



U

UNIVERSITAT DE BARCELONA

B

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR**

**DETERMINACIÓ DE L'ESTRUCTURA CRISTAL·LINA
D'ALCOHOL DESHIDROGENASES DEPENDENTS DE
NADP(H)**

**Eva Maria Valencia Sanmiguel
Barcelona, Febrer 2004**

**UNIVERSITAT DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR**

**Programa de Bioquímica i Biologia Molecular
Bienni 1998-2000**

**DETERMINACIÓ DE L'ESTRUCTURA CRISTAL·LINA
D'ALCOHOL DESHIDROGENASES DEPENDENTS DE
NADP(H)**

Memòria presentada per la Eva Maria Valencia Sanmiguel per optar al grau de Doctora en Bioquímica. Aquest treball ha estat realitzat en el Departament de Biologia Estructural del IBMB – CSIC, sota la direcció del Professor Ignasi Fita Rodríguez.

Director:

Autor:

Prof. Ignasi Fita Rodríguez
Departament de Biologia Estructural,
de l'Institut de Biologia Molecular de
Barcelona del CSIC.

ABREVIATURES

ADH	Alcohol deshidrogenasa
Adh1p –7p	Isoenzims d'alcohol deshidrogenasa
AKR	Aldo-ceto reductasa
CAD	Cinamil alcohol deshidrogenasa
Cα	Carboni alfa
cDNA	Àcid desoxirribonucleic complementari
ESRF	<i>European synchrotron radiation facility</i>
GPDH	Gliceraldehid –3-PO ₄ deshidrogenasa
GST	<i>Glutathione Sepharose tag</i>
KNF	Model de Koshland, Nemethy i Filmer
K_{cat}	Constant catalítica
K_i	Constant de dissociació de coenzim
K_m	Constant de Michaelis – Menten
MAD	Difracció anòmala múltiple
MDR	Deshidrogenasa / reductasa de cadena mitjana
MIR	Substitució isomorfa múltiple
MTD	Manitol deshidrogenasa
MWC	Model de Monod, Wyman i Changeaux
NAD⁺	Dinucleòtid de nicotinamida - adenina (forma oxidada)
NAD(H)	Dinucleòtid de nicotinamida - adenina (forma rehuída)
NADP⁺	Dinucleòtid fosfat de nicotinamida - adenina (forma oxidada)
NADP(H)	Dinucleòtid fosfat de nicotinamida - adenina (forma rehuída)
NCS	Simetria no cristal·logràfica
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDB	Protein data bank
PDH	Poliol deshidrogenasa
PEG	Polietilenglicol
pK_a	Logaritme negatiu de la constant d'equilibri de ionització
R / T	Conformacions relaxada / tensa dels protòmers d'enzims al·lostèrics
r.m.s.d.	<i>Root mean square deviation</i>
SAD	Difracció anòmala simple

ScAdh6p, 7p	Isoenzims d'alcohol deshidrogenasa de <i>S. cerevisiae</i>
SDR	Deshidrogenasa / reductasa de cadena curta
SIR	Substitució isomorfa senzilla
SMB	Model de Seydoux, Malhotra i Bernhard
YADH	<i>Yeast alcohol dehydrogenase</i>

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ

1. LA ALCOHOL DESHIDROGENASA	1
1.1. Les MDR de vertebrats	
1.2. Les MDR A <i>S.cerevisiae</i>	
1.3. Metabolisme d'oxidació / reducció als éssers vius	
1.4. Diferències estructurals entre conformacions <i>apo</i> - i <i>holo</i> -ADH	
1.5. Descripció del fenomen "Half-site reactivity" a la ADH1 de cavall	
1.6. La ADH8: ADH depenent de NADP(H) a vertebrats	
1.7. Selectivitat envers NAD(H)/NADP(H)	
1.8. Cinamil alcohol deshidrogenasa CAD	
1.9. Els enzims CAD a <i>S.cerevisiae</i>	
1.10. La ScAdh6 dependent de NADP(H)	
OBJETIUS I ORGANITZACIÓ DE LA TESI	16
RESULTATS	
CAPÍTOL 1	19
Crystallization and preliminary X-ray analysis of NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenases from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Rana perezi</i> <i>Acta Crystallographica</i> (2003). Section D59, 334-337.	
RESUM DELS RESULTATS	25
1. Cristal·lització i anàlisi de dades d'ADH8 dependent de NADP(H) de <i>R. Perezi</i>	
2. Cristal·lització i anàlisi preliminar de <i>ScAdh6p</i> , ADHVI dependent de NADP(H) de <i>S. Cerevisiae</i>	
CAPÍTOL 2	29
Crystal Structure of the Vertebrate NADP(H)-dependent Alcohol Dehydrogenase (ADH8)	
<i>J. Mol. Biol.</i> (2003) 330, 75-85	
RESUM I DISCUSSIÓ DELS RESULTATS	43
1. Estructura de l'enzim ADH8	

2. El lloc d'unió a substrat	
3. El sistema de transferència protònica (“proton-relay”)	
4. Estructura del NADP ⁺ i les interaccions	
CAPÍTOL 3	49
Complete Reversal of Coenzyme Specificity by Concerted Mutation of Three Consecutive Residues in Alcohol Dehydrogenase. <i>Publicat a J. Biol. Chem.</i>	
RESUM I DISCUSSIÓ DELS RESULTATS	59
1. Efecte de les substitucions en l'Etapa limitant de la reacció i en la Constant Catalítica	
2. Modelat dels complexos binaris	
3. Reversió completa d'especificitat de coenzim en el triple mutant	
CAPÍTOL 4	67
<i>Apo and Holo structures of an NADP(H)-Dependent Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase from Saccharomyces cerevisiae.</i> <i>Enviat a J. Mol. Biol.</i>	
RESUM I DISCUSSIÓ DELS RESULTATS.....	105
1. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL PER A LA RESOLUCIÓ DE L'ESTRUCTURA CRISTAL·LINA DE ScAdh6p de <i>S. Cerevisiae</i>	106
1.1. Obtenció de diverses formes cristal·lines	
1.2. Recol·lecció de dades cristal·logràfiques	
2. TECNIQUES DE DIFRACCIÓ DE RAIGS X EN EL CONTEXT GENERAL DE LA CRISTAL·LOGRAFIA	107
2.1. Com resoldre el problema de fases	
3. DIFRACCIÓ ANÒMALA (MAD /SAD)	109
3.1. Els programes <i>SOLVE</i> i <i>RESOLVE</i>	

3.2	Determinació de l'estructura i refinament de <i>ScADH6p</i>	
4.	ANÀLISIS DE L'ESTRUCTURA RESOLTA DE <i>ScAdh6p</i>	112
4.1	<i>ScAdh6p</i> : <i>holo-</i> / <i>apo-</i> heterodímer estructural i "half- site reactivity"	
4.2	Especificitat d'unió a cofactor	
4.3	El centre catalític	
	CONCLUSIONS	123
	BIBLIOGRAFÍA	127

INTRODUCCIÓ

1. LA ALCOHOL DESHIDROGENASA

Les alcohol deshidrogenases (ADHs, EC 1.1.1.1), pertanyen a la classe enzimàtica de les oxidorreductases i es defineixen com els enzims que catalitzen l'oxidació d'alcohols primaris, secundaris i cíclics d'origen endogen o xenobiòtic als corresponents aldehids o cetones amb la consegüent reducció de NAD^+ o NADP^+ i la reducció d'aquests aldehids o cetones a l'alcohol corresponent (Reid, M. F. i Fewson, C. A., 1994; Jörnvall i Höög, 1995; Edenberg i Brown, 1997) Segons la seva estructura, les ADHs poden pertànyer a una de les tres grans famílies enzimàtiques: les deshidrogenases / reductases de cadena mitjana (MDRs), les deshidrogenases / reductases de cadena curta (SDRs) i les aldo-ceto reductasas (AKR) (Jörnvall i col., 1993; Persson i col., 1994; Persson i col., 1995; Jez i col., 1997)

La superfamília de les MDR, amb aproximadament un miler d'entrades en les bases de dades de seqüència de proteïna (Bateman, A. i col., 2002), involucra enzims que participen en una àmplia diversitat de funcions metabòliques com ara la fermentació alcohòlica, la detoxificació d'aldehids i alcohols o la biosíntesis d'àcids grassos. Els enzims MDR són enzims dimèrics o tetramèrics, amb una mida aproximada de subunitat de 350 aminoàcids, dividida en dos dominis diferenciats: un domini catalític i un domini responsable de la unió del coenzim (NAD(H) o NADP(H)), ambdós dominis estan separats per un solc hidrofòbic que forma la butxaca d'unió al substrat (Edenberg i Brown, 1997). Alguns exemples de la superfamília MDR són: alcohol deshidrogenasa,

lactat deshidrogenasa, malat deshidrogenasa i gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa. El contingut de zinc en aquests enzims varia de dos àtoms de zinc per subunitat (p.e.: alcohol deshidrogenasa de fetge de cavall), un per subunitat (p.e.: sorbitol deshidrogenasa) o no unir cap àtom de zinc (p.e.: ζ -crystalline; Borrás i col., 1989). El domini d'unió a coenzim està pròxim a la regió C-terminal i el centre actiu a l'extrem N-terminal.

El sistema enzimàtic de la ADH és de localització majoritàriament citoplasmàtica. Aquest sistema està àmpliament distribuït en totes les espècies, hi és present en organismes de tots els regnes en els que es classifiquen els éssers vius (Jörnvall i col., 1995). Diferents formes de ADH, caracteritzades com isoenzims, van ser identificades inicialment en humans. La família de les ADHs ha anat augmentant amb el descobriment de noves formes enzimàtiques (Parés i col., 1992; Yasunnam i col., 1991), el que ha donat lloc al terme de classe (Vallee i Bazzone, 1983). L'agrupació de les diferents ADH en classes es basa en la seva especificitat de substrat i propietats cinètiques, sensibilitat a l'inhibidor pirazol, mobilitat electroforètica en gel de midó, patró d'expressió, identitat de seqüència i anàlisis d'arbres filogenètics (Duester i col., 1999; Edenberg, 2000; Jörnvall i Höög, 1995; Vallee i Bazzone, 1983).

1.1. Les MDR de vertebrats

El sistema ADH de vertebrats constitueix un sistema complex amb diferents formes i una àmplia multiplicitat dividit en vuit classes (ADH1-ADH8) (Taula 1). En humans les ADHs estan codificades per almenys set gens diferents, els productes gènics d'aquests gens han estat agrupats en cinc classes que comparteixen al voltant d'un 60-70% d'identitat aminoacídica (Jörnvall i Höög, 1995).

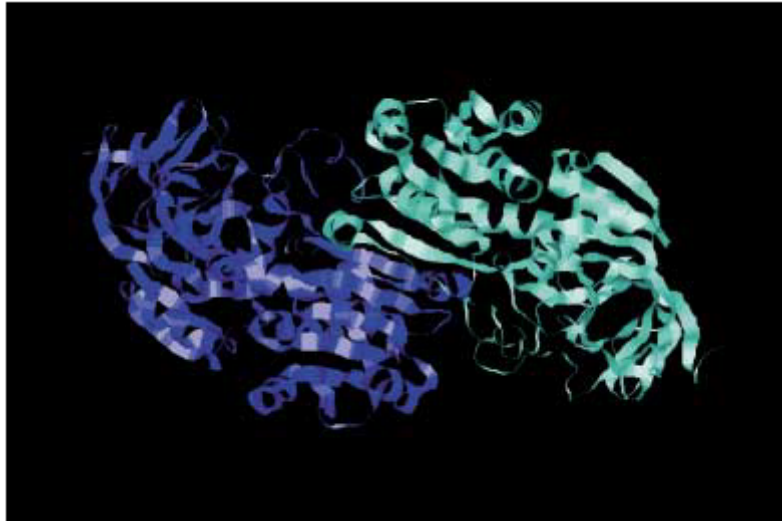
Taula 1. Nomenclatura proposada per les ADH de vertebrats

Espècie	Classe							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Humà	ADH1A (α) ADH1B (β) ADH1C (γ)	ADH2(π)	ADH3(χ)	ADH4(σ)	ADH5	-	-	-
Rata	ADH1	ADH2	ADH3	ADH4	-	ADH6	-	-
Ratolí	ADH1	ADH2	ADH3	ADH4A ADH4B	ADH5A ADH5B	-	-	-
Cavall	ADH1E ADH1S	-	ADH3	-	-	-	-	-
Pollastre	ADH1	-	ADH3	-	-	-	ADH7	-
Granota	ADH1	-	ADH3	-	-	-	-	ADH8

Entre parèntesis està indicada la nomenclatura clàssica, amb lletres gregues, de les subunitats enzimàtiques de les ADH humanes (Dolney i col., 2001; Duester i col., 1999; Peralba i col., 1999; Szalai i col., 2002).

Cada una de les vuit classes d'enzims ADH de vertebrats estan relacionades amb el metabolisme de l'etanol i amb la transformació de una varietat d'alcohols i aldehids d'importància fisiològica com són: retinoids, esteroids i aldehids citotòxics (Duester i col., 1999).

A vertebrats, tots els membres de la família ADH són metaloenzims, que contenen zinc, i formen part de la superfamília de les deshidrogenases / reductases de cadena mitjana (MDR). (Figura 1) són dímers d'aproximadament 80 KDa amb dos àtoms de zinc per subunitat. Presenten un domini característic format per hèlix α i fulles β , anomenat de Rossmann (Rossmann i col., 1974).



Cerveza y malta, 155, 27-38. Biosca i col.,2002.

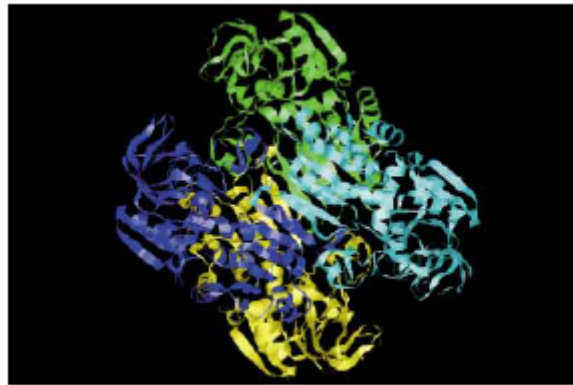
Figura 1. Estructura 3-D de la ADH de fetge de cavall. Estan indicades en blau i lila les dues subunitats de les que consta el dímer funcional. Cada subunitat uneix dos àtoms de zinc, una molècula de coenzim (NAD o NADH) i una de substrat (alcohol o aldehyd). (Figura obtinguda de Meijers, R. i col., 2001. J.Biol.Chem. 276, 9316-9321.)

1.2. Les MDR A *S.cerevisiae*

Els enzims MDR de llevat, estan agrupats en vuit famílies proteiques, quatre d'aquestes contenen una seqüència consens, present a totes les ADHs que uneixen zinc en el seu centre actiu. En el genoma de *S.cerevisiae* s'han identificat 17 gens potencials, codificadors de MDRs (Jörnvall, H., Höög, J. O. i Persson, B. , 1999; 2. Jörnvall, H., Shafqat, J. i Persson, B., 2001) que es poden classificar dintre de les quatre famílies descrites de la següent manera:

- ADHs dimèriques: Sfa1p (família ADH)
- ADHs tetramèriques: Adh1p, 2p, 3p i 5p (família YADH)
- Poliol deshidrogenases : Sor1p, Sor2p, Xy12p, Bdh1p i Ya1061p (família PDH)
- Cinamil alcohol deshidrogenases: Adh6p, Adh7p (família CAD)

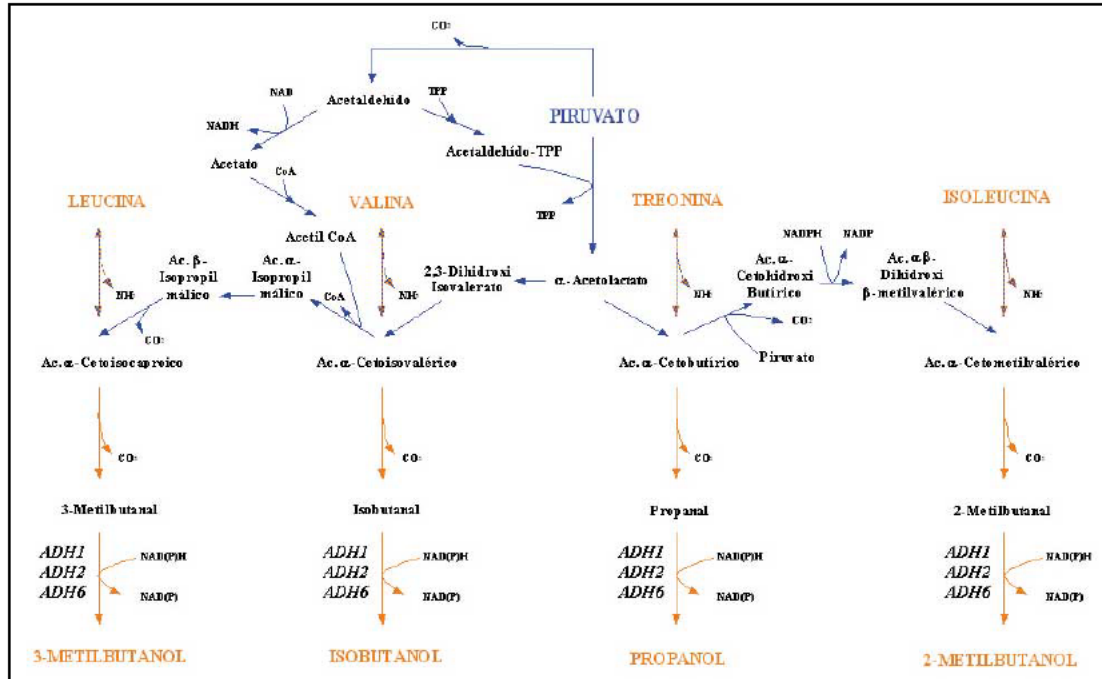
En general, les proteïnes codificades per aquests gens de llevat tenen una funció poc coneguda. Es coneixen les estructures cristal·lines de diversos membres de ADH, YADH i PDH, però no es coneixia fins al moment cap estructura de la família de les CAD (Figura 2).



