquest enzim a l'homogenat (Taula 10). Es varen obtenir 5,1 mg de proteïna pura després de les dues etapes de purificació, amb un rendiment final del 4 % (Taula 10). L'activitat específica de l'ADH8 recombinant fou de 20,4 U/mg, valor molt proper al de l'enzim purificat a partir d'estómac de *Rana perezi* (20,9 U/mg; Peralba i col, 1999a). L'ADH8 pura fou concentrada fins a 12 mg/ml. Aquesta mostra fou l'utilitzada pel grup *Estructura tridimensional de proteïnes implicades en processos patològics* (CSIC), dirigit pel Dr. Ignacio Fita, per a la cristal·lització de l'apoenzim ADH8 i del complex binari ADH8-NADP<sup>+</sup>.

**Taula 10** Purificació de l'ADH8 recombinant

Etapa	ADH8 (mg)	Activitat total (U)	Rendiment (%)
Homogenat	127	2596	100
Glutatió-Sepharose	14,6	298	11,5
Red Sepharose	5,1	104	4

L'activitat fou mesurada a pH 10, amb etanol 1 M i NADP<sup>+</sup> 1,2 mM.



**Figura 9.** Anàlisi de les fraccions obtingudes durant la purificació de l'ADH8 recombinant. Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS. Les bandes de proteïna es van visualitzar per tinció amb Coomassie Brilliant Blue. Carrils:

**PM:** Marcador de pes molecular  
**1:** Homogenat  
**2:** Red-Sepharose

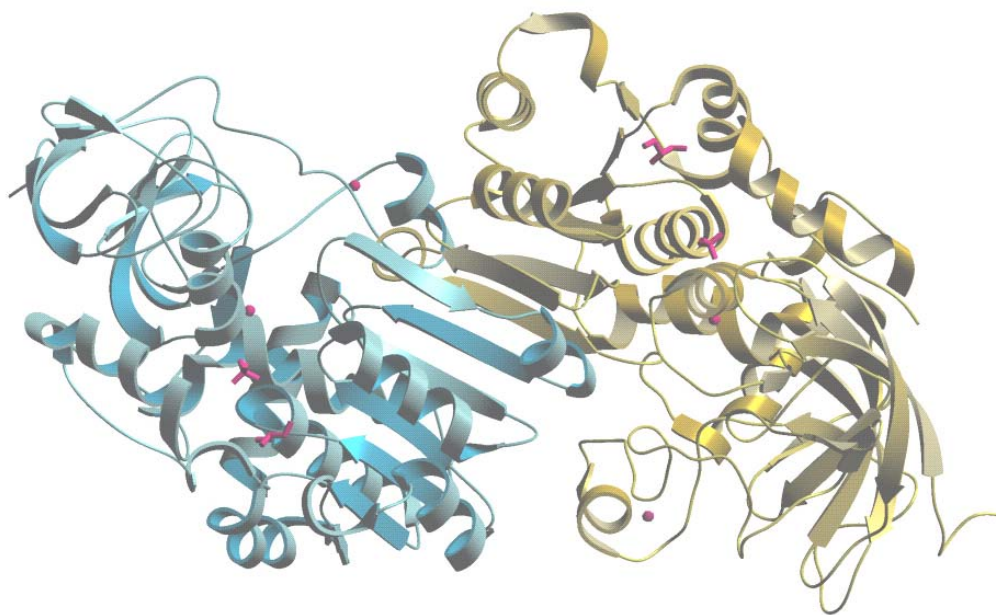
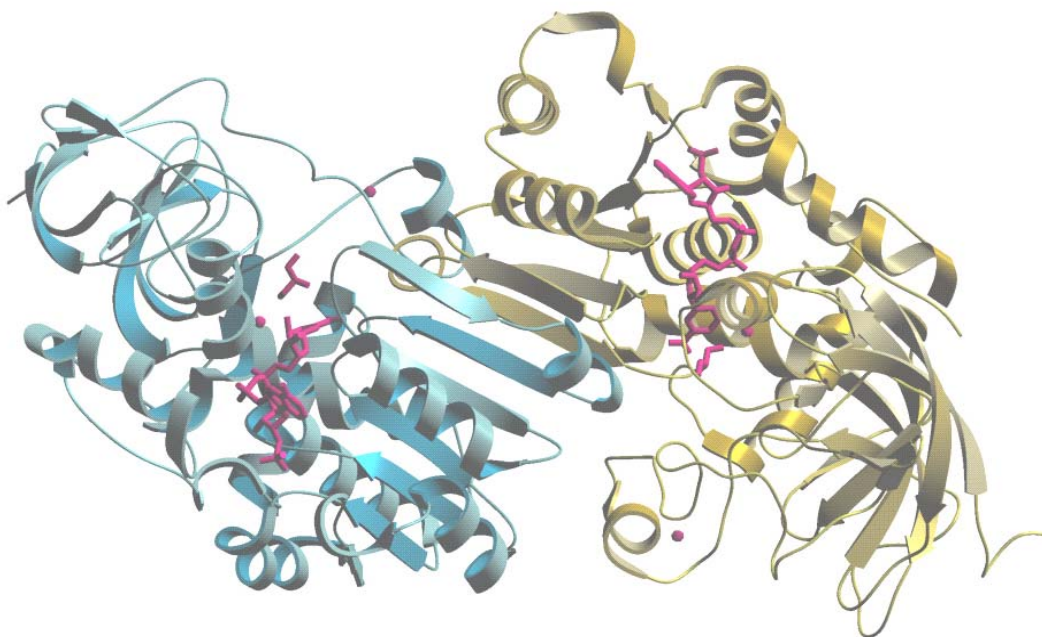
Les estructures de l'apoenzim ADH8 i del complex ADH8-NADP<sup>+</sup> es varen resoldre a 2,2 i 1,8 Å, respectivament. L'apoenzim presentà, en el domini d'unió del coenzim, una molècula de glicerol provinent del *cryobuffer* utilitzat en el procés de cristallització, i una molècula de fosfat, provinent probablement del tampó fosfat monosòdic utilitzat durant la purificació. Per altra banda, la resolució del complex ADH8-NADP<sup>+</sup> mostrà una molècula de glicerol a l'interior de la butxaca d'unió al substrat.



**Figura 10.** Fotografia dels cristalls de l'ADH8. Tant els cristalls de l'apoenzim com del complex ADH8-NADP<sup>+</sup> foren monoclíncics, i d'unes dimensions aproximades de 0,2 x 0,2 x 0,3 mm.

## 2 ESTRUCTURA GENERAL DE L'ADH8

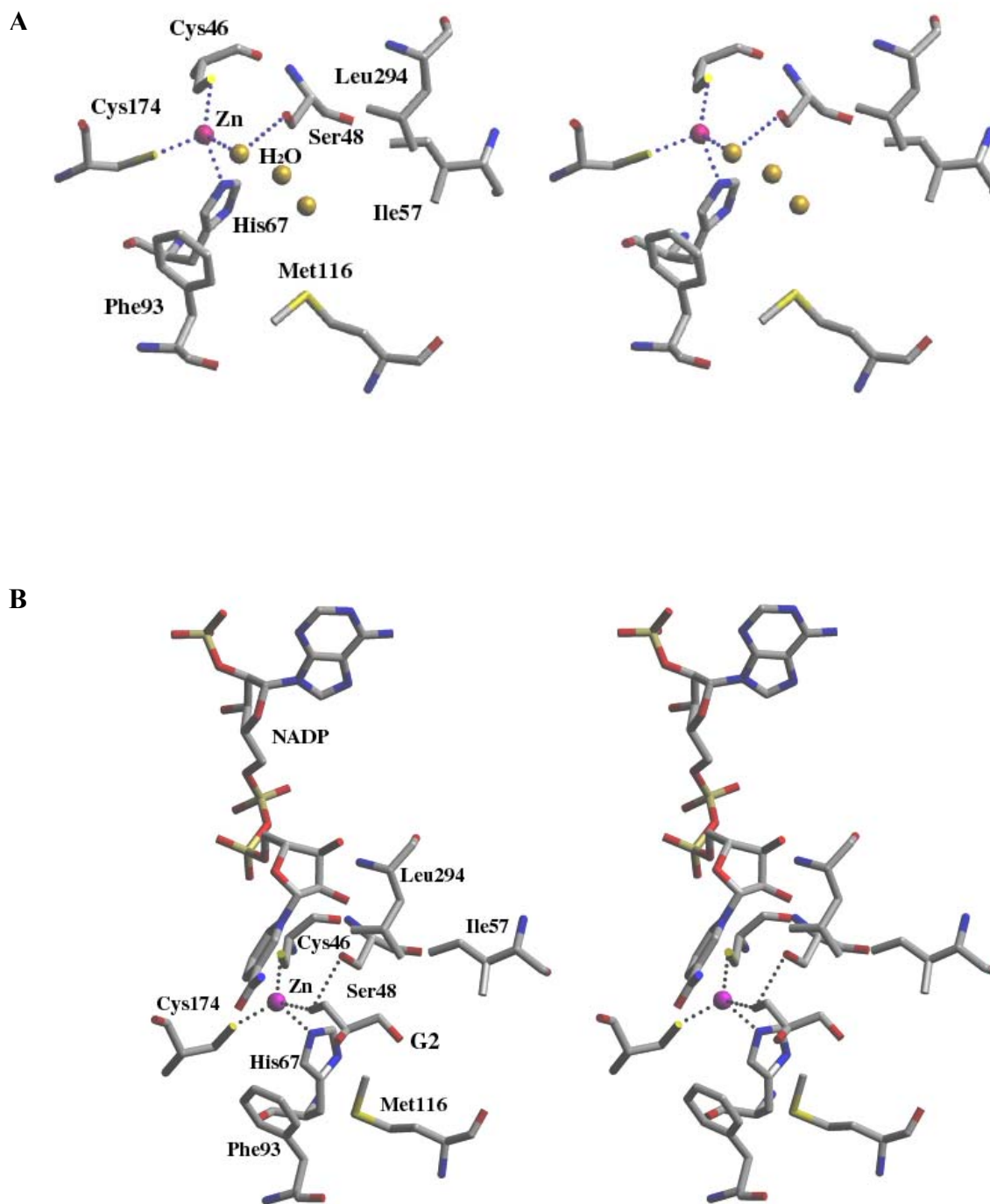
ADH8 presenta una organització dimèrica, on cada monòmer consta de 372 residus (Fig. 11). Cadascuna de les subunitats mostra un domini catalític organitzat en dues regions, del residu Met1 a Gly175 i de Lys320 a Tyr374, i un domini d'unió al coenzim, del residu Phe176 a Phe319 (la numeració dels residus utilitzada en la memòria correspon a l'ADH1 de cavall). Les dues subunitats presenten la mateixa estructura. La seva superposició mostrà una r.m.s.d. (*root mean square deviation*), entre els àtoms C<sup>α</sup> dels dos monòmers, de 0,23 Å per a l'apoenzim, i de 0,19 Å per al complex binari. Les lleugeres diferències entre ambdues subunitats es concentren en dos llaços del domini catalític accessibles al solvent, Asn242-Lys248, i particularment Ser363-Val368.