Cerveza y malta, 155, 27-38. Biosca i col.,2002.

Figura 2. Estructura 3-D d'una ADH de *Thermoanaerobacter brockii*. L'estructura de l'enzim es tetramèrica, i cada monòmer està representat en diferent color (blau, lila ,verd i groc). Cada monòmer està compost per dos dominis: un responsable de la unió del coenzim (NADP en aquest cas) i l'altre responsable de la unió del substrat. El tetràmer està format per dos dímers, cada un estructuralment homòleg al dímer de la ADH de vertebrats (les subunitats marcades en blau i lila en aquesta figura, estan disposades com les subunitats marcades en blau i lila de la figura 1). Figura obtinguda de Korkhin, Y., Kalb(Gilboa), A. J., Peretz, M., Bogin, O., Burstein, Y., Frolov, F. (1998). *J. Mol. Biol.* **278**, 967-981.

Les ADHs responsables del metabolisme de l'etanol en llevat són MDRs que uneixen zinc. Aquests alcohols influeixen en les propietats organolèptiques de les begudes alcohòliques i deriven del catabolisme dels esquelets carbonats dels aminoàcids Val, Leu, Thr, Ile i Phe, principalment inclouen al isobutanol, 2-metilbutanol, 3-metilbutanol i 2-feniletanol, que es formarien a partir dels corresponents aldehids a través d'una reducció (Figura 3). Tot i que s'ha implicat a la Adh1p i Adh2p (ADHI i ADHII segons la nomenclatura clàssica) en aquestes reaccions, l'enzim Adh6p (ADHVI segons la nomenclatura clàssica) també podria intervenir, donada l'elevada eficiència catalítica que presenta amb aquests substrats. Una funció alternativa de la Adh6p estaria relacionada amb la seva capacitat de reducció del veratraldehid i anisaldehyd (Figura 6). Aquesta activitat que ha estat implicada en la capacitat de metabolitzar lignina que tenen alguns fongs, donaria a *S.cerevisiae* l'oportunitat de "viure" en entorns ligninolítics a on existirien els anomenats compostos, derivats de la degradació de la lignina iniciada per altres fongs.



Cerveza y malta, 155, 27-38. Biosca i col.,2002.

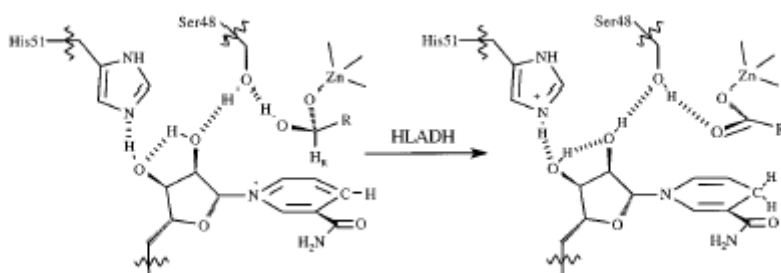
Figura 3. Esquema metabòlic de la producció dels alcohols superiors en *S.cerevisiae*. Els alcohols superiors deriven del catabolisme dels esquelets carbonats dels aminoàcids Leu, Val, Thr, Ile y Phe. En l'última etapa de reducció dels corresponents aldehids, s'han implicat les ADHI y II dependents de NADH (Adh1p i Adh2p segons la nomenclatura actualitzada), però també la ADHVI dependent de NADPH (ScAdh6p) podria participar en aquesta transformació

1.3. Metabolisme d'oxidació / reducció als éssers vius

La major part de les reaccions d'oxidació/reducció que s'efectuen a l'organisme no involucren la participació directa de l'oxigen molecular, sinó que els electrons són transferits a/o des de molècules específiques (p.e. NAD^+ que es redueix a NADH). Aquest mateix tipus de molècules s'utilitzen per a reduir metabolits per mitjà de la transferència d'un ió hidrur (p.e. NADPH s'oxida a $NADP^+$).

El mecanisme de reacció de la ADH1 de fetge de cavall s'ha utilitzat com a model per descriure la reacció pròpia de ADHs en el seu paper d'oxidació/reducció de substrats, aquests mecanisme es pot descriure de la següent manera: quan el substrat és un alcohol, la unió del ió zinc i el NAD^+ carregat positivament fa canviar el pKa de l'alcohol i es produeix un alcoholat. Això facilita la transferència hídrida (alliberació

protònica o *proton relay*) a partir de l'alcohol cap al NAD^+ . La Ser48 probablement és important per la transferència del protó a partir del grup hidroxil de l'alcohol cap a la superfície de la proteïna a través d'una alliberació protònica que involucra també la meitat 2'-hidroxil de la ribosa i l'imidazol de la His51 (Eklund i col., 1985; Borrás i col., 1989; Eklund i col., 1994; Fersht, 1999). Generalment la ADH1 de cavall s'associa amb la interconversió d'alcohols i aldehids (Brändén i col., 1975), però també té la capacitat de catalitzar l'oxidació d'aldehids (Figura 4).



Biochemistry, Vol. 35, No. 30, 1996 Olson I col.

Figura 4. Oxidació d'un aldehid hidratat per NAD^+ en el centre actiu de l'alcohol deshidrogenasa de fetge de cavall. El protó de l'aldehid hidratat està connectat per una sèrie de ponts d'hidrogen amb la His51 i per tant amb el solvent.

En mamífers les ADHs més estudiades han estat les ADH1 i ADH4 pel seu alt nivell d'expressió en teixits i la seva activitat vers etanol i retinol (Boleda i col., 1993). L'oxidació del retinol a retinal és l'etapa inicial en la síntesi de l'àcid retinoic, que actua com un important modulador de l'expressió gènica (Ray i col., 1997; White i col., 1997; 2000) La formació d'àcid retinoic, a partir de retinol, implica dues etapes d'oxidació. Una primera oxidació / reducció de retinol a retinal que és reversible i el pas limitant de la via; i una segona oxidació de retinal a àcid retinoic, que és una reacció irreversible.

Mentre que la ADH1 està present a tots els vertebrats, la ADH4 només ha estat descrita a mamífers. En la recerca de la ADH4 en amfibis es va trobar un enzim amb propietats cinètiques similars a la ADH4 però, sorprenentment, amb especificitat cap a NADP(H) en comptes de cap a NAD(H) , el coenzim comú per a totes les ADHs des vertebrats descrites fins al moment, l'enzim ADH8.

1.4. Diferències estructurals entre conformacions *apo*- i *holo*-ADH

Els primers estudis comparatius entre les estructures dels enzims *apo*- i *holo*- en ADHs es van fer a partir del coneixement de l'estructura tridimensional del complex ternari de la ADH1 de cavall amb NADH i amb l'inhibidor dimetil sulfòxid, l'estructura es va resoldre independentment de la de l'apoenzim. La comparació dels mapes electrònics d'ambdues estructures (Eklund i Brändén, 1979) va permetre comprovar que la unió del NADH suposava un gran canvi de conformació de l'enzim. Tenia lloc un reordenament de la relació entre les tres principals parts de la molècula dimèrica. Els dos dominis d'unió a coenzim tenien orientacions similars, mentre que els dominis catalítics estaven rotats un respecte de l'altre. Les principals diferències conformacionals s'han descrit com a rotacions de cos rígid de cada domini catalític. El domini catalític rota 10° al voltant d'un eix que passa pel centre del mateix. Aquesta rotació aproxima $3\text{-}4\text{\AA}$ els dos dominis, catalític i d'unió a coenzim, aquests tindran dues connexions covalents en la cara del darrera del solc mentre que per l'altra cara només hi ha uns pocs i dèbils contactes de *van der Waals* . Aquestes interaccions han de canviar per permetre la rotació del domini catalític tal com ho mostra la figura 5.

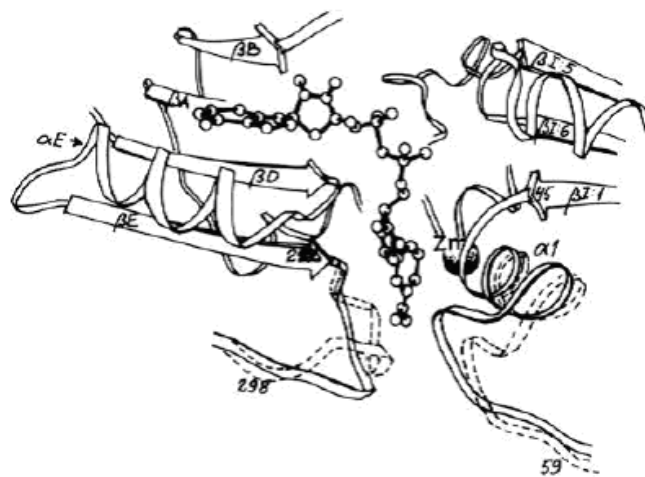


Figura 5. Interacció interdomini en l'estructura que conté el centre actiu i el coenzim. La part que es correspon amb l'apoenzim es mostra amb línies discontinues. (Nomenclatura segons Eklund i col., 1976; dibuixos de Bo Furungren)

A l'àrea d'interacció entre els dos dominis també es donen amplis moviments: els residus 294-297 del domini d'unió a coenzim han de desplaçar-se per deixar lloc als residus 51-58 del domini catalític.

A més de l'ampli moviment de rotació de cos rígid del domini catalític, hi ha petits canvis que són significatius en l'orientació del domini d'unió a coenzim (Eklund i col., 1984). Es pot descriure com una rotació del domini d'aproximadament 1.5° al voltant d'un eix que s'estén a través de les làmines β . El domini d'unió a coenzim es mou en direcció oposada cap al domini catalític a cada subunitat.

1.5. Descripció del fenomen “Half-site reactivity” a la ADH1 de cavall

La unió del cofactor a l'ADH1 de cavall dóna lloc a un canvi en la conformació quaternària de la proteïna (Bränden, 1965; Shore i Brooks, 1971), que afecta a la unió del substrat (Theorell i Chance, 1951; Wratten i Cleland, 1965). Es va mesurar la interacció del coenzim reduït (NADH) amb l'enzim mitjançant la quantificació l'emissió de fluorescència (Holbrook i col., 1972). Els resultats obtinguts mostraven com la unió de NADH-Enzim no donava evidències de cap tipus de cooperativitat. En canvi, sí es demostrava cooperativitat negativa en l'absorció del complex NAD-Enzim (Copeland i Bernhard, 1979).

Es va mesurar també la interacció NAD-Enzim en presència de concentracions variables d'àcid vitamina A, molècula capaç d'unir-se a l'holoenzim (Everse, 1973). El complex ternari és màxim (està en saturació) quan s'uneix una molècula d'àcid vitamina A per cada dímer de complex binari. Es pot veure, doncs, que es dóna una “half-site reactivity” si es forma aquest complex. En l'estudi de la formació del complex ternari amb benzamida i NADH (Bernhard i col., 1969; McFarland i Bernhard, 1972; Luisi i Favilla, 1972) es van identificar dues classes de llocs d'unió no equivalents. La “half-site reactivity” es pot demostrar a més en la reacció cinètica transient de la ADH1 de cavall amb aldehids i coenzim reduït (Bernhard i col., 1970).

L'Enzim ADH1 de cavall catalitza la reducció d'una gran varietat d'aldehids aromàtics per NADH. Al contrari d'altres reaccions enzimàtiques que involucren

“pseudosubstrats”, la velocitat de reacció amb aldehids aromàtics no és molt diferent a la que té amb el suposat “vertader” substrat, l’acetaldehid. Però, la velocitat de la reacció es satura a més baixa concentració amb aldehids aromàtics.

La reactivitat dels dos llocs (per dímer) no és equivalent. Es va postular que l’asimetria estructural del dímer HLADH fos induïda per la formació del complex ternari, de manera que una molècula de substrat per dímer d’holoenzim induiria l’asimetria. La “half-site reactivity” sembla estar relacionada amb limitacions estaquiomètriques a través d’un únic eix binari de la molècula oligomèrica. Hi ha ubiqüitat de “half-site reactivity” en els sistemes de cooperativitat negativa.

1.6. La ADH8: ADH dependent de NADP(H) a vertebrats.

L’enzim ADH8 es va aïllar d’estómac de *Rana perezi*, és una ADH amb una especificitat distintiva per NADP(H) ($K_{cat} / K_{mNADP}^+ = 5900 \text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ respecte $K_{cat} / K_{mNAD}^+ = 200 \text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$). Aquest enzim té una identitat d’aproximadament el 60% amb la resta de ADHs d’estructura coneguda, en un principi es va anomenar “ADH4-like”, però la seva especificitat pel cofactor NADP, única per un membre de la família de les ADHs d’animals i plantes, juntament amb la seva posició en els arbres filogenètics ha fet que se la classifiqui en una nova classe d’ADHs, i finalment se l’ha anomenat ADH8 (Peralba i col., 1999; Duester, 2000).

El fet que s’hagi trobat, en vertebrats, una ADH amb dependència per NADP(H) obre una sèrie de qüestions respecte al paper fisiològic específic de l’enzim i en quant a la seva relació estructural i evolutiva amb altres enzims. Totes les ADHs de vertebrats són dependents de NAD(H), es desconeix fins al moment quina és la raó per la qual només s’ha trobat una ADH dependent de NADP(H) en amfibis. Tal com passa amb altres ADHs dependents de NADP(H) s’esperaria que participés en el metabolisme reductor, sobretot perquè, en els teixits d’estómac de granota la relació de concentració de NADPH/NADP⁺ és molt elevada (Bannister, 1967) i també perquè els aldehids són millors substrats per aquests enzims que no pas els alcohols (Peralba i col., 1999).

L'ADH8 podria tenir un paper significatiu en el metabolisme del retinal, ja que tots els retinals fisiològics que es van assajar eren excel·lents substrats per l'enzim (Peralba i col., 1999). En particular, l'eficiència catalítica per all-*trans*-retinal ($33.8 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$) és la més elevada que s'ha descrit per ADH de vertebrats (Duester, 2000). Per aquest motiu s'ha proposat que la ADH8 podria actuar com a retinaldehid deshidrogenasa (Peralba i col., 1999) convertint el retinal en retinol.

Fins al moment només estaven disponibles estructures tridimensionals de ADHs dependents de NAD(H) tant de plantes com animals (Niederhut i col., 2001; Ramaswamy i col., 1996; Svensson i col., 2000; Yang i col., 1997; Sanghani i col., 2002; Xie i col., 1997). Les dades estructurals obtingudes a partir dels treballs que s'exposen en aquesta tesi mostren com cada subunitat d'ADH8 conté un domini catalític i un domini d'unió a coenzim. El domini d'unió a coenzim està compost per sis làmines β paral·leles similars a les que s'han trobat en altres ADHs dependents de NAD(H) (Figura 6) (Rossmann i col., 1974).

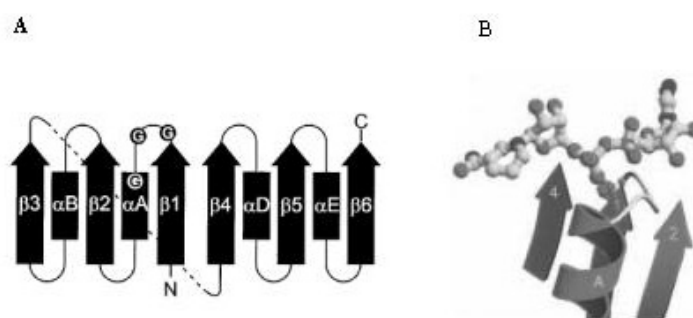


Figura 6. (A) Topologia del tipus de plegament de Rossmann. Amb fletges es senyalen les làmines β i amb els rectangles les hèlix. Els cercles representen els residus de glicina conservats. (B) A les ADHs el domini conservat de unió a NADH està conformat estructuralment pel tipus de plegament de Rossmann. (*Protein Science* (2002), 11;2125-2137)

En el complex ternari d'ADH8 unit a substrat i cofactor tindria lloc una rotació de cos rígid del domini catalític envers el domini d'unió a coenzim de manera semblant a com passa a altres ADHs, el solc del centre actiu es tancaria sobre el lloc d'unió a coenzim i la reacció es donaria en una conformació tancada. L'estructura de la forma apo-ADH1 de cavall presenta una conformació oberta (Eklund i col., 1976), mentre que els complexos binaris o terciaris de ADH1 de cavall (Eklund i Brändén, 1979; Eklund i

col., 1981) i humana (Niederhut i col., 2001; Hurley i col., 1994; Colonna-Cesari i col., 1986) i també d'ADH4 humana (Xie i col., 1997) mostren una conformació tancada. Alguns complexos binaris i ternaris de ADH1 de bacallà (Ramaswamy i col., 1996), ADH2 de ratolí (Svensson i col., 2000) i ADH3 humana (Yang i col., 1997) mostren en canvi estructures que s'han definit com a conformacions semiobertes. La unió del substrat al costat de Zn permet la transferència hídrida cap a l'àtom C4 de l'anell nicotinamida (Figura 2) (Eklund i Brändén, 1987). El protó hidroxil del substrat és eliminat a través d'un procés de "proton relay" que connecta el centre actiu amb el gruix del solvent. L'alliberació de cofactor, que sovint és l'etapa limitant de la catàlisi, completa el cicle retornant l'enzim a la conformació inicial.

1.7. Selectivitat envers NAD(H)/NADP(H)

L'especificitat d'enzim és una propietat important en les oxidoreductases dependents de NAD(P) i està lligada a la seva funció metabòlica. El tipus de coenzim: NAD⁺ o NADP⁺, sovint distingeix entre enzims involucrats en processos metabòlics alternatius (p.e. oxidació *versus* reducció o degradació *versus* biosíntesis).

Com que NAD⁺ i NADP⁺ només es diferencien estructuralment en un grup fosfat, s'esperaria que les deshidrogenases tinguessin un nombre de residus limitat per discriminar entre els dos tipus de coenzim. Les deshidrogenases de la mateixa família utilitzen el mateix tipus de plegament tant per unir un tipus de coenzim com l'altre. Fins i tot alguns enzims mostren activitat dual, significant això que poden usar totes dues afinitats amb eficiència similar (Backer i col., 1992).

Aquesta especificitat envers els coenzims NAD(H) o NADP(H) sembla estar regulada electrostàticament (Tanaka i col., 1996; Tsigelny i Baker, 1996; Nakanishi i col., 1996, 1997; Mazza i col., 1998). El grup fosfat extra carregat negativament a la posició O2' de l'adenosin-ribosa és la principal diferència entre aquests dos tipus de coenzims. Als enzims que preferentment uneixen NAD(H), pròxim a la posició d'aquest fosfat es troba un aminoàcid negatiu, el residu 223 està localitzat a l'extrem C-terminal de la segona làmina β del "Rossmann fold" (Rossmann i col., 1974) i està considerat en la classificació com un determinant de l'especificitat per coenzim. Els estudis de selectivitat envers cofactor s'havien centrat sobretot en l'anàlisi de mutagènesi d'aquest

residu que forma una unió per pont d'hidrogen amb el grup hidroxil de l'adenosin-ribosa del NAD(H) (Fan i col., 1991; Lauvergeat i col., 1995; Metzger i Hollenberg, 1995; Fan i Plapp, 1999). La substitució d'aquest aminoàcid carregat negativament per un carregat positivament incrementa l'afinitat envers NADP(H) i permet a l'enzim utilitzar aquest coenzim durant la catàlisi però aquestes mutacions no aconseguien tenir un fenotip totalment revertit, l'eficiència catalítica no era completa, per tant, s'esperaria que hi hagués altres residus implicats. Aquest residu substituït està acompanyat d'un o més residus positius, com podria ser la lisina, que també juguen un paper important en afavorir la interacció amb el grup fosfat extra del NADP(H).

1.8. Cinamil alcohol deshidrogenasa CAD

Els enzims CAD es van detectar originàriament en plantes (Luderitz i Grisebach, 1981), on catalitzen les darreres etapes de la biosíntesi de monolignols, els precursors de la lignina (Boerjan i col., 2003), s'ha vist com els arbres transgènics amb baixa activitat CAD són fàcilment deslignificats (Pilate i col., 2002). Es van caracteritzar primerament dos isoenzims amb activitat cinamil alcohol deshidrogenasa. La CAD1 que és un monòmer de 35 KDa, és actiu amb cinamaldehyd i sobretot amb coniferaldehyd (Figura 7), per el qual presenta una K_m de 25-70 μM , té un paper important en la lignificació vascular de plantes. La CAD2, a diferència de la CAD1, és un dímer de 72 KDa, actiu amb diferents cinamaldehyds. El seu millor substrat és el coniferaldehyd, amb una K_m bastant més baixa que la de la CAD1 (1 μM). La clonació i seqüenciació del cDNA corresponent a la CAD1 (Göffner i col., 1998), demostra com aquest enzim està relacionat amb la cinamil-CoA reductasa, també té activitat amb el benzialdehyd, i s'ha considerat com a una alcohol deshidrogenasa aromàtica.

Alguns membres de la família de les CADs de plantes descrits darrerament sembla que tenen diferents activitats enzimàtiques no relacionades amb la síntesi de lignina. Com per exemple les proteïnes EL13 involucrades amb la resistència de les plantes a malalties, aquest enzim té activitat amb benzil aldehyds aromàtics (Somssich i col., 1996). Una altra CAD de plantes, la MTD de *celery* mostra activitat manitol deshidrogenasa dependent de NAD (Williamson i col., 1995) i la seva funció està relacionada amb la tolerància a la salinitat i possiblement també amb la resposta a atacs

patogènics. Els enzims CAD s'han trobat també en bacteris i llevat sense que se'ls hagi reconegut fins al moment una funció clarament establerta.

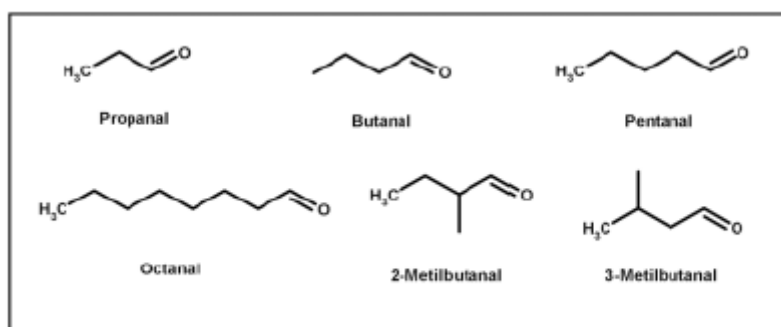
1.9. Els enzims CAD a *S.cerevisiae*

Els enzims Adh6p i Adh7p tenen un 60% d'homologia entre sí, tots dos enzims han estat classificats dins de la família de les CADs per la seva estructura primària i característiques enzimàtiques (Larroy i col., 2002). Tant la ScAdh6p com ScAdh7p usen NADP(H) com a cofactor i tenen una marcada especificitat de substrat amb alcohol primaris aromàtics i alifàtics (de cadena senzilla o ramificada) i alta activitat amb cinamil alcohol, cinamil aldehid i els seus derivats.

1.10. La ScAdh6 dependent de NADP(H)

L'enzim ScAdh6p és un enzim dimèric amb una mida de subunitat de 360 aminoàcids, dependent de NADP(H), que mostra activitat envers aldehids aromàtics, com benzaldehid, cinamaldehyd i veratraldehyd, i aldehids alifàtics, ja siguin lineals (com el pentanal, hexanal i heptanal) o ramificats (com 2-metilpropanal, 2-metilbutanal i 3-metilbutanal) (Figura 7). També catalitza les reaccions d'oxidació dels corresponents alcohol, encara que l'eficiència catalítica és molt major per a les reaccions de reducció.

A



B

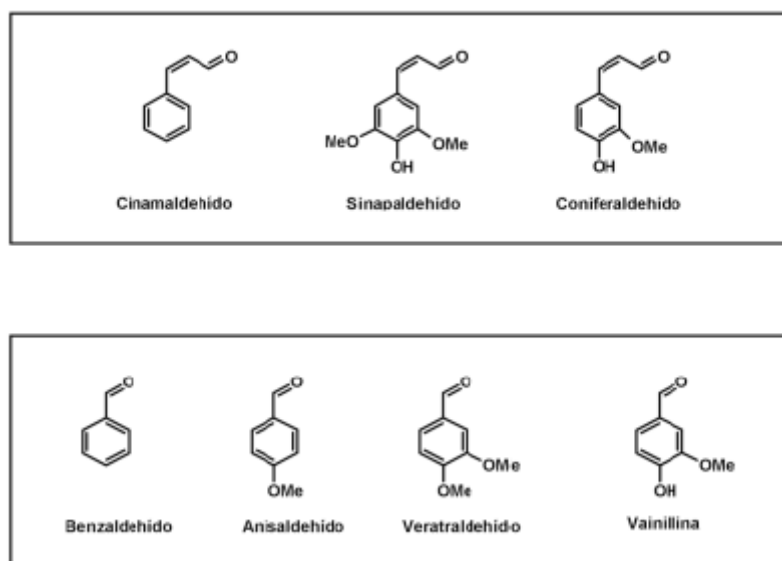


Figura 7. Fórmules estructurals de diferents aldehyds que són reduïts als corresponents alcohols per acció de la ScAdh6p, en una reacció dependent de NADPH. (A) Aldehyds alifàtics lineals i ramificats. (B) Aldehyds aromàtics.

No està clara la funció de l'enzim ScAdh6p però donada la seva elevada eficiència en la reducció d'aldehyds alifàtics ramificats, podria estar implicada en la síntesi d'alcohols superiors. És improbable que estigui relacionada amb la biosíntesi de lignina perquè aquest procés metabòlic no s'ha trobat a *S.cerevisiae* i l'enzim mostra baixa activitat amb els precursors de lignina sinapaldehyd i coniferaldehyd (Larroy i col., 2002). Podria ser que contribuís a la degradació de lignina ja que pot actuar sobre els productes derivats de la biodegradació d'aquesta, com són el veratraldehyd i anisaldehyd (Larroy i col., 2002). En qualsevol cas, ScAdh6p té molta similitud de seqüència amb algunes CADs de plantes implicades en la lignificació, p.e.: 53% amb CAD2 de *Eucalliptus gunnii* (Grima-Pettenati, 1993).

En el treball que es recull en aquesta tesi s'ha determinat l'estructura cristal·lina de la CAD dependent de NADP(H), ScAdh6p de *S.cerevisiae*. És la primera estructura 3D per un enzim CAD i també per un membre de la superfamília de les MDR a *S.cerevisiae*. Aquests resultats aporten un patró estructural per entendre el funcionament de la ScAdh6p que també pot ser utilitzat com una referència per les proteïnes CAD, en particular aquelles relacionades amb la lignificació.

OBJETIUS I ORGANITZACIÓ DE LA TESI

Amb la realització d'aquesta tesi doctoral es volia aprofundir en el coneixement de les ADHs que pertanyen a la superfamília de les MDR, contenen zinc i són dependents de NADP(H).

Les alcohol deshidrogenases (ADHs) són enzims que catalitzen l'oxidació reversible d'alcohols als corresponents aldehids o cetones, amb la consegüent reducció de NAD o NADP. La majoria de ADHs de llevat i vertebrats pertanyen a la superfamília de les deshidrogenases/reductases de cadena mitjana (MDR), concretament en vertebrats, tots els membres de la família ADH són metaloenzims, que contenen zinc i són MDRs. Les ADHs més estudiades en mamífers han estat la ADH1 i ADH4 pel seu alt nivell d'expressió en teixits i la seva activitat envers etanol i retinol (Boleda i col., 1993). Buscant la ADH4 en teixits d'amfibis, es va trobar un enzim amb propietats cinètiques similars però, sorprenentment, amb especificitat cap a NADP(H) en comptes de cap a NAD(H). Aquest enzim aïllat d'estómac de *R. Perezi*, exhibia alta activitat envers retinal (Peralba i col., 1999) i se li ha proposat una funció fisiològica en el procés de reducció del retinal, hipòtesis recolzada per l'elevada relació de concentració de NADPH/NADP⁺ a la cèl·lula.

Les ADHs de *S. Cerevisiae* clàssicament involucrades en l'assimilació i producció d'alcohol són enzims tetramèrics relacionats estructuralment amb les ADHs de vertebrats (Ciriacy i col., 1997). Recentment s'ha caracteritzat una nova ADH de llevat, anomenada ScAdh6p. Es tracta d'un dímer de 80KDa de pes molecular, i amb només un 26% d'identitat de seqüència amb la família d'enzims tetramèrics (Larroy i col., 2002). L'anàlisi de l'estructura primària mostrava que la ScAdh6p pertanyia a una família diferenciada d'entre les MDRs, les cinamil alcohol deshidrogenases (CADs) i com aquestes, utilitza NADP(H) com a cofactor, té especificitat de substrat amb alcohols hidrofòbics lineals i aromàtics i mostra alta activitat envers cinamil alcohol i cinamil aldehid. No hi havia fins al moment cap estructura resolta de cap membre de la família de les CADs.

La funció dels enzims CAD encara no ha estat clarament establerta. Les estructures conegudes més properes a la ScAdh6p són la de la Cetosa reductasa dependent de NADP(H) de *Bemisia argentifolii* (Banfield i col., 2001) amb solament un 25% d'identitat i la ADH4 humana (Xie i col., 1997).

Així doncs, els objectius de la tesi s'han centrat en:

1. La cristal·lització i determinació de l'estructura de ADH8 de *R. perezii*.

Conèixer l'estructura de la ADH8 podria aportar les bases de l'especificitat única de cofactor d'aquest enzim i també serviria per explicar la seva peculiarment elevada activitat envers retinal.

2. La cristal·lització i resolució de l'estructura de la ScADH6p.

L'estructura cristal·lina de la CAD dependent de NADP(H) de *S. Cerevisiae* (ScAdh6p) seria la primera estructura tridimensional determinada per un enzim CAD així com per un membre de la superfamília de les MDRs a *S. Cerevisiae*. Ens proporcionaria un patró estructural per entendre el funcionament de la ScAdh6p que potser es podria utilitzar com a referència per les proteïnes CAD en general. A més aportaria informació addicional sobre l'especificitat envers els cofactor NADP(H).

La majoria dels resultats que es presenten en aquesta tesi han estat ja publicats, o estan en vies de publicació, en revistes científiques de difusió internacional, per la qual cosa la tesi s'ha organitzat en capítols de manera que cada un d'ells inclou una còpia de l'article publicat i un resum i discussió dels resultats que es presenten en l'esmentat article. A més, s'ha inclòs un apartat metodològic dins del capítol 4 on es descriu en profunditat les peculiaritats de la metodologia emprada en la resolució de la fase.

CAPÍTOL 1

**Cristallization and preliminary X-ray analysis of NADP(H)-
dependent alcohol dehydrogenases from *Saccharomyces cerevisiae* and
*Rana perezi***

Acta Crystallographica (2003). Section D59, 334-337.

Crystallization and preliminary X-ray analysis of NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Rana perezi*

Eva Valencia,^a Albert Rosell,^b
Carolina Larroy,^b Jaume Farrés,^b
Josep A. Biosca,^b Ignacio Fita,^a
Xavier Parés^b and Wendy F.
Ochoa^{a*}

^aIBMB-CSIC, Jordi Girona 18-26, E-08034
Barcelona, Spain, and ^bDepartament de
Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat
Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra
(Barcelona), Spain

Correspondence e-mail: wfocri@ibmb.csic.es

Different crystal forms diffracting to high resolution have been obtained for two NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenases, members of the medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily: ScADHVI from *Saccharomyces cerevisiae* and ADH8 from *Rana perezi*. ScADHVI is a broad-specificity enzyme, with a sequence identity lower than 25% with respect to all other ADHs of known structure. The best crystals of ScADHVI diffracted beyond 2.8 Å resolution and belonged to the trigonal space group $P3_121$ (or to its enantiomorph $P3_221$), with unit-cell parameters $a = b = 102.2$, $c = 149.7$ Å, $\gamma = 120^\circ$. These crystals were produced by the hanging-drop vapour-diffusion method using ammonium sulfate as precipitant. Packing considerations together with the self-rotation function and the native Patterson map seem to indicate the presence of only one subunit per asymmetric unit, with a volume solvent content of about 80%. ADH8 from *R. perezi* is the only NADP(H)-dependent ADH from vertebrates characterized to date. Crystals of ADH8 obtained both in the absence and in the presence of NADP⁺ using polyethylene glycol and lithium sulfate as precipitants diffracted to 2.2 and 1.8 Å, respectively, using synchrotron radiation. These crystals were isomorphous, space group $C2$, with approximate unit-cell parameters $a = 122$, $b = 79$, $c = 91$ Å, $\beta = 113^\circ$ and contain one dimer per asymmetric unit, with a volume solvent content of about 50%.