**A****B**

**Figura 11.** Estructura general de l'ADH8. En blau i groc es representen les dues subunitats. Els dos àtoms de zinc de cada subunitat s'indiquen com a dues esferes porpres. **A** Apoenzim: en magenta es representen les molècules de glicerol i fosfat ubicades en el seti d'unió al coenzim. **B** Complex ADH8-NADP<sup>+</sup>: En magenta es representen el glicerol ubicat en la butxaca d'unió al substrat, i el NADP<sup>+</sup> unit en el seu domini d'unió.

ADH8, malgrat mostrar una identitat seqüencial únicament del 50-60% amb les ADHs dependents de NAD(H) cristal·litzades fins al moment, presenta una arquitectura general altament conservada respecte aquests enzims: ADH1 de cavall (Eklund i col., 1976), ADH1A, ADH1B1, ADH1B2, ADH1B3 i ADH1C2 humanes (Hurley i col., 1994; Niederhut i col., 2001), ADH1 de bacallà (Ramaswamy i col., 1996), ADH2 de ratolí (Svensson i col., 2000), i ADH3 i ADH4 humanes (Xie i col., 1997; Yang i col., 1997). Aquest fet indicaria que tant l'especificitat de coenzim com de substrat d'ADH8, serien el resultat de característiques topològiques locals dels setis d'unió al coenzim i al substrat respectivament.

ADH8 conté dos àtoms de zinc per subunitat, en posicions equivalents a les trobades en les restants alcohol deshidrogenases de vertebrat que han estat cristal·litzades (Fig. 11). El zinc estructural mostra una coordinació tetraèdrica regular amb els residus Cys97, Cys100, Cys103 i Cys111, tots ells altament conservats en les ADHs (Sun i Plapp, 1992). Per altra banda, el zinc catalític presenta una coordinació tetrahèdrica amb els residus Cys46, His67 i Cys174 i, en l'apoenzim, amb una molècula d'aigua (Fig. 12A). Aquest resultat coincideix amb l'observat en els dos únics apoenzims resoltos anteriorment, ADH1 de cavall i ADH3 humana (Eklund i col., 1976; Sanghani i col., 2002), i en diferents complexos binaris ADH-NAD<sup>+</sup> (Svensson i col., 2000; Niederhut i col., 2001). En el complex ADH8-NADP<sup>+</sup>, es manté la coordinació del zinc catalític amb els residus anteriorment esmentats, però la molècula d'aigua és reemplaçada per una molècula de glicerol, generant-se de fet un complex ternari ADH8-NADP<sup>+</sup>-glicerol (Fig. 12B). Així doncs, el glicerol simularia la posició d'un substrat durant la catàlisi: interacciona a través de l'oxigen del grup hidroxil amb el Zn catalític, desplaça la molècula d'aigua, i la substitueix com a lligand de coordinació. Recentment, ha estat resolt un complex ternari de l'ADH1 de cavall amb una resolució de 1 Å, en el que es mostra que el zinc catalític, durant la catàlisi, es trobaria pentacoordinat, essent el cinquè lligand una molècula d'aigua que al mateix temps estaria unida al coenzim (Meijers i col., 2001). Els nostres resultats, però, suggereixen que la catàlisi en ADH8 es realitzaria en un entorn totalment anhidre. Aquesta mateixa conclusió es desprèn dels resultats obtinguts en la resolució d'altres complexos ternaris d'ADHs, on cap molècula d'aigua interacciona amb el Zn catalític (Ramaswamy i col., 1994; Xie i col., 1997; Svensson i col., 2000).

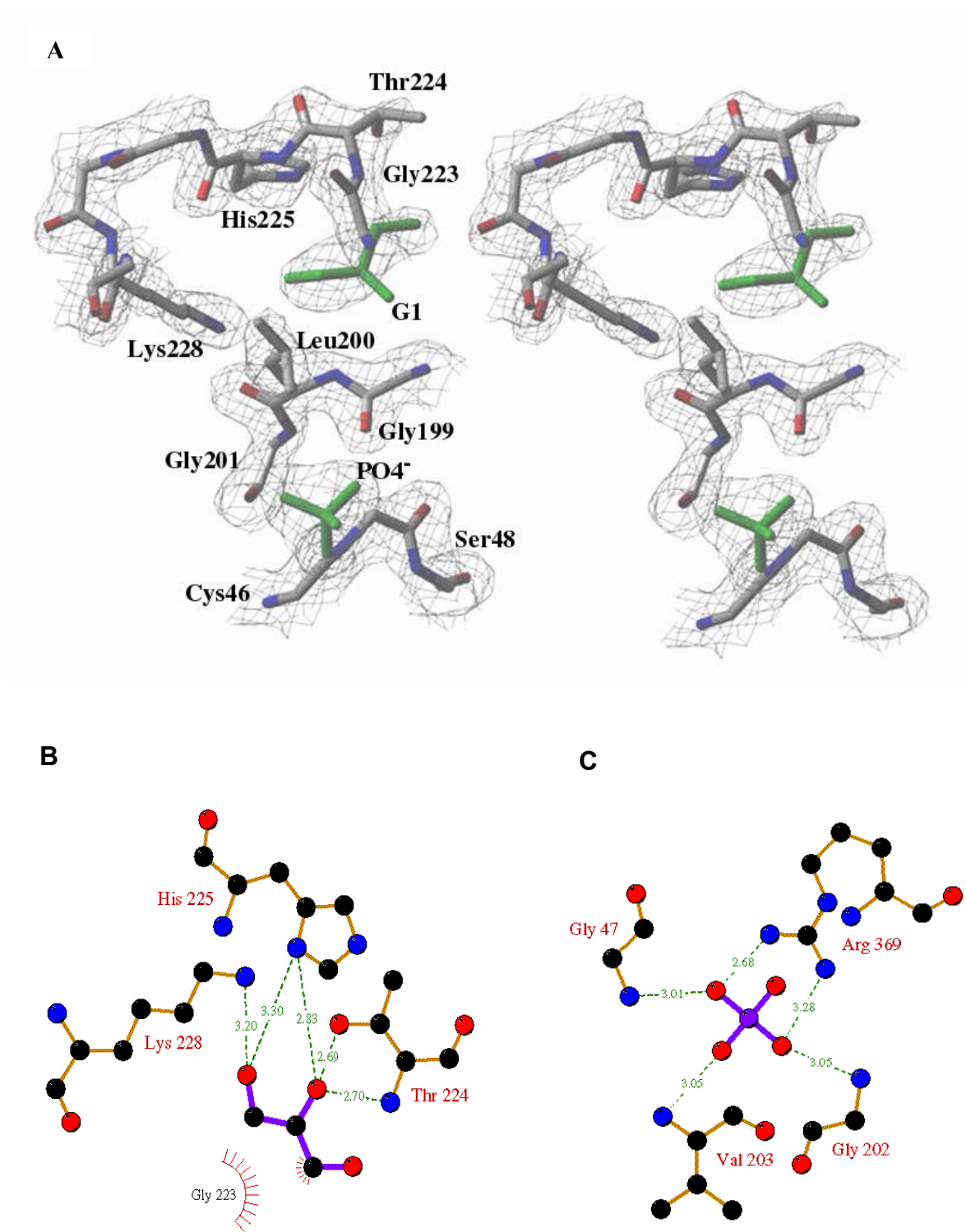


**Figura 12.** *Estereodiagrames del centre actiu de l'apoenzim d'ADH8 (A) i del complex ADH8-NADP<sup>+</sup> (B).* Les interaccions de coordinació realitzades pel zinc catalític (esfera porpra) s'indiquen amb línies discontinües. Les molècules d'aigua ubicades a l'apoenzim es representen amb esferes grogues. Per altra banda, també es representen el NADP<sup>+</sup> i la molècula de glicerol (G2) en el complex ADH8-NADP<sup>+</sup>.

### 3 CANVI CONFORMACIONAL

En les ADHs, la forma dels cristalls sembla estar relacionada amb el tipus de conformació de l'enzim. L'apoenzim de l'ADH1 de cavall, amb conformació oberta, origina cristalls ortoròmbics (Eklund i col., 1976). En canvi, complexos binaris i ternaris d'altres ADHs, amb conformacions tancades, generen cristalls monoclíncics i, menys freqüentment, triclíncics (Eklund i col., 1981; Ramaswamy i col., 1994a). El fet que tant els cristalls de l'apoenzim com els del complex ADH8-NADP<sup>+</sup> siguin monoclíncics, podria indicar que la conformació d'ambdues estructures és semblant.

La posició relativa del dominis catalític i d'unió al coenzim en l'apoenzim i en el complex ADH8-NADP<sup>+</sup> és força similar. La superposició de les dues estructures mostra una r.m.s.d. entre els àtoms C<sup>α</sup> de 0,64 Å. En ambdós casos, la conformació d'ADH8 és semblant a la definida com a tancada en complexos ternaris d'ADH1 i ADH4 (Al-Karadaghi i col., 1994; Xie i col., 1997). La conformació tancada de l'apoenzim d'ADH8 podria ser deguda a la presència en la butxaca d'unió al coenzim, d'un grup fosfat i d'una molècula de glicerol (Fig. 13A). El glicerol interacciona amb els residus Thr224, His225 i Lys228 (Fig. 13B), implicats en el complex ADH8-NADP<sup>+</sup>, en la unió del fosfat esterificat en el grup hidroxil 2' de la ribosa del nucleòtid d'adenina (Fig. 17; Taula 12). Per altra banda, el grup fosfat interacciona amb els residus Gly47, Gly202, Val203 i Arg369 (Fig. 13C), involucrats en el complex ADH8-NADP<sup>+</sup>, en la unió del pirofosfat (Fig. 17; Taula 12). Així, la interacció d'aquestes dues molècules amb el seti d'unió del coenzim, en l'apoenzim, mimetitzaria parcialment la unió del NADP(H). Això hauria provocat el pas d'una teòrica conformació oberta de l'apoenzim a una conformació tancada, equivalent a la presentada pel complex ADH8-NADP<sup>+</sup>. A l'ADH1 de cavall, però, l'ADP i anàlegs del NAD amb el grup carboxamida de l'anell de nicotinamida modificat no generen el canvi conformacional. Això suggereix que les interaccions del grup carboxamida amb la proteïna serien les responsables del canvi conformacional, i no les interaccions amb l'adenosina i el pirofosfat del coenzim (Abdallah i Roby, 1975; Samama i col., 1977). Per tant, la resolució de l'apoenzim ADH8, sense cap lligand en el seti d'unió del coenzim, serà necessària per corroborar o refusar la implicació de les interaccions adenosina-proteïna i/o pirofosfat-proteïna en la generació del canvi conformacional.



**Figura 13.** Estereodiagrama de la butxaca d'unió del coenzim en l'apoenzim (A). En verd es representen les molècules de glicerol i fosfat que hi són presents. Representacions amb el programa LIGPLOT (Wallace i col., 1995) de les interaccions del glicerol (B) i del fosfat (C) amb residus de la butxaca d'unió del coenzim.