Received 9 July 2002

Accepted 12 September 2002

1. Introduction

Most alcohol dehydrogenases (ADHs) of wide substrate specificity from yeast and vertebrates are members of the medium-chain dehydrogenase/reductase (MDR) superfamily, which has been divided into different enzyme families with regard to structural and functional relationships (Jörnvall *et al.*, 2001).

The classical *S. cerevisiae* ADHs involved in alcohol production and assimilation are tetrameric enzymes structurally related to vertebrate ADHs (Ciriacy, 1997). We have recently reported the characterization of a new yeast ADH, named ADHVI, presumably a dimer of molecular weight 80 kDa, with only 26% sequence identity to the tetrameric enzyme family (Larroy *et al.*, 2002). Primary structure analysis shows that ADHVI belongs to a different family within the MDRs, the cinnamyl alcohol dehydrogenases (CADs; 37% identity). Consistent with this, ADHVI uses NADP(H) as a cofactor, exhibits a broad substrate specificity with aromatic and linear hydrophobic alcohols and shows high activity towards cinnamyl alcohol and cinnamyl aldehyde. In plants, CAD enzymes participate in the synthesis of cinnamyl alcohol derivatives in the last steps of lignin biosynthesis (Luderitz &

Grisebach, 1981). Since *S. cerevisiae* does not synthesize lignin, we hypothesized that the yeast ADHVI could contribute to lignin degradation and the last step of the synthesis of fusel alcohols derived from amino-acid and α -ketoacid metabolism (Larroy *et al.*, 2002). No crystallographic structure has been reported for any member of the CAD family. The closest known structures to ADHVI (25% identity) are of a NADP(H)-dependent ketose reductase from the whitefly *Bemisia argentifolii* (Banfield *et al.*, 2001) and human ADH4 (Xie *et al.*, 1997).

In vertebrates, ADHs constitute a family of eight different classes involved in ethanol metabolism and also in the transformation of a variety of alcohols and aldehydes of physiological importance, such as retinoids, steroids and cytotoxic aldehydes (Duester *et al.*, 1999). All ADHs from vertebrates are dimers of about 80 kDa and contain two Zn atoms per subunit. In mammals, ADH1 and ADH4 have been the most studied classes because of their wide expression level in tissue and their activity towards ethanol and retinol (Boleda *et al.*, 1993). The oxidation of retinol to retinal is the initial step in the synthesis of retinoic acid, an important modulator of gene expression. While ADH1 is present in all vertebrate

groups, ADH4 has only been described in mammals. In our search for an ADH4-type enzyme in amphibians, we found an enzyme with similar kinetic properties to those of ADH4 but, surprisingly, with specificity towards NADP(H) instead of NAD(H), the common coenzyme for all previously described vertebrate ADHs. This enzyme (ADH8) was isolated from the stomach of *R. perezii* and exhibited high activity towards retinal (Peralba *et al.*, 1999). In consequence, we proposed a physiological function in retinal reduction for ADH8, which is also supported by the high cellular NADPH:NADP⁺ ratio.

Several crystallographic structures of vertebrate ADHs are known: horse ADH1 (Eklund *et al.*, 1976), human ADH1B1, ADH1B2 and ADH1B3 (Hurley *et al.*, 1994), human ADH1A and ADH1C2 (Niederhut *et al.*, 2001), cod ADH1 (Ramaswamy *et al.*, 1996), mouse ADH2 (Svensson *et al.*, 2000), human ADH3 (Yang *et al.*, 1997) and human ADH4 (Xie *et al.*, 1997). All of them correspond to NAD(H)-dependent enzymes and exhibit less than 57% identity with the present amphibian ADH8. Crystallization and structure determination of ADH8 would provide the basis for the unique cofactor specificity of this

Table 1
Data-collection statistics.

Values in parentheses refer to the outer shell.

	ADH8	ADH8 (NADP ⁺)	ScADHVI
Space group	C2	C2	<i>P</i> ₃ 121 or <i>P</i> ₃ 21
Unit-cell parameters (Å, °)	<i>a</i> = 122.5, <i>b</i> = 79.5, <i>c</i> = 91.9, β = 113.1	<i>a</i> = 122.2, <i>b</i> = 79.5, <i>c</i> = 91.8, β = 112.8	<i>a</i> = <i>b</i> = 102.2, <i>c</i> = 149.7, γ = 120
No. measured reflections	150436	254342	120598
No. unique reflections	79197	140960	22735
Resolution (Å)	2.20 (2.28–2.20)	1.80 (1.86–1.80)	2.80 (2.90–2.80)
<i>R</i> _{merge} [†] (%)	11.3 (44.7)	4.8 (33.1)	7.7 (40.0)
Completeness (%)	98.4 (99.0)	96.1 (74.2)	99.8 (99.8)
<i>I</i> (σ(<i>I</i>))	11.8 (2.6)	14.4 (1.6)	24.3 (2.2)
Mosaicity (°)	0.4	0.4	0.2

[†] $R_{\text{merge}} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum I_i$, where I_i is the measured intensity of an individual reflection and $\langle I \rangle$ is the average intensity of the symmetry-related measurements of this reflection.

enzyme and for its particularly high activity towards retinal.

In the present report, we describe the crystallization and the crystal properties of two ADHs from the MDR superfamily: *S. cerevisiae* ADHVI, an NADP(H)-dependent ADH and the first member crystallized of the CAD family, and amphibian ADH8, the first NADP(H)-dependent ADH member of the vertebrate ADH family.

2. Experimental results

2.1. Crystallization, data collection and X-ray analysis

2.1.1. NADP(H)-dependent ADHVI from *S. cerevisiae* (ScADHVI). ScADHVI was obtained from yeast cells by a modification of a previously described protocol (Larroy *et al.*, 2002). The modification consisted of performing the DEAE-Sepharose chromatography at pH 8.0 instead of pH 7.0, which resulted in increased purity and allowed bypassing of the hydroxyapatite column. Pure enzyme was used in crystallization screening using the hanging-drop vapour-diffusion method. 1 μl drops of concentrated sample (6 mg ml⁻¹) were mixed with the same volume of a reservoir solution containing 2 M ammonium sulfate (AS) and equilibrated at 293 K against a reservoir volume of 1 ml. Well developed bipyrarnidal hexagonal crystals reaching 0.4 × 0.4 × 0.6 mm in size appeared in 2 d (Fig. 1). These crystals belong to space group *P*₃121 (or to its enantiomorph *P*₃21), with unit-cell parameters *a* = *b* = 102.2, *c* = 149.7 Å, γ = 120°. An X-ray diffraction data set was collected using synchrotron radiation and a MAR CCD detector at ESRF (Grenoble, France) at 100 K with 20%(v/v) glycerol as cryoprotectant. Data were processed and scaled with the programs *DENZO* and

SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1996), respectively, giving an overall *R*_{merge} of 7.7% and a completeness of 99% at 2.8 Å (Table 1). An X-ray fluorescence scan of one of the crystals (performed on beamline BM14) showed a clear absorption edge with the peak at 9671.4 eV, strongly supporting the existence of Zn ions in ScADHVI (Kim & Howard, 2002).

Packing considerations indicate that, assuming a protein-subunit molecular weight of about 40 kDa, these crystals could contain one, two or three subunits per asymmetric unit, with corresponding volume solvent contents ranging from 80 to 42% (Matthews, 1968). In turn, the absence of significant peaks in both the native Patterson map and in the self-rotation function (Fig. 2) makes the existence of non-crystallographic symmetry unlikely, although molecular twofold axes oriented almost parallel to the crystallographic twofold axis are still possible. The weakness of the diffraction at high resolution despite the good morphology and size of the ScADHVI crystals could also be related to a high solvent content. Even if these crystals contain only one subunit per asymmetric unit, the ScADHVI molecules could be homodimers as suggested by Larroy *et al.* (2002) if the molecular and crystallographic twofold axes coincide.

No solution has yet been obtained by molecular replacement with the programs *AMoRe* (Navaza, 1994) and *BEAST* (Read, 2001) using search models derived from human ADH1B1 (Hurley *et al.*, 1991), human ADH4 (Xie *et al.*, 1997), horse ADH1 (Adolph *et al.*, 2000) and ketose reductase (Banfield *et al.*, 2001) and from combinations of the N-terminal catalytic and coenzyme-binding domains of these structures. All ADH molecules used as search models exhibit sequence identities with ScADHVI of below 25% which, together

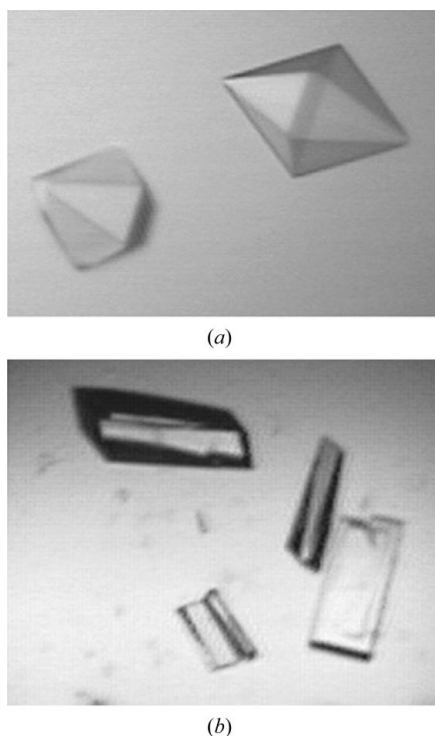


Figure 1
Crystals of (a) ScADHVI and (b) ADH8. Despite the size and good morphology of the ScADHVI crystals, diffraction was extremely weak beyond approximately 2.8 Å resolution, which may be related to the high solvent content.

with the difficulties in finding a molecular-replacement solution, suggests significant structural differences. Searches for heavy-atom derivatives and MAD experiments at the Zn edge are now under way.

2.1.2. NADP(H)-dependent ADH from *R. perezii* (ADH8). Wild-type ADH8 cDNA was obtained from isolated poly(A)⁺ RNA and cloned into pBluescript II SK (+) (Peralba *et al.*, 1999). Cloning into pGEX 4T-2 (Amersham Pharmacia Biotech) was performed by amplification of the coding region using the polymerase chain reaction (PCR) with two specific primers, RanaL (5'-TTATAGGATCCATGTGCACTGCGGG-AAAAGAT-3') and RanaR (5'-CCACCTGAATTCCTTAGTATATCATAATGCTTCG-3'), including restriction sites (bold) for *Bam*HI and *Eco*RI, respectively. The resulting PCR product was purified by means of the Concert Rapid Gel Extraction System (Life Technologies) and then cloned into the *Bam*HI and *Eco*RI sites of pGEX 4T-2. *Escherichia coli* BL21 competent cells were transformed with the construct.

Expression and batchwise purification were carried out by means of the GST Gene Fusion System (Amersham Pharmacia Biotech). Wild-type cDNA was expressed by inoculating 2×YT liquid medium, containing 75 µg ml⁻¹ ampicillin, with an overnight culture (1:100 dilution) of BL21 cells containing the pGEX 4T-2 harbouring the ADH8 cDNA. Cells were grown at 276 K until an absorbance of 0.8–1.0 at 600 nm was reached. Isopropyl β-D-thiogalactoside was then added to a final concentration of 0.1 mM. Bacteria were incubated for 15 h at 296 K and then harvested by centrifugation and stored at

193 K. The pellet was resuspended (100 ml per litre of culture) in cold phosphate-buffered saline (1×PBS; 1.8 mM KH₂PO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl pH 7.3) containing 2.5 mM dithiothreitol (DTT). Cells were treated with a 1 mg ml⁻¹ final concentration of lysozyme for 30 min at 277 K, sonicated, incubated with bovine DNase for 30 min at 277 K and finally treated with 1% (v/v) Triton X-100 for 30 min at 277 K to aid in solubilization of the fusion protein. Cell debris was separated by centrifugation at 12 000g for 15 min at 277 K.

A batchwise purification of the fusion protein was carried out by incubation of the cleared cell lysate with glutathione Sepharose 4B (2 ml 50% matrix per litre of culture) at room temperature for 90 min with gentle agitation. The suspension was centrifuged at 500g for 5 min at 277 K and the supernatant was discarded. The matrix containing bound protein was washed three times with 1×PBS by gentle agitation. All centrifugations for washing and elution were performed as described above. Fusion protein bound to matrix was cleaved with thrombin (50 U per litre of culture) by agitation for 15 h at room temperature. Following incubation, the suspension was centrifuged to pellet Sepharose beads. The GST portion of the fusion protein remained bound to the matrix, while the eluate contained ADH8. The purification buffer was exchanged using Centricon Plus-20 (Millipore) to 10 mM sodium phosphate/NaOH pH 6.5 containing 2.5 mM DTT. The protein was then further concentrated and stored at 193 K. The fraction containing ADH activity was subjected to an additional

affinity chromatography step in Red Sepharose CL-6B (Amersham Pharmacia Biotech) to eliminate thrombin. This purification was performed in batches as described above, but ADH8 was eluted in the presence of 0.6 M NaCl. This fraction was subjected to SDS-PAGE and Coomassie Blue staining to assess the degree of purity.

Samples of ADH8 with an initial protein concentration of 12 mg ml⁻¹ (Bradford, 1976) were used in crystallization screening with the hanging-drop vapour-diffusion method. Monoclinic crystals belonging to space group C2 were obtained in about a week using 20% PEG 4000 and 0.2 M LiSO₄ as precipitants in 0.1 M Tris-HCl pH 8 (Fig. 1). The size of the crystals increased, reaching 0.2 × 0.2 × 0.3 mm, when methanol was used as an additive. Crystals with the same morphology and about the same size were also obtained at 277 K under similar crystallization conditions from ADH8 samples that had been incubated overnight with 1 M NADP⁺ (Table 1).

Diffraction data were collected to 2.2 Å using synchrotron radiation at ESRF (Grenoble) from ADH8 crystals grown without nucleotide and flash-cooled to liquid-nitrogen temperature. The cryobuffer was prepared from the crystallization solution supplemented with glycerol to a final concentration of 25% (v/v) in three steps. In a similar way, a diffraction data set to 1.8 Å was collected from ADH8 crystals grown in the presence of NADP⁺. Both data sets were processed and scaled with the programs *DENZO* and *SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1996), giving overall *R*_{merge} values of

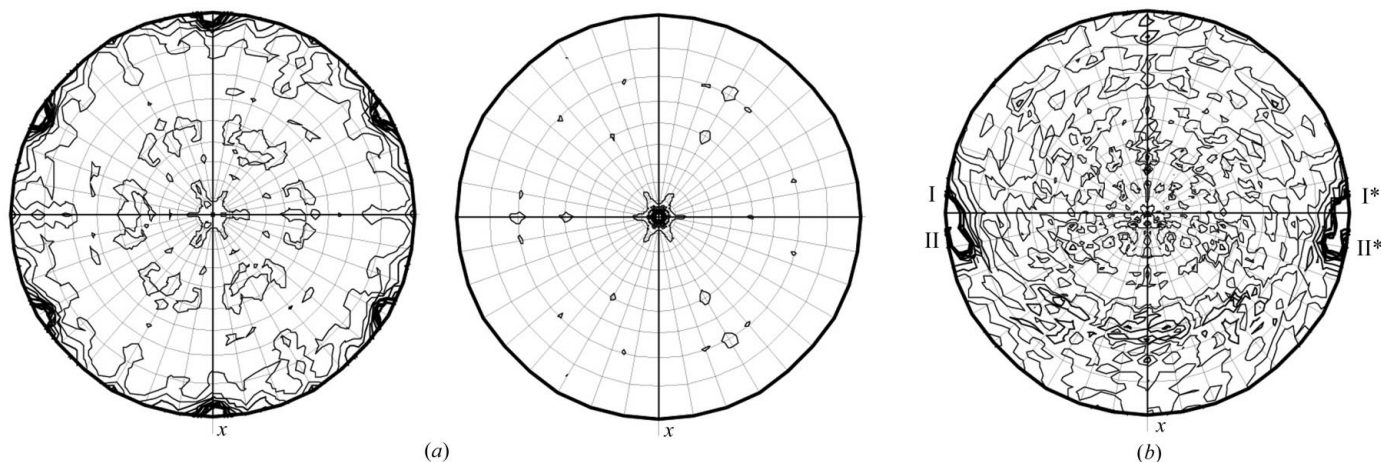


Figure 2 (a) Representation of the $\kappa = 180^\circ$ (left) and $\kappa = 120^\circ$ (right) sections containing the only significant peaks found in the self-rotation function of the ScADHVI crystals, which confirm the $3m$ point-group symmetry. (b) Representation of the $\kappa = 180^\circ$ section of the self-rotation function of ADH8 crystals. The largest peak, indicated I in the figure, corresponds to the crystallographic twofold axis. The second peak (II in the figure) corresponds to the molecular twofold axis. All self-rotation calculations were performed in the resolution range 20–3 Å with an integration radius of 30 Å.

11.3 and 4.8 and completenesses of 98 and 96%, respectively (Table 1). These crystals contain two protein subunits, corresponding to one molecule, in the crystal asymmetric unit, with the molecular twofold axis approximately 10° from the crystallographic twofold axis (Fig. 2). A clear molecular-replacement solution, where the first peak in the rotation function was about twice the intensity of the second, has been found using the program *AMoRe* (Navaza, 1994) with a search model derived from the structure of human ADH1B1 (PDB code 1deh; Hurley *et al.*, 1991).

3. Conclusions

Different crystal forms diffracting to high resolution have been obtained for two NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenases: ScADHVI from *S. cerevisiae* and ADH8 from *R. perezii*. ScADHVI is a broad-specificity ADH (Larroy *et al.*, 2002), a member of the CAD enzymatic family, with a sequence identity lower than 25% with respect to all other ADHs of known structure. No molecular-replacement solution has yet been found, which suggests important structural differences from the available ADH structures. In turn, a preliminary molecular-replacement solution has already been found for ADH8, the only NADP(H)-

dependent ADH from vertebrates characterized to date.

The structure determination at high resolution of both ScADHVI and ADH8 would clarify the molecular peculiarities of the NADP(H)-dependent ADHs, particularly their cofactor preference. Moreover, the ScADHVI structure would provide the first three-dimensional approach to explain the structure–function relationships in the cinnamyl alcohol dehydrogenase family.

This work was supported by grants PB98-0855 to XP, BMC2000-0132 to JAB and BIO099-0865 to IF. Many thanks are given to X. Carpena for assistance with data collection.

References

- Adolph, H. W., Zwart, P., Meijers, R., Hubatsch, I., Kiefer, M., Lamzin, V. & Cedergren-Zeppezauer, E. (2000). *Biochemistry*, **39**, 12885–12897.
- Banfield, M. J., Salvucci, M. E., Baker, E. N. & Smith, C. A. (2001). *J. Mol. Biol.* **306**, 239–250.
- Boleda, M. D., Saubi, N., Farrés, J. & Parés, X. (1993). *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 85–90.
- Bradford, M. M. (1976). *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Ciriacy, M. (1997). *Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications*, edited by F. K. Zimmermann & K. D. Entian, pp. 213–223. Lancaster, Pennsylvania, USA: Technomic Publishing Co. Inc.
- Duester, G., Farrés, J., Felder, M. R., Holmes, R. S., Höög, J. O., Parés, X., Plapp, B. V., Yin, S. J. & Jörnvall, H. (1999). *Biochem. Pharmacol.* **58**, 389–395.
- Eklund, H., Nordström, B., Zeppezauer, E., Söderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T., Söderberg, B. O., Tapia, O., Brändén, C. I. & Åkeson, Å. (1976). *J. Mol. Biol.* **102**, 27–59.
- Hurley, T. D., Bosron, W. F., Hamilton, J. A. & Amzel, L. M. (1991). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 8149–8153.
- Hurley, T. D., Bosron, W. F., Stone, C. L. & Amzel, L. M. (1994). *J. Mol. Biol.* **239**, 415–429.
- Jörnvall, H., Shaqfat, J. & Persson, B. (2001). *Chem. Biol. Interact.* **30**, 491–498.
- Kim, K. & Howard, A. J. (2002). *Acta Cryst.* **D58**, 1332–1334.
- Larroy, C., Fernandez, M. R., Gonzalez, E., Pares, X. & Biosca, J. A. (2002). *Biochem. J.* **361**, 163–172.
- Luderitz, T. & Grisebach, H. (1981). *Eur. J. Biochem.* **119**, 115–124.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Navaza, J. (1994). *Acta Cryst.* **A50**, 157–163.
- Niederhut, M. S., Gibbons, B. J., Pérez-Miller, S. & Hurley, T. D. (2001). *Protein Sci.* **10**, 697–706.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1996). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Peralba, J. M., Cedergren, E., Crosas, B., Moreno, A., Julià, P., Martínez, S. E., Persson, B., Farrés, J., Parés, X. & Jörnvall, H. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**, 26021–26026.
- Ramaswamy, S., El-Ahmad, M., Danielsson, O., Jörnvall, H. & Eklund, H. (1996). *Protein Sci.* **5**, 663–671.
- Read, R. J. (2001). *Acta Cryst.* **D57**, 1373–1382.
- Svensson, S., Höög, J. O., Schneider, G. & Sandalova, T. (2000). *J. Mol. Biol.* **302**, 441–453.
- Xie, P., Parsons, S. H., Speckhard, D. C., Bosron, W. F. & Hurley, T. D. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 18558–63.
- Yang, Z. N., Bosron, W. F. & Hurley, T. D. (1997). *J. Mol. Biol.* **265**, 330–343.

RESUM DELS RESULTATS DE L'ARTICLE: Crystallization and preliminary X-ray analysis of NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Rana perezi*

Acta Crystallographica (2003). Section D59, 334-337.

En el resum del paper que ens ocupa en aquest capítol estan descrits els processos de cristal·lització, recol·lecció de dades i anàlisi de la difracció de raigs-X per les dues proteïnes, MDRs, dependents de NADP(H) que han estat les protagonistes d'aquesta tesi i que són respectivament els enzims ADH8, ADH dependent de NADP(H) de *R. Perezi* i ScAdh6p, ADHVI dependent de NADP(H) de *S. Cerevisiae*. Els processos d'expressió i purificació d'ambdues proteïnes no s'inclouen en els continguts de la tesi, tot i que estan descrits en aquest document perquè són imprescindibles per entendre com s'han originat les estructures resoltes. Els treballs de cristal·lització i resolució de les estructures són els que en realitat formen part d'aquesta tesi.

1. Cristal·lització i anàlisi de dades d'ADH8 dependent de NADP(H) de *R. Perezi*

La proteïna recombinant es va obtenir expressada a *E.coli* (BL21) a partir d'una construcció en pGEX4T-2 que contenia el cDNA de l'enzim amplificat per PCR a partir del gen clonat prèviament al vector pBluescript II SK (+) (Peralba i col, 1999). L'enzim es va purificar amb el sistema de fusió al gen GST (Amersham Pharmacia Biotech), amb columnes *glutathione Sepharose* 4B amb un pas posterior de purificació amb *Red Sepharose* CL-6B seguint els protocols que es descriuen en el paper.

Les mostres que es van utilitzar en els assaigs de cristal·lització contenien la proteïna ADH8 a una concentració de 12mg/ml. Es va emprar el mètode de difusió de vapor en gota-penjan. Després d'aproximadament una setmana equilibrant-se amb 20% PEG 4000 i 0.2M LiSO₄ com precipitants en una solució 0.1M Tris-HCl i pH8, a 20°C apareixien cristalls monocíncics del grup espacial C2, que es poden veure a la figura 1b del paper. La mida dels cristalls augmentava si a més s'utilitzava metanol com additiu, arribant fins a 0.2 × 0.2 × 0.3 mm.

Es van aconseguir cristalls de les mateixes característiques morfològiques i sota les mateixes condicions a partir de mostres de ADH8 que havien estat incubades tota la nit amb NADP⁺ a concentració 1M. Els cristalls van ser congelats en tres etapes amb tampó crio glicerol 25%(v/v) i es van obtenir dades usant radiació de sincrotró al ESRF (Grenoble) a la temperatura del nitrògen líquid. Les dades dels cristalls crescuts sense nucleòtid, es van recollir a 2.2Å i les dels cristalls crescuts en presència de NADP⁺ a 1.8Å. Totes dues col·leccions de dades es van processar i escalar amb els programes *DENZO* i *SCALEPACK* (Otwinowski i Minor, 1996), donant uns valors de R_{merge} de 11.3 i 4.8 i complituds de 98% i 96%, respectivament. Els estadístics de la recollida d'aquests cristalls apareixen a la taula 1 del paper.

Aquests cristalls contenen dues subunitats de proteïna, que es corresponen amb una molècula dimèrica, en la unitat asimètrica, amb l'eix binari molecular aproximadament a 10° de l'eix binari cristal·logràfic, tal com mostra la funció de *self-rotation* a la secció a $x = 180^\circ$ representada a la figura 2b del paper.

Es va obtenir una solució clara per reemplaçament molecular, utilitzant el programa *AMoRe* (Navaza, 1994). El primer pic de la funció de rotació era al voltant del doble d'intens que el segon quan s'utilitzava un model derivat de l'estructura de la ADH1B1 humana (codi PDB: 1deh; Hurley i col., 1991).

2. Cristal·lització i anàlisi preliminar de ScAdh6p, ADHVI dependent de NADP(H) de *S. Cerevisiae*

La proteïna recombinant es va obtenir a partir de l'expressió en cèl·lules de llevat utilitzant el protocol d'expressió i purificació publicat (Larroy i col., 2002), amb certes modificacions que estan descrites en el paper. Amb l'enzim purificat es van fer els "screenings" utilitzant el mètode de difusió de vapor en gota-penjat, barrejant 1µl de mostra de proteïna pura concentrada a 6mg/ml amb el mateix volum de solució del dipòsit contenint sulfat d'amoni a concentració 2M. Les mostres es deixaven equilibrar amb el contingut del dipòsit de 1ml de volum, a una temperatura de 20° C i després de dos o tres dies s'obtenien cristalls de diferents morfologies d'entre els qual, els més ben

desenvolupats eren uns cristalls hexagonals bipiramidals de dimensions $0.4 \times 0.4 \times 0.6$ mm, que es poden veure a la figura 1a del paper.

Es van recollir les primeres dades de difracció de raigs-X usant la radiació del sincrotró amb un detector MAR CCD al ESRF de Grenoble, França. Els cristalls, immersits en una solució crioprotectora (20%(v/v) de glicerol), es van congelar amb nitrogen líquid i van ser exposats a la radiació de sincrotró a una temperatura també de 100K. Aquests cristalls pertanyien al grup espacial $P3_121$ (o al seu enantiomorf $P3_221$) (després vam saber que eren del grup espacial $P3_221$), amb uns paràmetres de cel·la $a=b=102.2$, $c=149.7\text{\AA}$, $\gamma=120^\circ$. Les dades es van processar i escalar amb els programes *DENZO* i *SCALPACK* (Otwinowski i Minor, 1996), respectivament, obtenint un R_{merge} del 7.7% i una complitud del 99% a 2.8\AA , els valors estadístics de la dades recollides apareixen a la taula 1 del paper.

Donada la baixa homologia amb altres estructures conegudes que era solament del 26% d'identitat de seqüència amb l'estructura més propera, la de Cetosa reductasa dependent de NADP(H) de *Bemisia agentifolii* (Mark J. Banfield i col., 2001), era d'esperar que trobéssim gran dificultat en resoldre la fase amb mètodes reemplaçament molecular. Seria necessari utilitzar altre tipus d'estratègia per resoldre l'estructura, tècniques com MIR, SIR, MAD o SAD amb la informació de la fase derivada de la difracció anòmala d'àtoms pesants. Per aquesta raó ens interessava conèixer l'existència de senyal anòmala causada per la presència constitutiva dels dos àtoms de Zn que havien estat descrits per a la molècula (Kim i Howard, 2002). Es va explorar els cristalls doncs, amb raigs-X de fluorescència, aquests mostraven una clara fracció d'absorció amb un pic de 9671.4eV , indicant l'existència de ions de Zn en la ScAdh6p.

Considerant el tipus d'empaquetament dels cristalls i tenint en compte que el pes molecular per subunitat era d'aproximadament 40KDa, ja amb aquesta primera recollida de dades podíem deduir que contindrien una, dues o tres subunitats per unitat asimètrica en funció de quin fos el volum de solvent, considerant com a valor normal un contingut d'un 42% a un 80% (Matthews, 1968). La informació que aporta la manca de pics significatius tant en el mapa de *Patterson* natiu com en la funció de *self-rotation* que mostra la figura 2 del paper, fa improbable l'existència de simetria no-cristal·logràfica, excepte en el cas que

l'eix binari molecular es trobés orientat paral·lelament a l'eix binari cristal·logràfic. De fet la debilitat de la difracció a alta resolució tot i la bona morfologia i talla dels cristalls podria estar relacionada amb tenir un alt contingut de solvent. Es podia explicar que aquests cristalls tinguessin només una subunitat per unitat asimètrica tot i que les molècules de ScAdh6p fossin homodímers tal com havia estat descrit (Larroy i col., 2002) si l'eix binari molecular coincidís amb l'eix cristal·logràfic, això suposaria que els cristalls tinguessin un elevat contingut de solvent (80%), tal com més tard podríem comprovar.

Els intents per resoldre l'estructura per reemplaçament molecular amb programes com *AMoRe* (Navaza, 1994) i *BEAST* (Read, 2001) usant models d'altres ADHs no van donar fruit i més endavant vam recollir els espectres de difracció de cristalls que havien estat tractats per "soaking" amb metalls pesants i també d'altres cristalls nadius amb els espectres corresponents a les tres longituds d'ona per obtenir la difracció anòmala dels zincs amb la intenció de usar MAD i/o SAD, va ser aquests últim mètode que combinat amb les tècniques d'aplanament de solvent, importants donada la gran quantitat de solvent que contenien els cristalls, ens va oferir la solució de la fase.

CAPÍTOL 2

Crystal Structure of the Vertebrate NADP(H)-dependent Alcohol Dehydrogenase (ADH8)

J. Mol. Biol. (2003) **330**, 75-85

Crystal Structure of the Vertebrate NADP(H)-dependent Alcohol Dehydrogenase (ADH8)

Albert Rosell¹†, Eva Valencia²†, Xavier Parés¹, Ignacio Fita²
Jaume Farrés¹ and Wendy F. Ochoa^{2*}

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

²IBMB-CSIC, Jordi-Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

The amphibian enzyme ADH8, previously named class IV-like, is the only known vertebrate alcohol dehydrogenase (ADH) with specificity towards NADP(H). The three-dimensional structures of ADH8 and of the binary complex ADH8–NADP⁺ have been now determined and refined to resolutions of 2.2 Å and 1.8 Å, respectively. The coenzyme and substrate specificity of ADH8, that has 50–65% sequence identity with vertebrate NAD(H)-dependent ADHs, suggest a role in aldehyde reduction probably as a retinal reductase. The large volume of the substrate-binding pocket can explain both the high catalytic efficiency of ADH8 with retinoids and the high K_m value for ethanol. Preference of NADP(H) appears to be achieved by the presence in ADH8 of the triad Gly223–Thr224–His225 and the recruitment of conserved Lys228, which define a binding pocket for the terminal phosphate group of the cofactor. NADP(H) binds to ADH8 in an extended conformation that superimposes well with the NAD(H) molecules found in NAD(H)-dependent ADH complexes. No additional reshaping of the dinucleotide-binding site is observed which explains why NAD(H) can also be used as a cofactor by ADH8. The structural features support the classification of ADH8 as an independent ADH class.

© 2003 Published by Elsevier Science Ltd

Keywords: amphibian ADH; crystal structure; alcohol dehydrogenases; NAD(H); NADP(H)

*Corresponding author

Introduction

Medium-chain alcohol dehydrogenases (ADH) constitute in vertebrates a complex enzymatic system composed of at least seven NAD(H)-dependent classes: ADH1–ADH7.^{1,2} Recently, an ADH was described in the amphibian *Rana perezi* with a distinct NADP(H) specificity ($k_{cat}/K_{mNADP}^+ = 5900 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ versus $k_{cat}/K_{mNAD}^+ = 200 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$).³ This enzyme, that displays about 60% sequence identity with NAD(H)-dependent ADHs of known structures, was tentatively designed as an ADH4-like form. However, the unique cofactor dependence, for a member of the animal and plant ADH family, together with its position in the phylogenetic trees raised the possibility that the enzyme represented a new ADH class which was then named class VIII or

ADH8.^{3,4} This nomenclature is used in the present work.

The finding, in vertebrates, of an ADH with NADP(H) dependence opens a number of questions regarding particularly to the specific role of the enzyme, the structural and evolutionary relationships with the other, all NAD(H)-dependent, vertebrate ADHs and to the reasons for its unique detection in amphibians. ADH8, similarly to other NADP(H)-dependent enzymes, is expected to participate in the reductive metabolism mainly because of the low NADP⁺/NADPH concentration ratio in frog tissues,⁵ but also because aldehydes are much better substrates than the corresponding alcohols for this enzyme.³ ADH8 could also have a significant role in the retinal metabolism, since all physiological retinals assayed were excellent substrates for the enzyme.³ In particular, the catalytic efficiency for all-*trans*-retinal ($33.8 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) is the highest ever reported for an ADH from vertebrates.⁴ Thus, it has been proposed³ that ADH8 could act as retinaldehyde dehydrogenase, converting retinal, the major

† These two authors contributed equally to this work.