Per altra banda, la presència simultània d'una molècula de glicerol i d'un grup fosfat en l'estructura de l'apoenzim suggereix que l'afinitat per al fosfat és més baixa a la butxaca d'unió al fosfat addicional del NADP(H) que en el seti d'unió al pirofosfat. És també interessant destacar que les interaccions que mostra el glicerol en la butxaca d'unió al fosfat addicional del NADP(H) corresponen a les que podria realitzar un alcohol primari. Per tant, es podria produir competició entre el fosfat addicional del NADP(H) i alcohols, podent existir algun tipus de regulació a aquest nivell de l'activitat de l'enzim. Tot i això, assajos d'activitat etanol deshidrogenasa en presència de glicerol (0-500 mM), no mostraren cap tipus d'inhibició.

#### **4 SISTEMA DE TRANSMISSIÓ DEL PROTÓ**

En ADH8, com en ADH1 i ADH4, la catàlisi es produeix en una conformació totalment tancada (Colonna-Cesari i col., 1986; Hurley i col., 1994; Xie i col., 1997; Niederhut i col., 2001), en la que el seti actiu no és accessible al solvent. Durant la reacció d'oxidació catalitzada per l'ADH, es produeix la desprotonació del grup hidroxil de l'alcohol. El protó resultant ha d'ésser conduït fins al solvent. La resolució de l'estructura de diferents ADHs (Eklund i col., 1976; Eklund i col., 1987; Hurley i col., 1994; Yang i col., 1997), així com estudis de mutagènesi dirigida (Ehrig i col., 1991; Davis i col., 1994), han permès identificar els components d'un sistema de transmissió de protons que facilitaria la sortida del protó cap al solvent. Aquest sistema està format per una xarxa de ponts d'hidrogen en la que intervenen el grup hidroxil del residu 48 (Ser/Thr), el grup hidroxil 2' de la ribosa de la nicotinamida del coenzim, i l'imidazol de His47 o His51. Aquest darrer residu actuaria com a donador de protons al solvent en reaccions d'oxidació, i com a acceptor en reaccions de reducció.

Els residus implicats en la via de transmissió del protó no només es troben força conservats en les alcohol deshidrogenases d'animals (Sun i Plapp, 1992), sinó que també ho estan en les diferents famílies de deshidrogenases/reductases de cadena mitjana (MDR, Taula 11).

**Taula 11.** Residus implicats en la via de transmissió del protó en diferents MDR.

Família	Espècie/ enzim	Posició 48 <sup>a</sup>	Posició 47 <sup>a</sup>	Posició 51 <sup>a</sup>
<b>ADH</b>	<i>Rpe</i> /ADH1	Ser	Arg	His
	<i>Gca</i> /ADH1	Thr	His	Tyr
	<i>Eca</i> /ADH1	Ser	Arg	His
	<i>Hsa</i> /ADH1B	Thr	Arg	His
	<i>Sca</i> /ADH2	Thr	Arg	His
	<i>Hsa</i> /ADH2	Thr	His	Thr
	<i>Dme</i> /ADH3	Thr	His	Phe
	<i>Hsa</i> /ADH3	Thr	His	Thr
	<i>Rno</i> /ADH4	Thr	Gly	His
	<i>Hsa</i> /ADH5	Thr	Gly	Lys
	<i>Gdo</i> /ADH7	Thr	His	His
	<i>Rpe</i> /ADH8	Ser	Gly	Ser
	<i>Atha</i> /ADH	Thr	His	Tyr
	<i>Zma</i> /ADH	Thr	His	Tyr
	<i>Ppu</i> /BADH	Thr	His	Val
<b>PDH</b>	<i>Tbr</i> /ADH	Ser	Gly	His
	<i>Cbe</i> /ADH	Ser	Thr	His
	<i>Hsa</i> /SDH	Ser	Gly	His
	<i>Eco</i> /TDH	Ser	Thr	His
<b>CAD</b>	<i>Atha</i> /CAD	Thr	His	His
	<i>Xfas</i> /CAD	Thr	His	His
	<i>Sce</i> /ADHVI	Ser	Gly	His
<b>Y-ADH</b>	<i>Sce</i> /ADHI	Thr	His	His
	<i>Spo</i> /ADH	Thr	His	His
	<i>Ani</i> /ADHI	Thr	His	His
<b>QOR</b>	<i>Cpo</i> /ξ-cristal.lina	Val	Pro	Tyr
	<i>Eco</i> /QOR	Ser	Arg	Tyr

*Rpe*: *Rana perezi*; *Gca*: *Gadus callarius*; *Eca*: *Equus caballus*; *Hsa*: *Homo sapiens*; *Sca*: *Struthio camelus*; *Dme*: *Drosophila melanogaster*; *Rno*: *Rattus norvegicus*; *Gdo*: *Gallus domesticus*; *Atha*: *Arabidopsis thaliana*; *Zma*: *Zea mays*; *Ppu*: *Pseudomonas putida*; *Tbr*: *Thermoanaerobacter brockii*; *Cbe*: *Clostridium beijerinckii*; *Eco*: *Escherichia coli* *Xfas*: *Xilella fastidiosa* *Sce*: *Saccharomyces cerevisiae*; *Spo*: *Schizosaccharomyces pombe*; *Ani*: *Aspergillus nidulans*; *Cpo*: *Cavia porcellus*. Enzims: **ADH**: alcohol deshidrogenasa; **BADH**: benzil alcohol deshidrogenasa; **SDH**: sorbitol deshidrogenasa; **TDH**: treonina deshidrogenasa; **CAD**: cinamil alcohol deshidrogenasa; **QOR**: quinona oxidoreductasa. <sup>a</sup> La numeració dels residus correspon a l'ADH1 de cavall.

ADH8 en canvi, malgrat conservar el residu en la posició 48 (Ser), presenta les substitucions His/Gly47 i His/Ser51 (Peralba i col., 1999a). Així, en ADH8, es produiria una via alternativa en la transmissió del protó. La resolució del complex ADH8-NADP<sup>+</sup> ens ha permès identificar els seus components. En aquesta estructura, el glicerol interactua amb el grup hidroxil de Ser48, que al mateix temps connecta amb el grup hidroxil de la ribosa de la nicotinamida del NADP<sup>+</sup>. Però la distància entre aquest grup i l'hidroxil de Ser51 és massa gran per a permetre una transferència eficient del protó. Aquest buit és ocupat en ADH8 per una molècula d'aigua, que permetria el pas del protó del coenzim a Ser51, produïnt-se així la connexió del seti actiu amb el solvent. Ser51 podria realitzar la mateixa funció que His47 o His51, actuant com a donador/acceptor de protons. Una estratègia semblant ha estat descrita a partir de l'estructura resolta de l'ADH2 de ratolí, presentant també aquest enzim una molècula d'aigua entre el grup hidroxil de la ribosa de la nicotinamida i la posició 51, que en aquest cas no és Ser sinó Asn (Svensson i col., 2000).

## 5 BUTXACA D'UNIÓ DEL SUBSTRAT

La butxaca d'unió al substrat d'ADH8 pot ser descrita, com en altres ADHs, com una cavitat cilíndrica d'aproximadament 7 Å de diàmetre, i 16 Å de longitud, des de la superfície de la molècula fins al zinc catalític. Com ja s'ha comentat anteriorment, en el cristall del complex ADH8-NADP<sup>+</sup>, una molècula de glicerol es troba unida al zinc catalític. La distància entre el zinc i el grup hidroxil del glicerol és l'adient per a que es produeixi la catàlisi. De fet, l'enzim mostrà activitat amb glicerol com a substrat, però a una concentració de 4 M de glicerol l'enzim encara no estava saturat. Aquest resultat indicaria que el glicerol no seria un substrat per a ADH8 en condicions fisiològiques.

Les parets que delimiten la cavitat d'unió al substrat d'ADH8 estan definides per 5 segments proteics: Glu55-Phe61, Pro91-Pro95, Asn114-Gly121, Asn139-Gly142 i Leu294-Leu307. La comparació de la butxaca d'unió al substrat d'ADH8 amb la dels enzims humans ADH1B1 i ADH4 indica que el traçat de les cadenes principals roman força semblant, amb l'excepció del llaç Asn114-Gly121.

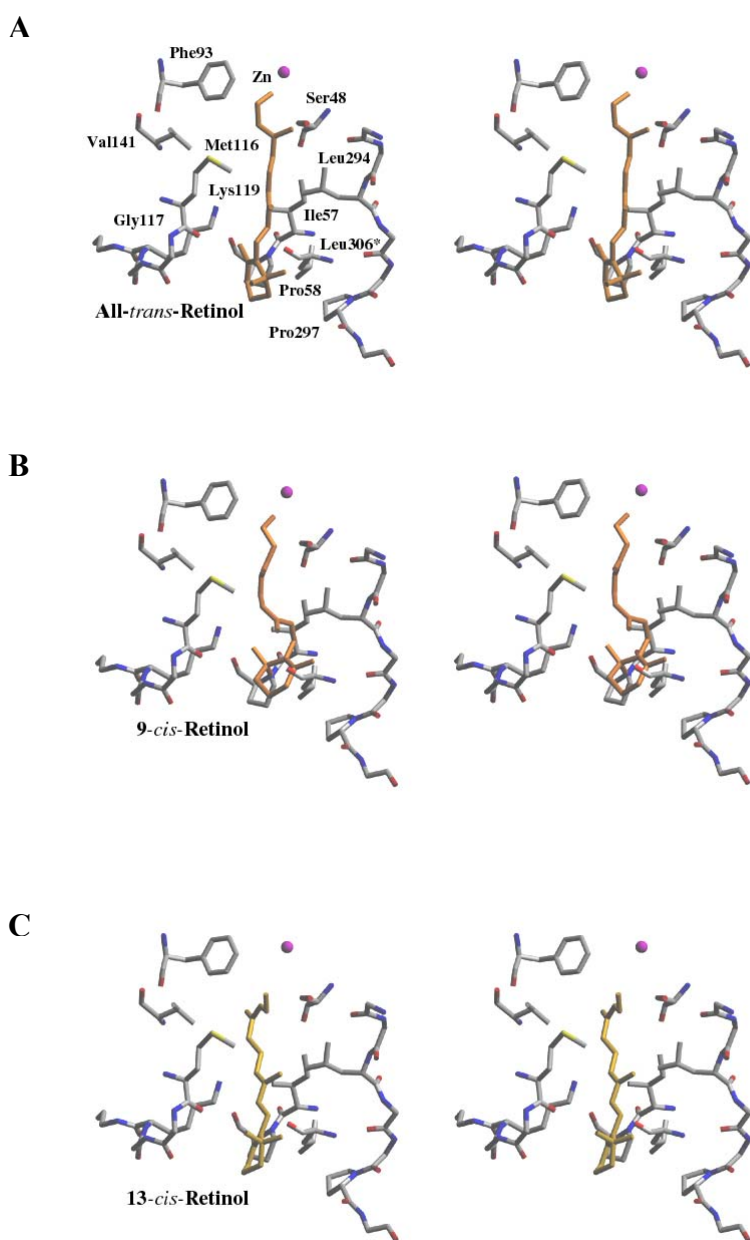
Així, les particularitats en l'especificitat de substrat d'ADH8 vindrien donades fonamentalment per la seqüència aminoacídica d'aquests segments, i no per la seva disposició a l'espai, com ja ha estat descrit en altres ADHs (Eklund i col., 1990; Farrés i col., 1994; Crosas i col., 2000; Allali-Hassani i col., 2001).