Abbreviations used: ADH, alcohol dehydrogenase.

E-mail address of the corresponding author:

wendy@scripps.edu

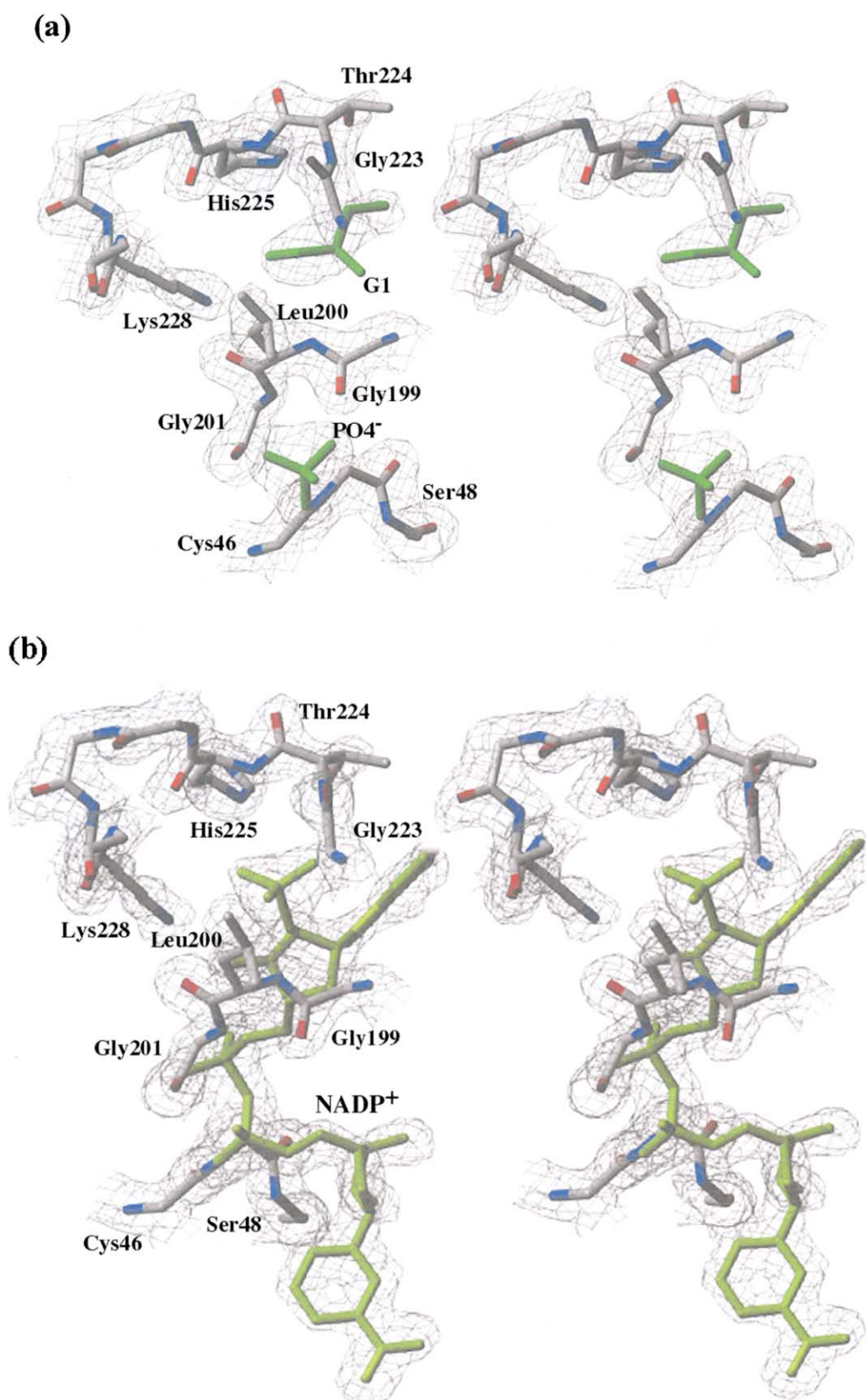


Figure 1. Stereo views of the cofactor-binding pocket in the crystal structures of the (a) *apo*-ADH8 and of the (b) ADH8-NADP⁺ complex. Molecular models are represented by solid sticks with protein atoms colored according to their atom type. Bound phosphate and glycerol molecules, in the *apo*-ADH8 structure, and the NADP⁺ molecule, in the ADH8-NADP⁺ structure, are displayed in green. Electron densities, corresponding to the final $2F_o - F_c$ maps, are also shown, at 1σ level, with a chicken box representation.

retinoid form in amphibian egg and embryo, to retinol that, when esterified, represents the major retinoid form in adults.^{6,7}

Within the animal and plant ADH family, only three-dimensional structures for NAD(H)-dependent enzymes were available.^{8–13} Each ADH subunit contains a catalytic and a coenzyme-binding domains. The coenzyme-binding domain is composed of a six-stranded parallel β -pleated sheet, similar to those found in other NAD(H)-dependent dehydrogenases.¹⁴ It has been proposed that the active-site cleft closes upon coenzyme binding by a rigid body rotation of the catalytic domain towards the coenzyme-binding domain.^{15,16} In fact, the structure of horse *apo*-ADH1 presents an open conformation,¹⁷ while binary or ternary complexes from horse and human ADH1 forms^{8,18,19} and from human ADH4¹³ exhibit a closed conformation. However, binary or ternary complexes from cod ADH1,⁹ mouse ADH2¹⁰ and human ADH3¹¹ show structures that were defined as semi-open conformations. Structural rearrangements upon dinucleotide binding conform a hydrophobic substrate-binding pocket where the substrate can achieve direct coordination with the catalytic zinc ion by displacing water molecules. The zinc-bound substrate allows the direct hydride transfer to the C4 atom of the nicotinamide ring,²⁰ while it has been suggested that the hydroxyl proton from the substrate is eliminated *via* a proton-relay pathway which connects the active site with the bulk solvent. The release of cofactor, often the catalytic

rate-limiting step, will complete the cycle returning the enzyme to the initial conformation.

The crystal structure of the *apo*-form of ADH8 and of the binary complex with NADP⁺ have now been determined and refined at resolutions of 2.2 Å and 1.8 Å, respectively. These are the first three-dimensional structures for an NADP(H)-dependent member of the animal and plant ADH family. Results define the molecular architecture of ADH8 providing a framework to explain the cofactor and the substrate preferences of this amphibian enzyme and giving support to its classification as a new ADH class. Structural relationships of ADH8 with NAD(H)-dependent ADHs and with microbial NADP(H)-dependent ADHs are also analyzed.

Results and Discussion

Overall structure

The crystal structure of the *apo* form of ADH8 was solved by molecular replacement using as a search model the coordinates from human ADH1B1.²¹ The asymmetric unit of the crystal contained the two protein subunits that correspond to a molecular dimer. The quality of the final electron density maps allowed to position with confidence most residue side-chains (Figure 1(a)). The final molecular model comprises all the 372 amino acid residues, one phosphate group, one glycerol

Table 1. Data and model refinement statistics

	<i>apo</i> -ADH8	ADH8–NADP ⁺
Space group	C2	C2
Cell parameters (Å; deg.)	$a = 122.7, b = 78.8, c = 91.6, \beta = 112.9$	$a = 122.2, b = 79.5, c = 91.8, \beta = 112.8$
Resolution range (Å) ^a	2.2 (2.1)	1.8 (1.9)
<i>Number of reflections</i>		
Total	150,436	254,342
Unique	79,197	140,960
R_{sym} (%) ^b	11.3 (44.7)	4.8 (33.1)
Completeness (%)	98.4 (99)	96.1 (74)
Average $I/\sigma(I)$	11.8 (2.6)	14.4 (2.0)
R_{work} (%) ^c	20.1	19.9
R_{free} (%) ^d	24.0	22.3
Number of protein residues	2372	2372
Number of water molecules	317	400
<i>Average thermal factor (Å²)</i>		
Protein	27.6	24.6
Water	32.6	31.6
Zn	35.4 ^e	25.4
NADP ⁺	–	31.5
Glycerol	65.7	43.9
PO4 [–]	26.8	–
<i>Geometry deviation</i>		
rmsd bonds (Å)	0.005	0.004
rmsd angles (deg.)	1.31	1.23

^a Values in parentheses are data for the highest resolution shell.

^b $R_{\text{sym}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}$, where $I_{hkl,i}$ is the observed intensity and $\langle I_{hkl} \rangle$ is the average intensity of multiple observations of symmetry-related reflections.

^c $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} ||F_o| - |F_c|| / \sum_{hkl} |F_o|$, where F_o and F_c are the observed and calculated structure factors, respectively.

^d R_{free} same definition as R_{work} for a cross-validation set of about 5% of the reflections.

^e Occupancy of the catalytic zinc ions was 50% in the two crystallographically independent subunits.

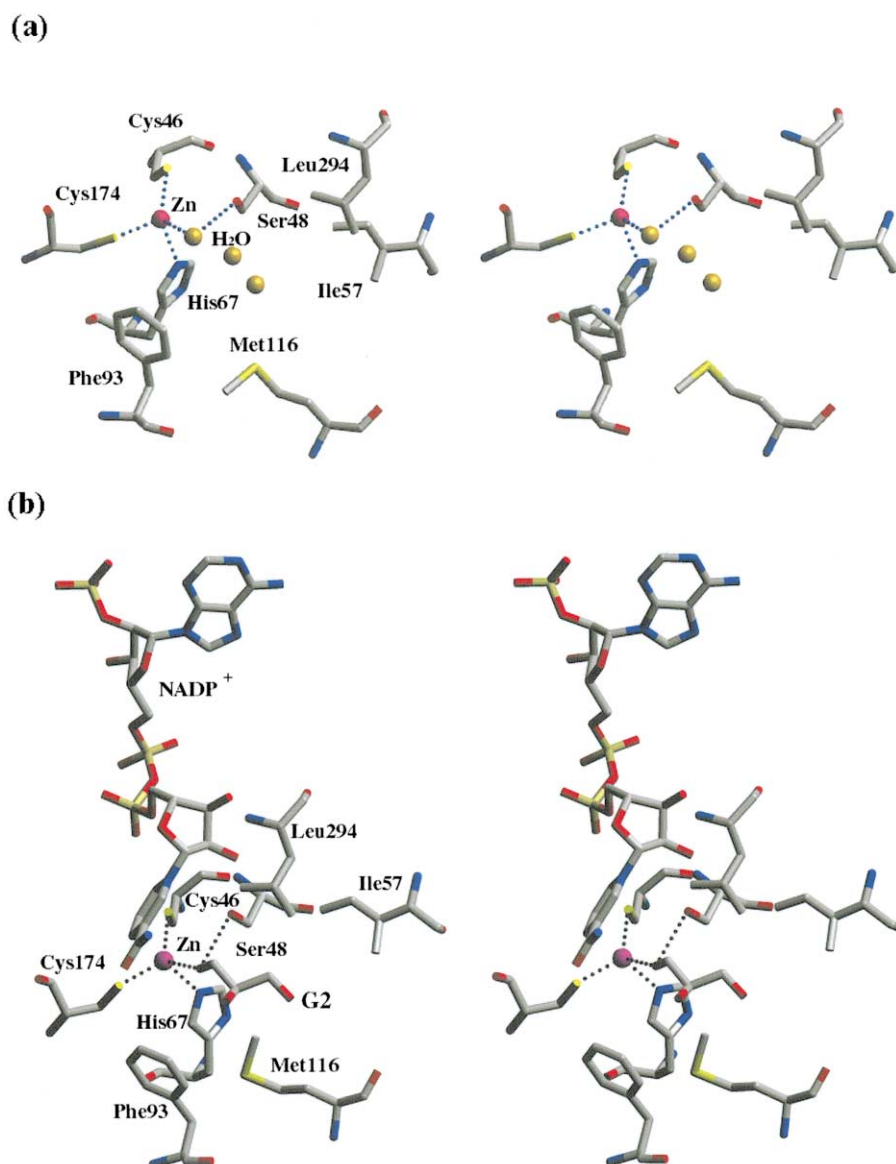


Figure 2. Stereo views of the inner part of the active site in the structures of (a) *apo*-ADH8 and (b) ADH7-NADP⁺. Coordination of the catalytic zinc ion, depicted as a pink sphere, is indicated with dashed lines. Water molecules, seen in the *apo*-ADH8 structure, are represented as yellow spheres. The NADP⁺ cofactor and a glycerol molecule (labeled G2) found in the ADH8-NADP⁺ structure are also shown.

molecule and two zinc ions per protein subunit (Table 1). Occupancy of the zinc ion in the active site was refined to 50% in the two subunits. The model, that also includes 317 water molecules, presents overall crystallographic agreement factors R_{work} and R_{free} of 20.1% and 24.0%, respectively, for data to 2.2-Å resolution (Table 1).

The structure of the binary complex with NADP⁺ has also been determined from crystals, obtained by co-crystallization of the enzyme with NADP⁺, that were isomorphous to the *apo* form crystals (Table 1). Positions of the two protein subunits in the asymmetric unit of the crystal of the complex were refined with a rigid body search starting with the coordinates from the structure of the *apo*-enzyme. Iterative positional and isotropic temperature factor refinement of individual atoms resulted in a molecular model with overall crystal-

lographic agreement factors R_{work} and R_{free} of 19.9% and 22.3%, respectively, for data to 1.8-Å resolution (Table 1). The final electron density map was clear for most residue side chains and for the NADP⁺ cofactor (Figure 1(b)). The final molecular model comprises the two protein subunits and 400 well-ordered water molecules. Each of the protein subunits contains all the 372 residues, one NADP⁺ coenzyme, one glycerol molecule and two zinc ions, both with full occupancy (Table 1). Attempts to obtain high resolution diffraction from crystals of ADH8-NADPH complexes, prepared either by co-crystallization or by soaking, were unsuccessful.

The relative positioning of the two domains is similar in the *apo* and the ADH8-NADP⁺ structures, with r.m.s.d. values between the C^α atoms of the two structures of about 0.64 Å. In the two

crystal structures the conformation of the ADH8 subunits is similar to the one defined as “closed” in the ternary complex of horse ADH.^{16,22} In *apo*-ADH8 the “closed” conformation found might be due to the presence of a phosphate group (likely from the sodium phosphate buffer used during the purification) and of a glycerol molecule (from the cryo-buffer) mimicking in part a bound cofac-

tor (Figure 1(a)). In any event, it seems that the binding of NADP⁺ to ADH8 can be achieved with only small protein rearrangements.

The catalytic zinc ion displays a tetrahedral coordination with residues Cys46, His67 and Cys174 (henceforth residue numbering will correspond to that of horse ADH1 with the Swiss Prot entry P00327). In the *apo*-ADH8 structure the

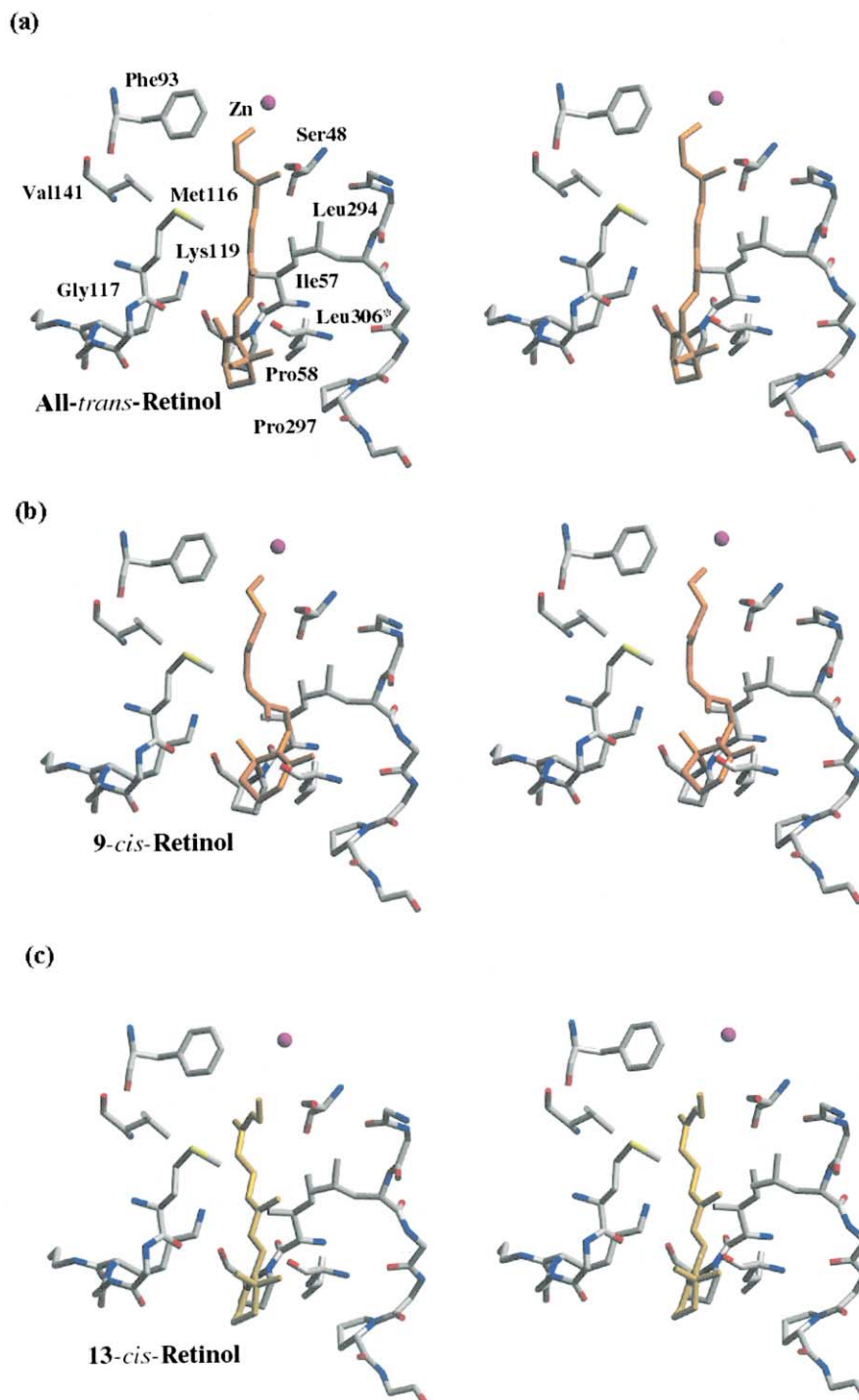


Figure 3. Stereo views of the (a) all-*trans*-retinol, (b) 9-*cis*-retinol and (c) 13-*cis*-retinol, modeled inside the ADH8 substrate-binding pocket. The nature and disposition of residues that conform the substrate-binding site allow the docking of these large, in some cases non-linear, substrates which had been experimentally observed (see in the text). Interaction of the substrate aliphatic chain with the protein is hydrophobic while the polar head approaches to the catalytic zinc ion.

fourth coordination position is occupied by a water molecule (Figure 2(a)), while in the ADH8–NADP⁺ complex this fourth position corresponds to a density that was interpreted as a glycerol molecule (Figure 2(b)). The low occupancy of the catalytic zinc ion only in the *apo* ADH8 structure suggests that the absence of a bound cofactor could facilitate the loss of the catalytic zinc ion.

The substrate-binding site

In the ADH8–NADP⁺ complex the glycerol molecule is located at the appropriate distance of the catalytic zinc ion for productive catalysis to occur (Figure 2(b)). In fact, the enzyme was found to be slightly active with glycerol as a substrate (data not shown), but saturation could not be achieved using concentrations up to 4 M. Comparisons of the substrate-binding site of ADH8 with those of human ADH1B1 and ADH4 indicate that the main difference corresponds to the loop 114–121 which, despite having residue Gly117 as in ADH1B1, leaves a cavity volume even larger than in ADH4, where a sequence gap is found at position 117. The change from Phe140, present in ADH1B1 and ADH4, to a leucine together with the presence of a serine at position 48 appears to explain the comparatively large-binding pocket of ADH8. A direct relationship between the size of the substrate-binding site and the K_m values has been demonstrated in ADH enzymes for ethanol and short-chain aliphatic substrates^{13,23–25} and can also explain the high K_m (600 mM) of ADH8 for ethanol.

ADH8 displays very good catalytic efficiency with medium- or long-chain substrates, such as hexanal, *trans*-2-hexenal, and several retinoid isomers, with higher values for the retinals than for the corresponding retinols.³ The catalytic efficiency for all-*trans*-retinal ($33.8 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$) is the highest reported for vertebrate ADHs with any retinoid.⁴ Most ADHs are active with all-*trans*-retinal and 9-*cis*-retinal, but display very low activity with 13-*cis*-retinal ($k_{\text{cat}}/K_m < 0.5 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$,²⁶ Martras *et al.*, unpublished results). In contrast, 13-*cis*-retinal is a much better substrate for ADH8 ($k_{\text{cat}}/K_m = 4.2 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$). Different retinol isomers were modeled into the substrate-binding site of the ADH8 structure (Figure 3). The model with all-*trans*-retinol shows hydrophobic interactions between the aliphatic chain of the retinoid and residues in the middle part of the binding site: Ile57, Pro58, Leu294, and Pro297, and Leu306 from the second subunit (Figure 3(a)). From the modeling is also clear that the ADH8-binding site is large enough to accommodate a 9-*cis*-retinol molecule (Figure 3(b)). In this model the terminal ionone ring of the retinoid is positioned away from proline residues 58 and 297 interacting instead with Leu306 from the other subunit. Docking of 13-*cis*-retinol into ADH8 presents new hydrophobic interactions, in particular with Met141 (Figure 3(c)), and appears to require some of the space inside the

substrate-binding site pocket that is occupied by Phe140 in both ADH1B1 and ADH4.

The proton-relay system

In ADH enzymes catalysis occurs in a closed molecular conformation where the reaction is not in direct contact with the bulk solvent.^{8,13,18,19} The existence of proton-relay pathways would facilitate the transfer of the substrate hydroxyl proton to the bulk solvent. A hydrogen-bonding network consisting of the hydroxyl group of residue 48 (Ser/Thr), the 2'-hydroxyl of the nicotinamide ribose from NAD(H) and, acting as a general base catalyst, the imidazole of either His47 or His51, was proposed to develop this function in several ADHs.^{16,27,28} However, ADH8 does not have histidine at either of these positions but Gly47 and Ser51.³ Other enzymes, such as rodent ADH2, rabbit ADH2B, human ADH5 and rodent ADH6, also lack histidines in positions 47 and 51.^{10,29–31} In the ADH8–NADP⁺ complex, glycerol interacts with the hydroxyl group of Ser48, which in turn connects with the 2'-hydroxyl of the nicotinamide ribose. in NADP⁺. However, the distance between this group and the hydroxyl of Ser51 is too large to allow efficient proton transfer. Interestingly, in ADH8, a water molecule bridges the gap between the coenzyme and Ser51, which would facilitate the connection of the active site with the solvent. A similar proton relay pathway has been proposed for mouse ADH2, where an asparagine residue is found at position 51.¹⁰

The NADP⁺ structure and binding interactions

In the crystal of the ADH8–NADP⁺ complex, a well defined electron density, corresponding to a NADP⁺ molecule, was located between the catalytic and the coenzyme-binding domains in the two crystallographically independent protein subunits (Figures 1(b)). The NADP⁺ shows an extended conformation, with both ribose moieties presenting C2'-*endo* sugar ring puckering, as also found in the NAD(H) molecules of NAD(H)-dependent ADH complexes.^{13,21} The NADP⁺ molecule shows significant conformational deviations with respect to the NAD(H) molecules found in ADH–NAD⁺ complexes only for the adenosine moiety.

NAD(H)-dependent enzymes often have a conserved negatively-charged residue at the C-terminal end of the second β -strand,³² which is Asp223 in NAD(H)-dependent medium-chain ADHs.²⁷ In contrast, proteins with preference for NADP(H) have a neutral residue at this position,³³ in particular a glycine in ADH8. Asp223 side-chain forms hydrogen bonds with the 2'- and 3'-hydroxyl groups of the adenosine ribose from the NAD(H) coenzyme. Since the Asp223 side-chain would sterically and electrostatically interfere with the 2'-phosphate group,³⁴ the sequence exchange Asp223Gly had been suggested to be the

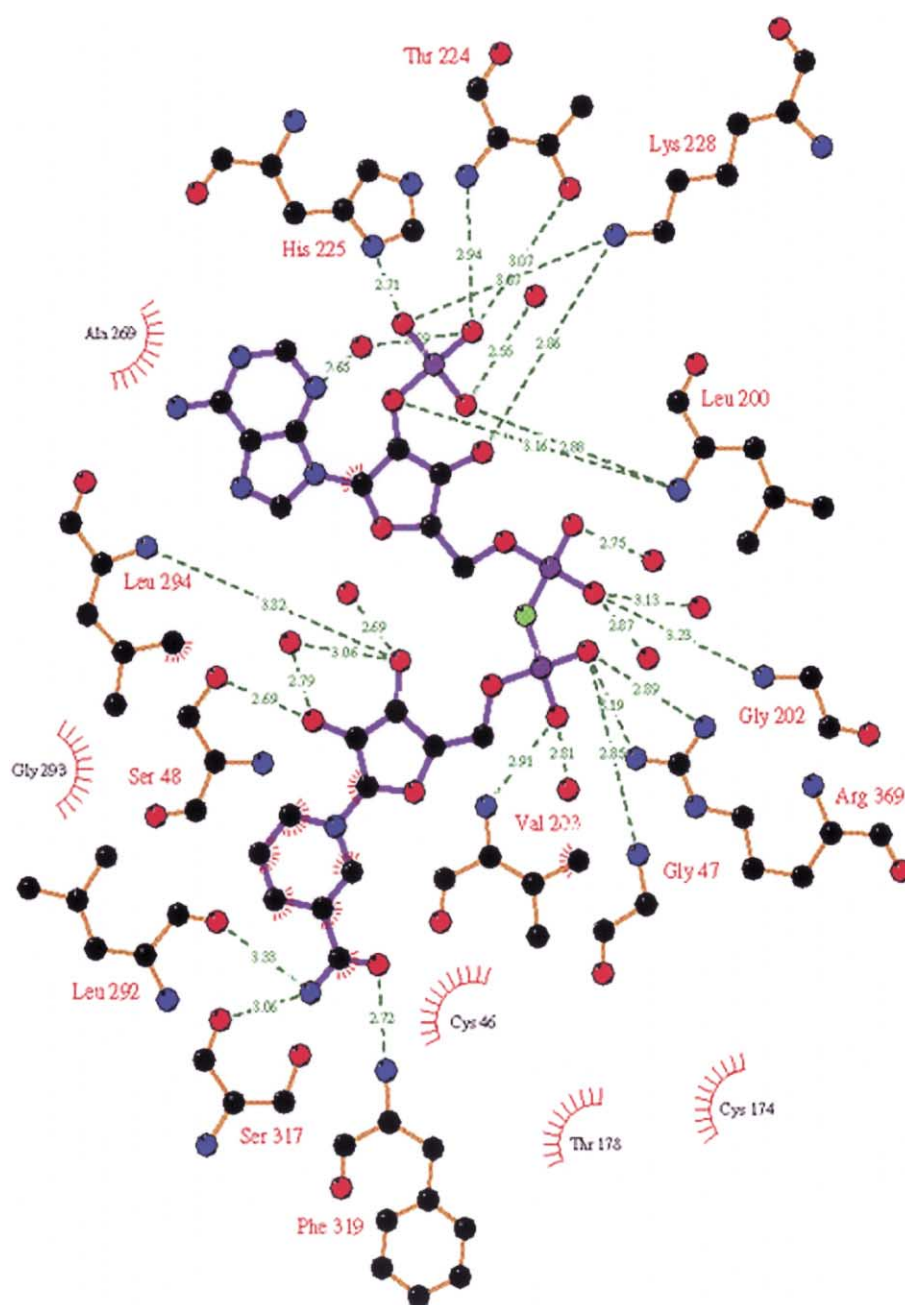
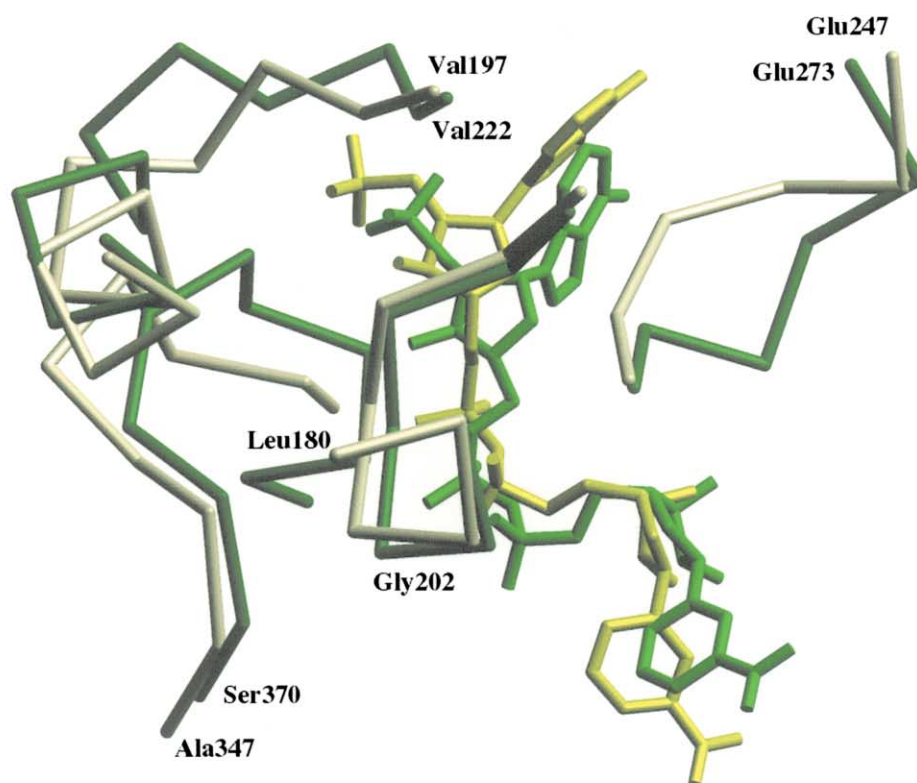


Figure 4. LIGPLOT⁴⁹ describing interactions of the NADP⁺ molecule found in the structure of the ADH8–NADP⁺ complex. Only side-chains of residues Thr224, His225 and Lys228 interact with the terminal phosphate group of the NADP⁺ cofactor. Thr224 and His225 are sequence variations specific of ADH8 while Lys228 is conserved among NAD(H)-dependent ADHs (see in the text).

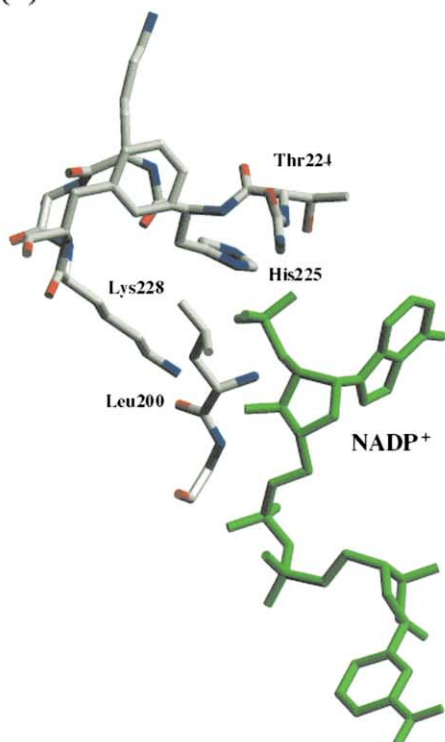
main reason of the coenzyme specificity in ADH8.³ However, in the structure of the ADH8–NADP⁺ complex, not only Gly223 but also Thr224, His225 together with Leu200 and Lys228, two highly conserved residues in NAD(H)-dependent ADHs, participate in the pocket for the NADP⁺ extra phosphate group (Figures 4 and 5). Both the oxygen side chain and the nitrogen main chain of Thr224 are making hydrogen bonds with one of the oxygen atoms from the terminal phosphate group (Figure 4). A second oxygen atom from the terminal phosphate group is hydrogen bonded with the N⁶ atom from His225 and with the side

chain of Lys228, which in turn makes a second hydrogen bond, conserved in NAD(H)-dependent ADHs, with the hydroxyl group from the adenosine ribose. A third oxygen from the terminal phosphate group interacts with the nitrogen main chain atom of Leu200 and with a solvent molecule (Figure 4). Adenine atom N3 binds a water molecule which in turn interacts with the terminal phosphate group. Thr224 and His225 represent interesting residue changes with respect to the conserved Ile/Leu224 and Asn225 in NAD(H)-dependent ADHs, resulting in a more polar, favorable, environment for phosphate binding. It

(a)



(b)



(c)

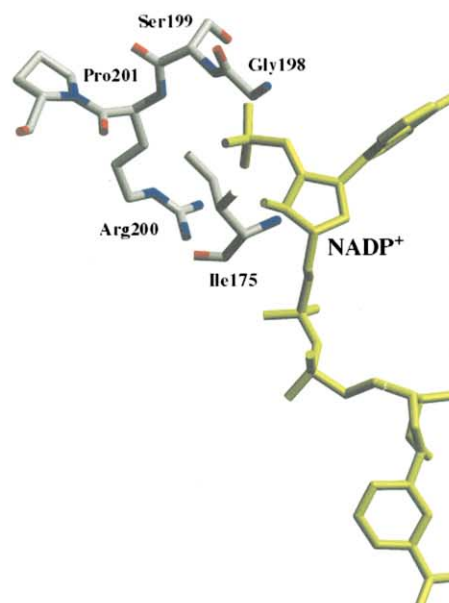


Figure 5. (a) Superimposition of ADH8 with the prokaryotic NADP(H)-dependent ADH from *Clostridium beijerinckii* (PDB entry 1KEV), in the vicinity of the NADP(H)-binding pocket. Protein main-chain tracings are represented as colored rods (green for ADH8). The corresponding NADP(H) molecules are also displayed with a stick representation. Terminal phosphate environment in the NADP(H)-binding pockets of ADH8 (b) and of the bacterial NADP(H)-dependent ADH from *Clostridium beijerinckii* (c). Differences in the NADP(H) conformation and in their interactions with the protein show two alternative ways to achieve NADP(H) specificity in ADHs (see in the text).

has been suggested that the presence of one or two basic residues interacting with the extra phosphate group is important for NADP(H) specificity.³⁵ Remarkably, in ADH8 the basic residue interacting with the terminal phosphate is Lys228 which, as indicated before, is a highly conserved residue among NAD(H)-dependent ADHs. Therefore, a few residue changes (Asp223Gly, Ile224Thr and Asn225His) and recruitment of conserved residues (in particular Lys228) allow the ADH molecular architecture to adapt, in a unique way, to the different coenzyme requirements. This type of adaptation imposes only minimal conformational rearrangements between ADH cofactors NAD(H) and NADP⁺ which, in turn, explains why ADH8 still binds NAD(H).