La major o menor eficiència de les alcohol deshidrogenases amb alcohols alifàtics de cadena curta està directament associada amb el volum del seti d'unió al substrat i, en especial de la zona més interna (Farrés i col., 1994; Xie i col., 1997; Crosas i col., 2000; Allali-Hassani i col., 2001). ADH8 es caracteritza per ser un enzim poc eficient amb aquest tipus de substrats, com ara l'etanol ( $K_m = 600 \text{ mM}$ ; Peralba i col., 1999a). En aquest enzim, la diferent disposició del llaç Asn114-Gly121, juntament amb la presència de Ser48 i Leu140 (Thr48 i Phe140 en ADH1B1 i ADH4), defineixen un seti actiu amb un major volum respecte altres alcohol deshidrogenases. En conseqüència, substrats petits no s'unirien eficientment en aquest seti actiu.

ADH8 exhibeix molt bones eficiències catalítiques amb substrats de cadena mitjana o llarga, com hexanal, *trans*-2-hexenal, i diferents isòmers de retinoides, amb valors més alts per als retinals que per als corresponents retinols (Peralba i col., 1999a). L'eficiència catalítica per al tot-*trans*-retinal ( $33,8 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) és la més alta publicada per a qualsevol ADH de vertebrat amb qualsevol retinoide (Duester, 2000). La majoria d'ADHs són actives amb tot-*trans*-retinal i 9-*cis*-retinal, però mostren molt poca activitat amb 13-*cis*-retinal ( $k_{\text{cat}}/K_m < 0,5 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Yang i col., 1994; Allali-Hassani i col., 1997; Martras i col., 2004). En canvi, el 13-*cis*-retinal és molt millor substrat per a ADH8 ( $k_{\text{cat}}/K_m = 4,2 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

Es simularen les interaccions de diferents isòmers de retinol amb la butxaca d'unió al substrat d'ADH8. El model amb tot-*trans*-retinol mostra les probables interaccions hidrofòbiques entre la cadena alifàtica del retinoide i residus ubicats en la part mitjana del seti d'unió al substrat: Ile57, Pro58, Leu294, Pro297 i Leu306 (aquest darrer, de la subunitat oposada). Per altra banda, el model amb 9-*cis*-retinol mostra que el seti d'unió és prou gran per acomodar també aquest isòmer. L'anell de  $\beta$ -ionona d'aquest isòmer, però, malgrat mantenir la interacció amb Leu306 de la subunitat oposada, s'allunya dels residus Pro58 i Pro297. Aquest fet podria significar una unió menys estable dels isòmers 9-*cis*, que explicaria la menor eficiència catalítica d'ADH8 per al 9-*cis*-retinal ( $7,8 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Peralba i col., 1999a) respecte al tot-*trans*-retinal.

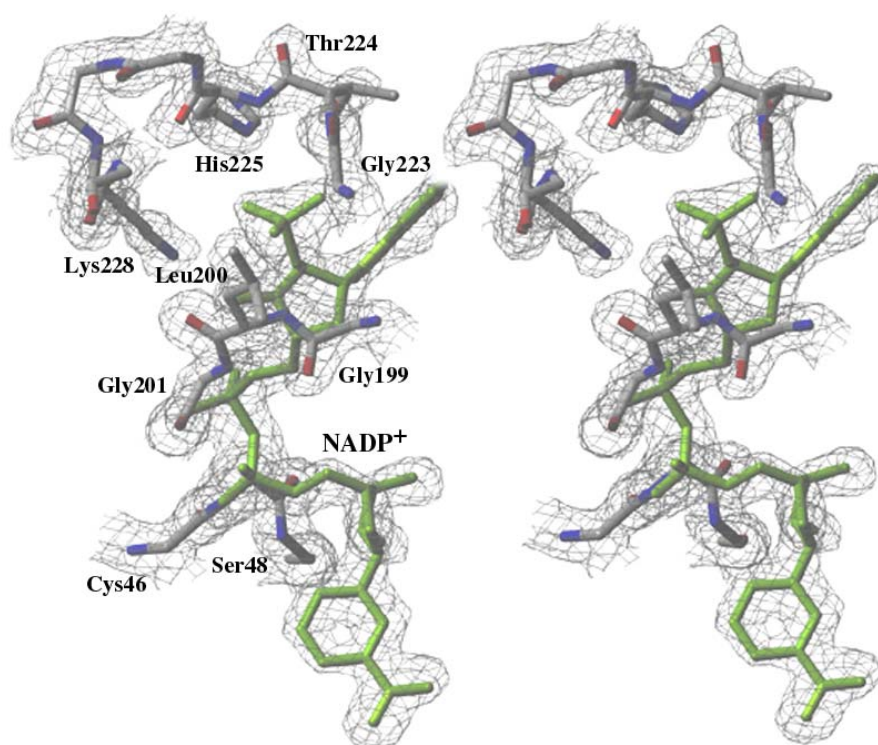
La simulació de la interacció del 13-*cis*-retinol mostra que la unió d'aquest isòmer requereix espai addicional en comparació amb els tot-*trans* i 9-*cis*. Aquest volum extra no existeix en ADH1B1 i ADH4, enzims amb baixes eficiències catalítiques per a aquest substrat, degut a la presència en ambdues estructures de Phe140, un residu força voluminós. ADH8, en canvi, confereix aquest espai suplementari gràcies a la presència de Leu140. Per altra banda, el model amb 13-*cis*-retinol mostra interaccions addicionals de la proteïna, en especial amb Val141, amb la cadena alifàtica d'aquest isòmer, que podrien contribuir a l'estabilització de la unió d'aquest substrat.



**Figura 14.** *Estereo-diagrames dels models resultants de la simulació de la interacció del tot-trans-retinol (A), 9-cis-retinol (B) i 13-cis-retinol (C) amb la butxaca d'unió del substrat.*

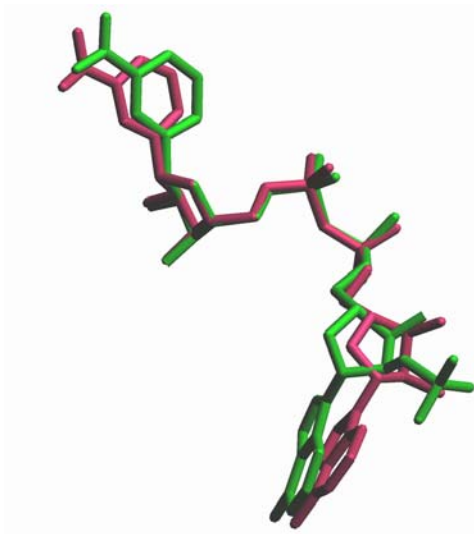
## 6 BUTXACA D'UNIÓ DEL COENZIM

La resolució de l'estructura del complex ADH8-NADP<sup>+</sup> revelà la presència d'una molècula de NADP<sup>+</sup>, unida al domini d'unió al coenzim, en cadascuna de les subunitats del dímer (Fig. 15). El NADP<sup>+</sup> unit mostra una conformació estesa, amb ambdues riboses presentant conformació C2'-endo. La mateixa que exhibeixen les riboses de les molècules de NAD<sup>+</sup> existents en complexos ADH-NAD(H) (Hurley i col., 1991; Xie i col., 1997).



**Figura 15.** Representació estereoscòpica de la butxaca d'unió del NADP<sup>+</sup>. Es mostra també el mapa de densitats electròniques del NADP<sup>+</sup> (verd) i dels residus implicats.

La superposició dels dinucleòtids trobats en els complexos ADH8-NADP<sup>+</sup> i ADH-NAD<sup>+</sup> mostra que la molècula de NADP<sup>+</sup> només presenta en l'adenosina, desviacions conformacionals significatives respecte al NAD<sup>+</sup>. Les riboses de la nicotinamida i els grups pirofosfats presenten conformacions pràcticament idèntiques en els dos cofactors (Fig. 16).



**Figura 16.** Superposició de les molècules de NADP<sup>+</sup> (verd) i NAD<sup>+</sup> (vermell), tal i com es troben en les estructures dels complexos ADH8-NADP<sup>+</sup> i ADH1B1-NAD<sup>+</sup>.

### 6.1 IMPLICACIONS ESTRUCTURALS EN ELS VALORS DE *k*<sub>cat</sub> DE L'ADH8

En les estructures de les ADHs dependents de NAD(H), l'adenina es troba encaixada per interaccions hidrofòbiques dutes a terme principalment pels residus Ile224 i Ile269 (Hurley i col., 1991; Cho i col., 1997; Xie i col., 1997), ambdós altament conservats (Sun i Plapp, 1992). En ADH8, Thr224 i Ala269 no realitzen aquest tipus d'interaccions (Fig. 17). Aquesta unió proteïna-coenzim més dèbil podria facilitar l'alliberament del NADP(H), probable etapa limitant de la reacció, i explicar els alts valors de *k*<sub>cat</sub> que exhibeix ADH8 (Peralba i col., 1999a), tal i com ha estat descrit en l'ADH de llevat i en mutants de l'ADH1 de cavall (Fan i Plapp, 1995, 1999; Fernández i col., 1999).

Per altra banda, ADH8 presenta una substitució significativa en els residus implicats en les interaccions de l'enzim amb el grup pirofosfat del NADP(H). ADH8,

juntament amb l'ADH1A humana, l'ADH1 del primat *Macaca mulatta*, l'ADH4 rata i l'ADH5 humana, són les úniques ADHs de vertebrat conegudes que presenten Gly en la posició 47 (Yasunami i col., 1991; Light i col., 1992; Parés i col., 1994, Peralba i col., 1999a). Arg o His són els residus existents en aquesta posició en la majoria d'ADHs de vertebrat (Sun i Plapp, 1992). Els enzims ADH1, amb baixos valors de kcat, presenten una Arg en aquesta posició que interacciona electrostàticament i forma tres ponts d'hidrogen amb el grup pirofosfat del NAD(H) (Taula 12). En ADH8, Gly47 només realitza un pont d'hidrogen amb aquest grup, encara que les dues interaccions perdudes les realitzen dues molècules d'aigua (Fig. 17; Taula 12), com ha estat també descrit en l'estructura de l'ADH1A humana (Niederhut i col., 2001). Així, la substitució Arg/Gly en ADH8 podria també generar una unió proteïna-coenzim més dèbil, i contribuir a l'increment dels valors de kcat d'aquest enzim.

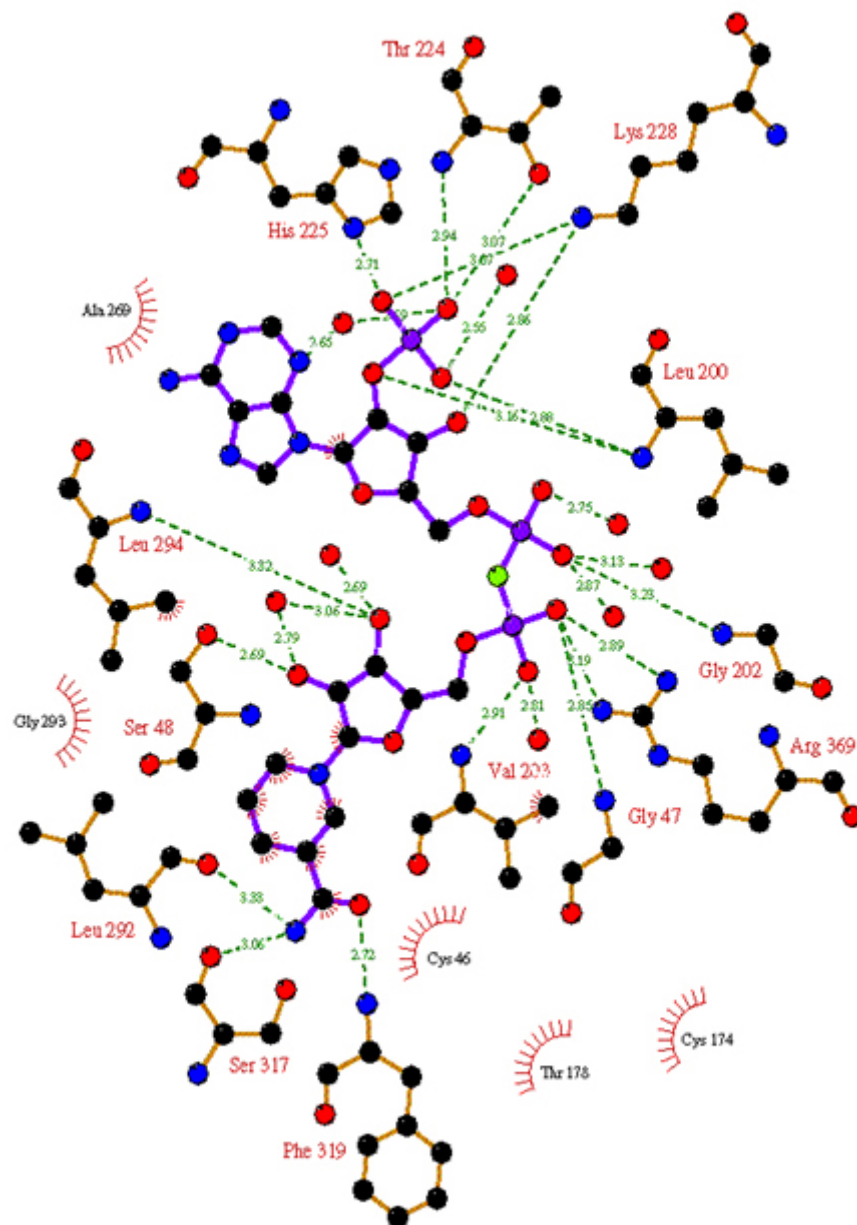
## 6.2 DETERMINANTS ESTRUCTURALS DE L'ESPECIFICITAT DE COENZIM DE L'ADH8

L'única diferència existent entre el NAD(H) i el NADP(H) radica en un grup fosfat esterificat en la posició 2' de la ribosa de l'adenosina del NADP(H). Aquest grup fosfat addicional condiciona el volum atòmic i la polaritat dels residus del seu entorn immediat. Aquests haurien de generar l'espai suficient per a la ubicació del fosfat, i al mateix temps estabilitzar la seva càrrega negativa.

La resolució de l'estructura del complex binari ADH8-NADP<sup>+</sup> ha permès identificar els residus que defineixen l'entorn del grup fosfat terminal del NADP<sup>+</sup>, i que confereixen les característiques espacials i de polaritat adients per a la seva unió. Aquests residus són Gly223, Leu200, Thr224, His225 i Lys228, interaccionant només els quatre darrers amb el coenzim (Fig. 17; Taula 12).

Concretament, els tres àtoms d'oxigen (OP1, OP2 i OP3) del grup fosfat addicional del NADP<sup>+</sup> presenten les següents interaccions per pont d'hidrogen (Fig. 17, Taula 12): OP1 interacciona amb el nitrogen de la cadena principal de Leu200 i amb una molècula d'aigua; OP2 interacciona amb l'oxigen de la cadena lateral i el nitrogen de la cadena principal de Thr224, i amb una molècula d'aigua; i OP3 interacciona amb l'àtom N<sup>δ</sup> de His225 i amb la cadena lateral de Lys228.





**Figura 17.** Representació amb el programa LIGPLOT (Wallace i col., 1995) de les interaccions del NADP<sup>+</sup> amb la butxaca d'unió del coenzim, observades en el complex ADH8-NADP<sup>+</sup>.

**Taula 12.** Ponts d'hidrogen realitzats pel coenzim en ADH8 en comparació amb ADHs dependents de NAD(H).

	<b>ADH8</b>	<b>ADH1B1</b>	<b>ADH2</b>	<b>ADH4</b>
	<i>Rana</i>	<i>Humana</i>	<i>Ratolí</i>	<i>Humana</i>
<b>Fosfat</b>				
OP1	Leu200/ H <sub>2</sub> O	---	---	---
OP2	Thr224/ H <sub>2</sub> O	---	---	---
OP3	His225/ Lys228	---	---	---
<b>Adenina</b>				
N1	---	---	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
N6	H <sub>2</sub> O	---	H <sub>2</sub> O	---
N7	---	---	H <sub>2</sub> O	---
<b>Ribosa</b>				
O2'		Asp223/H <sub>2</sub> O	Asp223/H <sub>2</sub> O	Asp223
O3'	Lys228	Asp223/Lys228	Asp223/Lys228	Asp223/Lys228
<b>Pirofosfat</b>				
OP1A	2 H <sub>2</sub> O	Arg47/Arg47	2 H <sub>2</sub> O	Arg47/Arg47
OP1B	H <sub>2</sub> O	2 H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	
OP2A	Arg369/Gly47	Arg369/Arg47	Arg369/H <sub>2</sub> O	Arg369/Arg47
OP2B	Gly202/Val203	Gly202/Val203/H <sub>2</sub> O	Cys202/Val203	Gly202/Val203
<b>Ribosa</b>				
O2'	Ser48/ H <sub>2</sub> O	Thr48	Thr48	Thr48
O3'	Leu294/ 2H <sub>2</sub> O	Ile269/His51	H <sub>2</sub> O	Ile269/Val294
<b>Nicotinamida</b>				
O7	Phe319/Thr178	Phe319/Thr178	Phe319	Phe319/Thr178
N7	Leu292/Ser317	Val292/Ala317	Val292/Thr317	Ser292/Cys317

Les dades corresponents a ADH1B1, ADH2 i ADH4 han estat extretes de Hurley i col., 1991; Svensson i col., 2000 i Xie i col., 1997, respectivament.

Leu200 i Lys228 són dos residus altament conservats en ADHs dependents de NAD(H) (Sun i Plapp, 1992). En ADH8, però, adquiririen un nou paper, esdevenint importants en l'establiment de la major especificitat per al NADP(H) d'aquest enzim. Leu200 forma part, tant en ADH8 com en ADHs dependents de NAD(H), de la seqüència consens 199-GLGGVG-204 del segment d'unió al pirofosfat, encara que en ambdós casos no hi interacciona (Fig. 17; Taula 12). En enzims dependents de NAD(H), el nitrogen de la cadena principal de la Leu200 interacciona per pont d'hidrogen amb el grup carboxil d'Asp223, intervenint indirectament en la unió de la ribosa del nucleòtid d'adenina (Carugo i Argos, 1997). ADH8 no presenta Asp223, facilitant-se la interacció directa de Leu200 amb el grup fosfat addicional, cooperant així en la seva unió (Fig. 17; Taula 12).

Per altra banda, la Lys228, en ADHs dependents de NAD(H), interacciona mitjançant pont d'hidrogen amb l'oxigen 3' de la ribosa (Taula 12). En ADH8, es manté aquesta interacció i, a més, interacciona amb el grup fosfat addicional (Fig. 17; Taula 12). La Lys228 és particularment interessant. Ha estat suggerit que la presència d'un o dos residus bàsics interaccionant amb el fosfat és molt important per conferir l'especificitat per al NADP(H), degut a que estabilitzarien la càrrega negativa del fosfat (Carugo i Argos, 1997). En ADH8, aquest paper correspondria a Lys228, un residu altament conservat en ADHs dependents de NAD(H), esdevenint important per a que ADH8 sigui un enzim dependent de NADP(H). Les MDR dependents de NADP(H) presenten diferents possibilitats envers al residu bàsic implicat en la unió d'aquest coenzim. L'estratègia més estesa és la presència de Lys228 com a únic residu bàsic, o acompanyat d'un altre en les posicions 224 o 225 (Thorn i col., 1995); o bé, únicament residus bàsics en les posicions 224 i/o 225 (Korkhin i col., 1998).

Gly223, Thr224 i His225 sí que representen substitucions respecte a les ADHs dependents de NAD(H), ja que aquests enzims presenten de manera força conservada Asp223, Ile/Leu224 i Asn225 (Sun i Plapp, 1992).

Els enzims dependents de NAD(H) mostren un residu carregat negativament a l'extrem C-terminal de la segona fulla  $\beta$  del plegament de Rossmann (Bellamacina, 1996; Carugo i Argos, 1997), que és Asp223 en ADHs dependents de NAD(H) de vertebrats (Sun i Plapp, 1992). La cadena lateral d'aquest residu forma ponts d'hidrogen amb els grups hidroxil 2' i 3' de la ribosa de l'adenosina del NAD(H) (Taula 12), essent

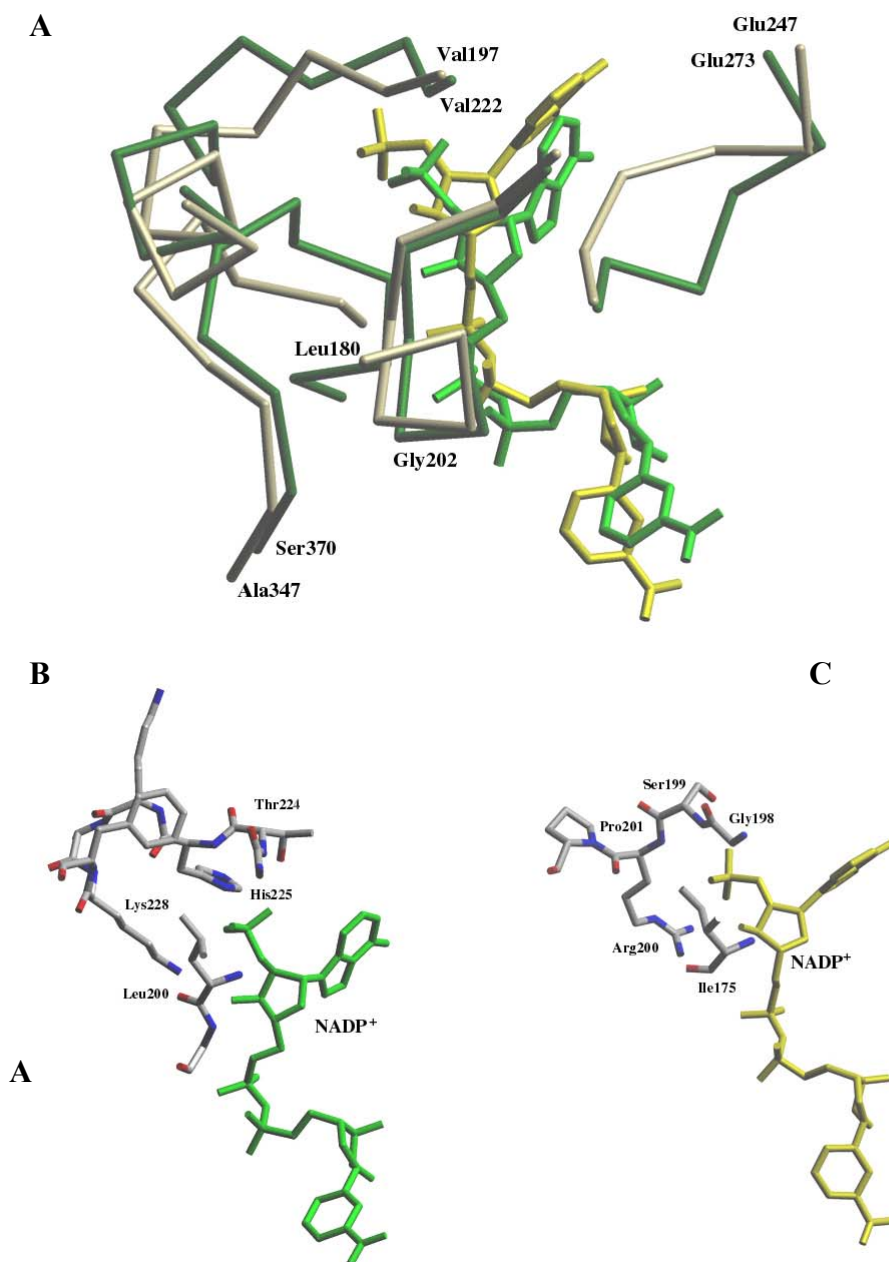
aquest residu considerat com el principal determinant de l'especificitat de coenzim en enzims dependents de NAD(H) (Carugo i Argos, 1997). Proteïnes amb preferència per al NADP(H), en canvi, presenten un residu no acídic en aquesta posició (Wierenga i col., 1986; Carugo i Argos, 1997), Gly223 en ADH8. La presència de Gly223 genera l'espai suficient per a la ubicació del grup fosfat addicional del NADP(H) (Fig.17), evitant-se els impediments electroestàtics i estèrics que podria provocar la presència d'una cadena lateral acídica (Asp223) en la butxaca d'unió del grup fosfat.

La presència en ADH8 de Thr224 i His225, en lloc de Ile/Leu224 i Asn225, generaria un entorn més polar en el seti d'unió del fosfat, estabilitzant-se la seva càrrega i afavorint-se la seva unió. Així, juntament amb Gly223, els residus Thr224 i His225 podrien també tenir una contribució significativa en l'especificitat de nucleòtid d'ADH8.

Per tant, pocs canvis en la seqüència (Asp223Gly, Ile224Thr i Asn225His), i el manteniment de residus conservats, en particular Lys228, permeten que l'arquitectura molecular de la butxaca d'unió al coenzim de l'ADH s'adapti als diferents requeriments de coenzim. Aquest tipus d'adaptació explicaria els mínims canvis conformacionals existents entre el NAD(H) i el NADP(H) quan es troben units en complexos ADH-NADP<sup>+</sup> i ADH-NAD<sup>+</sup> (Fig. 16).

Altres MDR dependents de NADP(H), com les poliol deshidrogenases (PDH) dels microorganismes *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Burdette i col., 1996), *Thermoanaerobacter brockii*, *Clostridium beijerinckii* (Korkhin i col., 1998), i *Entamoeba histolytica* (Kumar i col., 1992), presenten un residu poc voluminos i apolar (Gly198), un residu hidrofílic (Ser199) i un residu bàsic (Arg200) a les posicions equivalents a 223, 224 i 225, respectivament (Fig. 18B i C).

Malgrat que la composició aminoacídica de l'entorn immediat del fosfat addicional del NADP<sup>+</sup>, és equivalent en ADH8 i en les PDHs dependents de NADP(H) (Fig. 18B i C), l'arquitectura de la butxaca d'unió al coenzim és força diferent (Fig. 18A). La superposició dels àtoms C<sup>α</sup> de l'estructura d'ADH8 amb els de les PDH de *Clostridium beijerinckii* i *Thermoanaerobacter brockii* (PDBs: 1KEV i 1BXZ, Korkhin i col., 1998), generà uns valors de r.m.s.d. de 1,27 Å i 1,31 Å, respectivament. Algunes de les diferències més grans es localitzen en els llaços delimitants de la butxaca d'unió al coenzim. (Fig. 18A). Aquest resultat reflecteix les diferents estratègies, a nivell de la topologia global de la butxaca d'unió al coenzim, seguides per membres de la superfamília de les MDR per aconseguir el reconeixement específic del NADP(H).



**Figura 18.** Diferents estratègies d'unió del  $NADP^+$  en enzims MDR. **A:** Superposició de les butxaques d'unió del  $NADP(H)$  en ADH8 (verd) amb la PDH dependent de  $NADP(H)$  de *Clostridium beijerinckii* (groc). Es pot observar la diferent conformació que presenten les dues molècules de  $NADP^+$ , fruit de la diferent estructura de la butxaca d'unió del coenzim. **B:** Entorn del fosfat terminal a ADH8. **C:** Entorn del fosfat terminal a la PDH dependent de  $NADP(H)$  de *Clostridium beijerinckii*.

## **CAPÍTOL II**

### **REVERSIÓ DE L'ESPECIFICITAT DE COENZIM DE L' ADH8**

# INTRODUCCIÓ

L'especificitat de coenzim és una important propietat de les oxidoreductases dependents de NAD(P). La major preferència per a NAD(H) o per a NADP(H) es troba associada a la funció metabòlica de l'enzim. Així, el tipus de coenzim sovint distingeix entre enzims implicats en rutes oxidatives o degradatives, i enzims involucrats en vies reductores o biosintètiques. Degut a que el NAD(H) i el NADP(H) únicament es diferencien estructuralment en la presència d'un grup fosfat esterificat en la posició 2' de la ribosa de l'adenosina, les deshidrogenases haurien de posseir un nombre limitat de residus per discriminar entre els dos tipus de coenzim. A més, entre les deshidrogenases d'una mateixa família, el mateix plegament de la proteïna és sovint utilitzat per a unir tant NAD(H) com NADP(H), mostrant alguns enzims una activitat dual (Backer i col., 1992).

Les dades estructurals obtingudes del complex ADH8-NADP<sup>+</sup> suggereixen que la preferència d'aquest enzim per al NADP(H) ve donada pel segment Gly223-Thr224-His225 (Asp223-Ile/Leu224-Asn225, en la majoria d'ADHs dependents de NAD(H); Sun i Plapp, 1992), que juntament amb Leu200 i Lys228, defineixen una butxaca d'unió per al grup fosfat addicional del NADP(H). Altres MDR, com les PDHs dependents de NADP(H) d'alguns microorganismes (Burdette i col., 1996; Korkhin i col., 1998; Kumar i col., 1992), també presenten Gly i dos residus més hidrofílics en les posicions corresponents a 223, 224, i 225, respectivament.

En les ADHs, el residu 223 es localitza en l'extrem C-terminal de la segona fulla  $\beta$  del plegament de Rossmann (Rossmann i col., 1974) i clàssicament ha estat considerat el residu clau en l'especificitat d'aquests enzims per al NAD(H). La substitució D223G, trobada en ADH8, evitaria els possibles impediments estèrics i electroestàtics que una cadena lateral voluminosa i àcida podria provocar durant la unió del grup fosfat addicional del NADP(H). Diversos treballs, que tenien com a objectiu canviar l'especificitat de coenzim de diferents MDR, han estat focalitzats cap a mutacions que involucraven el residu 223 (Fan i col., 1991; Lauvergeat i col., 1995; Metzger i Hollenberg, 1995; Fan i Plapp, 1999). Tot i això, la reversió completa de l'especificitat de coenzim, entesa com a aconseguir un enzim mutant tant eficient catalíticament com l'enzim silvestre però utilitzant un coenzim diferent, ha estat rarament assolida. Aquest fet implica que la conversió de l'especificitat de coenzim podria requerir múltiples



substitucions en el domini d'unió al coenzim. Altres residus trobats en ADH8, com Thr224 i His225, que es troben interaccionant mitjançant ponts d'hidrogen amb el fosfat addicional, podrien també ser importants en la definició de l'especificitat de coenzim d'ADH8.

En el present treball, hem investigat, mitjançant mutagènesi dirigida, caracterització cinètica dels diferents mutants generats, i modelatge computacional, les contribucions individuals i combinades dels residus adjacents Gly223-Thr224-His225 en l'especificitat per al NADP(H) d'ADH8. Els aminoàcids escollits per substituir Gly223, Thr224 i His225, foren Asp223, Ile224 i Asn225, respectivament, degut a l'alt grau de conservació de la seqüència Asp223-Ile/Leu224-Asn225 en les ADHs dependents de NAD(H) de vertebrat (Sun i Plapp, 1992). La seqüència d'ADH8 presenta només un 30% de diferències respecte a la seqüència de l'ADH dependent de NAD(H) més propera (ADH1 de *Rana perezi*; Peralba i col., 1999b). Això fa que ADH8 sigui un bon candidat per intentar el redisseny de la seva especificitat de coenzim.

# MATERIALS I MÈTODES

## 1 MUTAGÈNESI DIRIGIDA PER PCR

### 1.1 GENERACIÓ DE LES MUTACIONS G223D, T224I, H225N, i T224I/H225N

Els mutants G223D, T224I, H225N i T224I/H225N foren obtinguts utilitzant com a motlle el plasmidi pGEX-ADH8, que conté el cDNA de l'ADH8 silvestre clonat en el vector pGEX 4T-2.

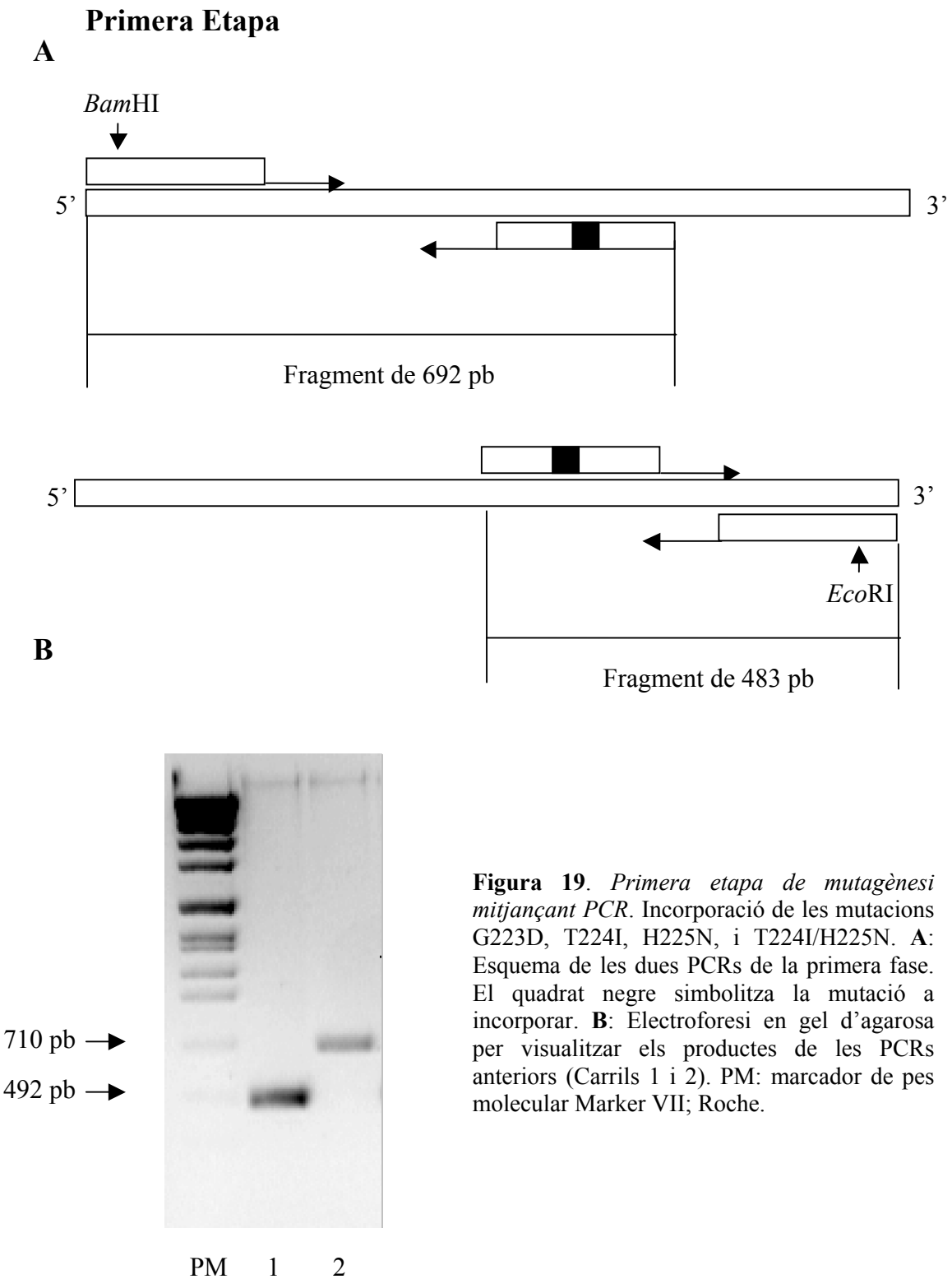
#### 1.1.2 Obtenció de DNA del plasmidi pGEX-ADH8

Un glicerinat d'*E.coli* BL21, transformat amb el plasmidi pGEX-ADH8, fou utilitzat per inocular 3 ml de medi LB amb ampicil.lina (75 µg/ml). Els cultius es deixaren créixer a 37°C, a 200 rpm, durant 16 h. Passat aquest temps, es sedimentaren les cèl.lules per centrifugació. L'extracció del DNA plasmídic es realitzà utilitzant el *kit* GFX™ *Micro Plasmid Prep* (Amersham Pharmacia Biotech).

#### 1.1.3 Incorporació de les mutacions

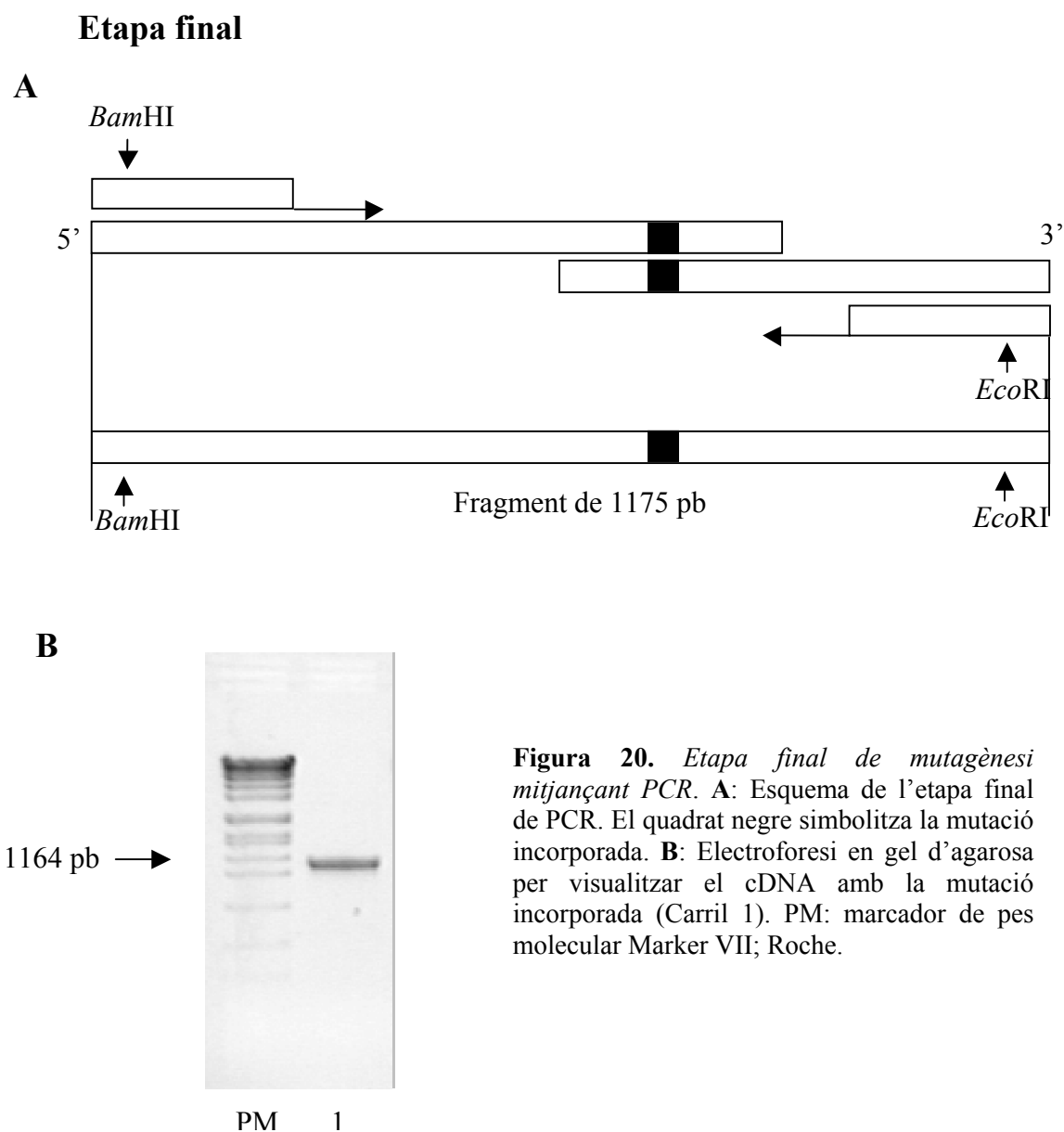
Les mutacions foren introduïdes mitjançant dues etapes seqüencials de PCR. En una primera etapa, es realitzaren dues reaccions de PCR en paral.lel (Fig. 19A). En una reacció, s'utilitzaren l'encebador RanaL (5'-TTATAGGATCCATGTGCACTGCGGGAAAAGAT-3'), en negreta diana per a *Bam*HI, i un dels encebadors antisentit amb la mutació incorporada (subratllada): 223R: 5'-GTCTTTATGGGTATCAACCCCTATAATACG-3'; 224R: 5'-GTCTTTATGGATTCCAACCCCTATAATAC-3'; 225R: 5'-GTCTTTATTGGTTCCAACCCCTATAATACG-3'; 224/225R: 5'-GTCTTTATTGATTCCAACCCCTATAATAC-3'. En l'altra reacció, s'utilitzaren l'encebador antisentit RanaR (5'-CCACCTGAATTCTTAGTATATCATAATGCTTCG-3'), en negreta diana per a *Eco*RI, i un dels encebadors sentit amb la mutació incorporada. Com a resultat d'aquesta

primera fase, es varen obtenir dos fragments, un de 692 pb, en la primera reacció, i un altre de 483 pb, en la segona reacció (Fig. 19A, Fig. 19B)



**Figura 19.** Primera etapa de mutagènesi mitjançant PCR. Incorporació de les mutacions G223D, T224I, H225N, i T224I/H225N. **A:** Esquema de les dues PCRs de la primera fase. El quadrat negre simbolitza la mutació a incorporar. **B:** Electroforesi en gel d'agarosa per visualitzar els productes de les PCRs anteriors (Carrils 1 i 2). PM: marcador de pes molecular Marker VII; Roche.

Aprofitant que els dos productes de les PCRs anteriors presentaven una regió de solapament, foren utilitzats com a motlle en un pas final d'amplificació (Fig. 20A). Abans de la darrera PCR, però, els dos productes foren purificats a partir d'un gel d'agarosa mitjançant el *kit Concert Rapid Gel Extraction System* (Life Technologies). En aquesta darrera reacció de PCR, els encebadors utilitzats foren RanaL i RanaR. El correcte funcionament de la PCR final era comprovat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa al 1% (Fig. 20B). El producte resultant era purificat a partir del mateix gel mitjançant el *Concert Rapid Gel Extraction System* (Life Technologies).



**Figura 20.** *Etapa final de mutagènesi mitjançant PCR.* **A:** Esquema de l'etapa final de PCR. El quadrat negre simbolitza la mutació incorporada. **B:** Electroforesi en gel d'agarosa per visualitzar el cDNA amb la mutació incorporada (Carril 1). PM: marcador de pes molecular Marker VII; Roche.

Totes les reaccions de PCR foren dutes a terme en un termociclador PTC-100™ (MJ Research), utilitzant la polimerasa Expand™ High Fidelity (Roche Molecular Biochemicals), i en les següents condicions: una etapa de *hot start* a 95 °C durant 1 min, desnaturalització a 94 °C durant 45s, hibridació a 55 °C durant 1 min, extensió a 68 °C durant 12 min. Es realitzaren 11 cicles des del pas 2 fins al pas 4, i un pas final d'extensió.

#### 1.1.4 Clonatge dels cDNAs mutants

Per realitzar el clonatge dels cDNAs mutats en el vector pGEX 4T-2, es digeriren amb *Bam*HI i *Eco*RI els diferents cDNAs i el vector. Finalment, es realitzà la lligació entre ambdós fragments, utilitzant la DNA lligasa de T4 FLPC*pure* (Amersham Pharmacia Biotech), a 16 °C durant 16 h.

### 1.2 GENERACIÓ DE LES MUTACIONS G223D/T224I I G223D/T224I/H225N

Els mutants G223D/T224I i G223D/T224I/H225N foren obtinguts utilitzant un mètode basat en el kit *QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene). Els plasmidis pGEX-G223D i pGEX-T224I/H225N, amb els cDNAs clonats de G223D i T224I/H225N, foren utilitzats com a motlles per obtenir el doble i el triple mutant, respectivament.

#### 1.2.1 Obtenció de DNA dels plasmidis pGEX-G223D i pGEX- T224I/H225N

Glicerinars d'*E.coli* BL21, transformats amb els plasmidis pGEX-G223D o pGEX-T224I/H225N, foren utilitzats per inocular 3 ml de medi LB amb ampil.lina (75 µg/ml). Els cultius es deixaren créixer a 37°C, a 200 rpm, durant 16 h. Passat aquest temps, es sedimentaren les cèl.lules per centrifugació. L'extracció del DNA plasmídic es realitzà utilitzant el kit GFX™ *Micro Plasmid Prep* (Amersham Pharmacia Biotech).

### 1.2.2 Incorporació de les mutacions

La mutagènesi fou realitzada mitjançant una única PCR, en la que es va utilitzar un encebador antisentit que contenia la corresponent mutació (subratllada) (223/224R: 5'-GTCTTTATGGATATCAACCCCTATAATAC-3' o TMR: 5'-GTCTTTATTGATATCAACCCCTATAATACG-3'), i encebadors que també presentaven la mutació, però amb la seqüència complementària. La PCR es realitzà en un termociclador PTC-100<sup>TM</sup> (MJ Research). Les condicions de PCR foren les mateixes que en els anteriors mutants, però la polimerasa utilitzada fou la Expand<sup>TM</sup> Long Template (Roche Molecular Biochemicals).

El correcte funcionament de la PCR final era comprovat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa al 1 %. El producte resultant era purificat a partir del mateix gel mitjançant el *Concert Rapid Gel Extraction System* (Life Technologies). Un cop pur, el producte de PCR fou incubat amb l'enzim *DpnI* a 37 °C durant 60 min. Aquest tractament assegura la digestió de les cadenes parentals *dam*-metilades (Nelson i McClelland, 1992), eliminant-se el DNA motlle.

Els productes resultants de la PCR eren els plasmidis pGEX-G223D/T224I i pGEX-G223D/T224I/H225N, que presentaven un tall en la seva seqüència. Aquests productes eren utilitzats per transformar cèl.lules *E. coli* BL21, on la DNA lligasa bacteriana repara el tall, permetent-se la replicació.

## 1.2 VERIFICACIÓ DE LES MUTACIONS

Independentment del mètode utilitzat en l'obtenció dels diferents DNA mutats, tots ells foren seqüenciats per comprovar que les úniques substitucions presents fossin les desitjades.

## 2 EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES MUTANTS

Les condicions utilitzades en l'expressió, la ressuspensió, i la lisi cel.lular, per als enzims mutants, foren les mateixes que per a l'ADH8 silvestre recombinant (apartats 2.2 i 2.3 del Capítol I). Amb l'única diferència, però, del volum del cultiu bacterià, que en el cas dels diferents mutants fou de 1 litre.

La purificació del mutant T224I es realitzà de manera idèntica a la de l'enzim silvestre recombinant (apartat 2.4 del Capítol I). En el cas dels enzims mutants G223D, H225N, G223D/T224I, T224I/H225N i G223D/T224I/H225N, les condicions de la primera cromatografia d'afinitat en la columna de Glutatió-Sepharose 4B foren les mateixes que per a l'ADH8 silvestre (apartat 2.4 del Capítol I). En canvi, la reïna utilitzada en la segona cromatografia d'afinitat va ésser diferent, malgrat que el tampó fou el mateix (tampó fosfat monosòdic/NaOH 10 mM, DTT 2,5 mM, pH 6,5). Concretament, la matriu usada fou Cibacron Blue 3-GA Agarose (Sigma). La mostra d'homogenat era incubada amb 1 ml de reïna al 75 % per cada 3,5 mg de proteïna activa, amb agitació, a 4 °C i durant 90 min. Passat aquest temps, la suspensió fou centrifugada a 500 x g durant 5 min a 4 °C, descartant-se el sobrenedant. La matriu, amb l'enzim mutant unit, va ésser rentada amb 5 volums de tampó fosfat monosòdic, 2,5 mM DTT, i agitació durant 10 min a temperatura ambient. Seguidament, es centrifugava a 500 x g durant 5 min a 4 °C. Aquest procés es dugué a terme 3 vegades.

L'elució de l'enzim mutant es realitzà incubant la reïna amb 5 volums de NaCl 0,6 M, amb agitació, a 4 °C i durant 10 min. Seguidament, la suspensió era centrifugada a 500 x g durant 5 min a 4 °C, recuperant-se el sobrenedant. El procés d'elució es repetia dues vegades més amb l'objectiu de recuperar la major quantitat d'enzim possible. La fracció pura es va concentrar fins a 1 mg/ml, aproximadament, per centrifugació, utilitzant els tubs Centricon Plus-20 (Millipore).

La concentració de proteïna va ésser determinada pel mètode del Coomassie-Blue (Bradford, 1976), utilitzant albúmina de sèrum boví (BSA) com a patró. Aquesta fracció va ésser utilitzada per determinar les activitats estàndard de tots els enzims, amb les que es varen calcular les respectives activitats específiques ( en U/mg).



La puresa d'aquestes fraccions va ésser comprovada per electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), en un sistema de minigel vertical (Bio-Rad, Miniprotean III), de 0,5 mm de gruix i amb un 11 % d'acrilamida. Les bandes de proteïna foren revelades per tinció del gel amb Coomassie Brilliant Blue R250 (Bio-Rad).

### 3 ASSAJOS ENZIMÀTICS

L'activitat alcohol deshidrogenasa fou determinada a 25°C, monitoritzant el canvi d'absorbància a 340 nm amb un espectrofotòmetre Cary 400 Bio (Varian). Una unitat d'activitat (U) correspon a 1  $\mu\text{mol}$  de coenzim reduït format o utilitzat per min. El coeficient d'extinció molar a 340 nm tant per al NADPH com per al NADH és  $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . La longitud de pas òptic per a les cubetes fou de 1 cm en les reaccions d'oxidació i 0,2 cm en les reaccions de reducció.

L'oxidació d'alcohols fou duta a terme en tampó glicina/NaOH 0,1 M, pH 10, o en tampó fosfat monosòdic/NaOH 0,1 M, pH 7,5, utilitzant etanol 1 M o octanol 1,5 mM com a substrats, respectivament. Per a la reducció d'aldehids, la reacció es realitzà en tampó fosfat monosòdic/NaOH 0,1 M, pH 7,5, utilitzant *m*-nitrobenzaldehyd 0,2 mM com a substrat.

#### 3.1 MESURA DE L'ACTIVITAT ESTÀNDARD DELS ENZIMS MUTANTS

Els assajos estàndard foren duts a terme per duplicat, utilitzant-se en tots els casos etanol 1 M com a substrat, i tampó glicina/NaOH 0,1 M, pH 10. En canvi el coenzim i la seva concentració diferien en funció del tipus d'enzim:  $\text{NADP}^+$  1,2 mM per al mutant G223D;  $\text{NADP}^+$  2,4 mM per als mutants T224I i H225N;  $\text{NAD}^+$  0,4 mM per al mutant G223D/T224I/H225N; i  $\text{NAD}^+$  2,4 mM per als mutants G223D/T224I i T224I/H225N.

### **3.2 DETERMINACIÓ DE LES CONSTANTS CINÈTIQUES PER ALS COENZIMS, DE L'ADH8 RECOMBINANT I ENZIMS MUTANTS**

L'interval de concentracions de coenzim utilitzat en les diferents cinètiques enzimàtiques anava de  $0,1 \times K_m$  a  $10 \times K_m$ . L'activitat a cada concentració era mesurada per duplicat, i la cinètica enzimàtica realitzada tres cops. Les constants cinètiques  $K_m$  i  $k_{cat}$  foren calculades amb el programa de regressió no-lineal Grafit 5.0 (Erithacus Software Ltd.) i expressades com la mitjana aritmètica  $\pm$  desviació estàndard.

### **3.3 DETERMINACIÓ DE LA CONSTANT DE DISSOCIACIÓ DEL COENZIM. CINÈTIQUES BISUBSTRAT**

Les constants de dissociació ( $K_{ia}$ ), tant del  $NAD^+$  com del  $NADP^+$ , van ésser determinades per a l'enzim silvestre recombinant i per als diferents enzims mutants mitjançant cinètiques bisubstrat. Aquest tipus d'assaig consisteix en la mesura de l'activitat enzimàtica a diferents concentracions de coenzim ( $0,1 \times K_m$  a  $10 \times K_m$ ), utilitzant per a una mateixa concentració de coenzim diferents concentracions de substrat ( $0,1 \times K_m$  a  $10 \times K_m$ ). Aquestes cinètiques, es realitzaren en tampó glicina/NaOH 0,1 M, pH 10, utilitzant etanol com a substrat. Les constants determinades a partir de les cinètiques bisubstrat foren calculades ajustant les dades a l'equació que segueix un mecanisme seqüencial ordenat bi-bi (Cleland, 1979).

### **3.4 EFECTE ISOTÒPIC**

Per determinar si la transferència de l'ió l'hidrur era el pas limitant de la reacció catalitzada per l'ADH8, i si també ho era en els diferents mutants, es varen realitzar assajos d'efecte isotòpic. Aquest tipus de cinètica es realitza utilitzant com a substrat una molècula d'alcohol que presenti l'àtom d'hidrogen implicat en la transferència substituït per un àtom de deuteri, un isòtop més pesant. Si la transferència de l'ió l'hidrur és el pas limitant de la reacció, quan s'utilitza un substrat deuterat, la constant catalítica és més petita que quan el substrat no presenta deuteri.

Aquests assajos foren duts a terme mesurant l'activitat enzimàtica a diferents concentracions de  $\text{NADP}^+$  i  $\text{NAD}^+$  (0,1x Km a 10 x Km), amb ethanol-*d6* (Merck) 1 M o etanol 1 M com a substrat. Totes les cinètiques es realitzaren en tampó Gly/NaOH 0,1 M, pH 10. Tant el tampó de l'assaig, quan s'utilitzava el substrat deuterat, com la solució d'etanol-*d6* foren preparats amb aigua deuterada (Sigma).

Per als mutants G223D/T224I i G223D/T224I/H225N, la saturació no es va poder aconseguir amb  $\text{NADP}^+$ . En aquests casos, es va mesurar l'activitat amb etanol i etanol-*d6* a una única concentració de  $\text{NADP}^+$  (4,8 mM).

#### 4 MODELATGE MOLECULAR

Utilitzant les coordenades de l'estructura del complex ADH8- $\text{NADP}^+$ , es van obtenir els models moleculars dels complexos de l'ADH8 i del mutant G223D/T224I/H225N amb  $\text{NAD}^+$ , i dels mutants G223D, T224I, H225N, T224I/H225N i G223D/T224I/H225N amb  $\text{NADP}^+$ . En els models dels diferents mutants, els nous residus foren introduïts amb el programa gràfic O (Jones i col., 1991). Respecte a les conformacions dels nous residus, foren inicialment assumides les d'aquells rotàmers que presentaven menys problemes estèrics. La geometria dels models fou llavors regularitzada i refinada a través de cicles de minimització d'energia amb el programa XPLOR (Brünger i col., 1998).