In the structures of NAD(H)-dependent ADHs, adenine is sandwiched by hydrophobic interactions mainly with the highly conserved residues Ile224 and Ile269.^{13,21,26,36} In ADH8 the corresponding residues Thr224 and Ala269 cannot provide such strong interactions with the adenine (Figure 4). Weakening the protein-coenzyme binding might facilitate the release of coenzyme which would explain the higher k_{cat} values of ADH8,³ similarly to what has been reported for yeast and mutated horse ADHs.^{37–39}

In the crystal of *apo*-ADH8 some extra electron density, found at the location corresponding to the pyrophosphate moiety in the cofactor-binding site, was interpreted as a phosphate group (Figure 1(a)). This phosphate interacts with Gly47, Gly202, Val203 and Arg369, which are the same residues that interact with the pyrophosphate of the cofactor in the ADH-NADP⁺ complex (Figure 4). Extra electron density, interpreted as a glycerol molecule, was also found at the location corresponding to the terminal phosphate group. This glycerol molecule interacts with Gly223, Thr224, His225 and Lys228. The simultaneous presence of a glycerol and a phosphate group in the structure of *apo*-ADH8 suggests that the affinity for phosphate is lower in the pocket of the terminal phosphate group than in the site corresponding to the pyrophosphate. It is also interesting to notice that interactions stabilizing the glycerol found in the terminal phosphate pocket correspond to those of a primary alcohol. Therefore, competition between the terminal phosphate of the NADP(H) cofactor and alcohols may offer some subtle enzyme regulation. However, ADH8 activity assays in the presence of glycerol (0–500 mM) at various cofactor concentrations did not show any significant inhibition.

NADP(H)-dependent ADHs from microorganisms, *Thermoanaerobacter ethanolicus*,⁴⁰ *Thermoanaerobacter brockii*, *Clostridium beijerinckii*,⁴¹ and *Entamoeba histolytica*,⁴² also have a glycine, a hydrophilic and a basic residues at positions 223, 224 and 225, respectively (Figure 5). However, despite these similarities the NADP⁺-binding pocket in ADH8 shows important differences with respect to the ones known from the prokaryotic

NADP(H)-dependent ADHs of *C. beijerinckii* and *T. brockii* (PDB entries 1KEV and 1BXZ, respectively).⁴¹ Some of the largest differences are located in the loops surrounding the cofactor-binding pocket which reflects that different strategies have been followed by members of the medium-chain-dehydrogenase/reductase superfamily to achieve specific recognition for the NADP(H) cofactor (Figure 5).

Conclusions

When ADH8 was initially characterized it was classified as a class IV-like enzyme because of its general substrate specificity and gastric localization, similar to those of mammalian class IV. However, the possibility that the enzyme constituted a new class (class VIII or ADH8) was also considered mainly due to its distinct cofactor specificity and primary-structure features.³ Several structural properties, now determined, appear consistent with the notion of a separate ADH class, in particular: (i) the large active site pocket, (ii) the likely different proton-relay pathway, (iii) the very specific rearrangements in the cofactor phosphate-binding site, and (iv) the weak interactions of the adenine moiety. Nevertheless, the ADH8 nomenclature should be further validated by additional research on the ADH lines from lower vertebrates.

The two ADH8 structures now available, besides explaining the cofactor specificity, allow rationalizing the distinct kinetic features of this enzyme such as the high k_{cat} and K_m values for ethanol, and the high catalytic efficiency with retinals that results in one of the most efficient retinal reductases known so far. Subtle but concerted changes, in a very narrow region of the primary sequence, seem to allow the versatility for the cofactor used by ADHs. In view of these unique features kinetic and mutational studies are underway, particularly for the ADH8 residues participating in the coenzyme specificity.

Material and Methods

Protein purification and crystallization

Samples of recombinantly expressed and purified *R. perezii* ADH8 were used in crystallization screenings with the hanging-drop vapor-diffusion method, as reported previously.⁴³ Attempts to prepare binary complexes of ADH8 with NADP⁺ and NADPH either by soaking or by co-crystallization resulted in high resolution diffracting crystals only for NADP⁺ complexes.

Data collection and structure determination

Diffraction data sets from both the *apo*-ADH8 and the ADH8-NADP⁺ crystals were collected at 100 K from a single crystal each, on a MarCCD detector using synchrotron radiation at the ESRF (Grenoble) beam line ID14.4. Images were evaluated and scaled internally

with programs DENZO and SCALEPACK,⁴⁴ respectively (Table 1). Crystals of the apo-ADH8 and ADH8-NADP⁺ were isomorphous, space group C2, and contained two subunits per asymmetric unit with a solvent content of about 50%. Completeness of the two data set sets were 99% and 98%, with internal agreement factors (R_{sym}) of 7.6% and 5.0% at 2-Å and 1.8-Å resolution, respectively.

Molecular replacement calculations, using the program AMoRe⁴⁵ and the human ADH1B1 structure as a searching model, resulted in a clean initial solution with a correlation coefficient of 0.7 and an R -factor of 35% in the resolution shell from 3.5 Å to 20 Å. Refinement was done following standard protocols using iteratively the program CNS⁴⁶ with the amplitude-based maximum likelihood target function and alternating with manual rebuilding in the interactive graphics program O.⁴⁷ Bulk solvent correction and restrained, isotropic individual B -factor were used in the final rounds of refinement and model building. The refinement coordinates of the apo-ADH8 crystal were then used to start the determination of the ADH8-NADP⁺ complex.

The stereochemistry of the structures determined were analyzed with the program PROCHECK.⁴⁸ Of the non-Gly residues 85% fall within the most favored region of the Ramachandran plot and the rest are inside the additional allowed regions. Structural comparisons were performed with the program SHP (D. Stuart, unpublished results).

Coordinates of both structures are deposited in the Protein Data Bank with ID codes 1POC and 1POF.

Enzyme activity assays

Alcohol dehydrogenase activity was determined at 25 °C by monitoring the change in absorbance at 340 nm, with a Cary 400 Bio (Varian) spectrophotometer. Glycerol oxidation was performed in 0.1 M glycine/NaOH, pH 10.0, using 1.2 mM NADP⁺ as a coenzyme. Inhibition assays were carried out in 0.1 M glycine/NaOH, pH 10.0 using 1 M ethanol as a substrate, NADP⁺ as a coenzyme and from 0 M to 0.5 M glycerol as an inhibitor. Each individual rate measurement was run in duplicate.

References

- Duester, G., Farrés, J., Felder, M. R., Holmes, R. S., Höög, J. O., Parés, X. *et al.* (1999). Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 389–395.
- Nordling, E., Persson, B. & Jörnvall, H. (2002). Differential multiplicity of MDR alcohol dehydrogenases: enzyme genes in the human genome *versus* those in organisms initially studied. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1070–1075.
- Peralba, J. M., Cederlund, E., Crosas, B., Moreno, A., Julià, P., Martínez, S. E. *et al.* (1999). Structural and enzymatic properties of a gastric NADP(H)-dependent and retinal-active alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **274**, 26021–26026.
- Duester, G. (2000). Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function. Production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4315–4324.
- Bannister, W. H. (1967). The oxidation–reduction state of pyridine nucleotide in isolated frog gastric mucosa. *Experientia (Basel)*, **23**, 715–716.
- Scadding, S. R. & Maden, M. (1994). Retinoic acid gradients during limb regeneration. *Dev. Biol.* **162**, 608–617.
- Costaridis, P., Horton, C., Zeitlinger, J., Holder, N. & Maden, M. (1996). Endogenous retinoids in the zebrafish embryo and adult. *Dev. Dynam.* **205**, 41–51.
- Niederhut, M. S., Gibbons, B. J., Pérez-Miller, S. & Hurley, T. D. (2001). Three-dimensional structures of the three human class I alcohol dehydrogenases. *Protein Sci.* **10**, 697–706.
- Ramaswamy, S., El-Ahmad, M., Danielsson, O., Jörnvall, H. & Eklund, H. (1996). Crystal structure of cod liver class I alcohol dehydrogenase: substrate pocket and structurally variable segments. *Protein Sci.* **5**, 663–671.
- Svensson, S., Höög, J. O., Schneider, G. & Sandalova, T. (2000). Crystal structures of mouse class II alcohol dehydrogenase reveal determinants of substrate specificity and catalytic efficiency. *J. Mol. Biol.* **302**, 441–453.
- Yang, Z. N., Bosron, W. F. & Hurley, T. D. (1997). Structure of human XX alcohol dehydrogenase: a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **265**, 330–343.
- Sanghani, P. C., Robinson, H., Bosron, W. F. & Hurley, T. D. (2002). Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of apo, binary, and inhibitory ternary complexes. *Biochemistry*, **41**, 10778–10786.
- Xie, P., Parsons, S. H., Speckhard, D. C., Bosron, W. F. & Hurley, T. D. (1997). X-ray structure of human class IV $\sigma\sigma$ alcohol dehydrogenase. Structural basis for substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **272**, 18558–18563.
- Rossmann, M. G., Moras, D. & Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature*, **250**, 194–199.
- Eklund, H. & Brändén, C. I. (1979). Structural differences between apo- and holoenzyme of horse liver alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **254**, 3458–3461.
- Eklund, H., Samama, J. P., Wallén, L., Brändén, C. I., Åkeson, Å. & Jones, T. A. (1981). Structure of a horse triclinic ternary complex with liver alcohol dehydrogenase at 2.9 Å. *J. Mol. Biol.* **146**, 561–587.
- Eklund, H., Nordström, B., Zeppezauer, E., Söderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T. *et al.* (1976). Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **102**, 27–59.
- Hurley, T. D., Bosron, W. F., Stone, C. L. & Amzel, L. M. (1994). Structures of three human β alcohol dehydrogenase variants: correlations with their functional differences. *J. Mol. Biol.* **239**, 415–429.
- Colonna-Cesari, F., Perahia, D., Karplus, M., Eklund, H., Brändén, C. I. & Tapia, O. (1986). Interdomain motion in liver alcohol dehydrogenase. Structure and energetic analysis of the hinge bending mode. *J. Biol. Chem.* **261**, 15273–15280.
- Eklund, H. & Brändén, C. I. (1987). Alcohol dehydrogenase. In *Biological Macromolecules and Assemblies* (Jurnak, F. A. & McPherson, A., eds), pp. 73–142, Wiley, London.
- Hurley, T. D., Bosron, W. F., Hamilton, J. A. & Amzel, L. M. (1991). Structure of human $\beta 1\beta 1$ alcohol dehydrogenase: catalytic effects of non-active-site substitutions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 8149–8153.
- Al-Karadaghi, S., Cedergren-Zeppezauer, E. S., Petrantos, K., Hovmöller, S., Terry, H., Dauter, Z. & Wilson, K. S. (1994). Refined crystal structure of

- liver alcohol dehydrogenase–NADH complex at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallog. sect. D*, **50**, 793–807.
23. Farrés, J., Moreno, A., Crosas, B., Peralba, J. M., Allali-Hassani, A., Hjelmqvist, L. *et al.* (1994). Alcohol dehydrogenase of class IV (σ -ADH) from human stomach. cDNA sequence and structure/function relationships. *Eur. J. Biochem.* **224**, 549–557.
 24. Crosas, B., Allali-Hassani, A., Martínez, S. E., Martras, S., Persson, B., Jörnvall, H. *et al.* (2000). Molecular basis for differential substrate specificity in class IV alcohol dehydrogenases: a conserved function in retinoid metabolism but not in ethanol metabolism. *J. Biol. Chem.* **275**, 25180–25187.
 25. Allali-Hassani, A., Crosas, B., Parés, X. & Farrés, J. (2001). Kinetic effects of a single-amino acid mutation in a highly variable loop (residues 114–120) of class IV ADH. *Chem. Biol. Interact.* **130–132**, 435–444.
 26. Yang, Z. N., Davis, G. J., Hurley, T. D., Stone, C. L., Li, T. K. & Bosron, W. F. (1994). Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenase of retinol oxidation and retinal reduction. *Alcohol. Clin. Expt. Res.* **18**, 587–591.
 27. Sun, H. W. & Plapp, B. V. (1992). Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family. *J. Mol. Evol.* **34**, 522–535.
 28. Davis, G. J., Carr, L. G., Hurley, T. D., Li, T. K. & Bosron, W. F. (1994). Comparative roles of histidine 51 in human beta 1 beta 1 and threonine 51 in pi pi alcohol dehydrogenases. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 307–312.
 29. Yasunami, M., Chen, C. S. & Yoshida, A. (1991). A human alcohol dehydrogenase gene (ADH6) encoding an additional class of isozyme. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 7610–7614.
 30. Höög, J. O. & Brandt, M. (1995). Mammalian class VI alcohol dehydrogenase. Novel type of the rodent enzymes. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* (Weiner, H., Holmes, R. S. & Wermuth, B., eds), vol. 5, pp. 355–364, Plenum Press, New York.
 31. Svensson, S., Hedberg, J. J. & Höög, J. O. (1998). Structural and functional divergence of class II alcohol dehydrogenase-cloning and characterization of rabbit liver isoforms of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **251**, 236–243.
 32. Bellamacina, C. R. (1996). The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB J.* **10**, 1257–1269.
 33. Wierenga, R. K., Terpstra, P. & Hol, W. G. J. (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* **187**, 101–107.
 34. Fan, F., Lorenzen, J. A. & Plapp, B. V. (1991). An aspartate residue in yeast alcohol dehydrogenase I determines the specificity for coenzyme. *Biochemistry*, **30**, 6397–6401.
 35. Carugo, O. & Argos, P. (1997). NADP-dependent enzymes. I: conserved stereochemistry of cofactor binding. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **28**, 10–28.
 36. Cho, H., Ramaswamy, S. & Plapp, B. V. (1997). Flexibility of liver alcohol dehydrogenase in stereoselective binding of 3-butylthiolane 1-oxides. *Biochemistry*, **36**, 382–389.
 37. Fan, F. & Plapp, B. V. (1995). Substitutions of isoleucine residues at the adenine binding site activate horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*, **34**, 4709–4713.
 38. Fan, F. & Plapp, B. V. (1999). Probing the affinity and specificity of yeast alcohol dehydrogenase I for coenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **367**, 240–249.
 39. Fernández, M. R., Biosca, J. A., Torres, D., Crosas, B. & Parés, X. (1999). A double residue substitution in the coenzyme-binding site accounts for the different kinetic properties between yeast and human formaldehyde dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **274**, 37869–37875.
 40. Burdette, D. S., Vieille, C. & Zeikus, J. G. (1996). Cloning and expression of the gene encoding the *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E secondary-alcohol dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *Biochem. J.* **316**, 115–122.
 41. Korkhin, Y., Kalb, A. J., Peretz, M., Bogin, O., Burstein, Y. & Frolow, F. (1998). NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*. *J. Mol. Biol.* **278**, 967–981.
 42. Kumar, A., Shen, P. S., Descoteaux, S., Pohl, J., Bailey, G. & Samuelson, J. (1992). Cloning and expression of an NADP⁺-dependent alcohol dehydrogenase gene of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 10188–10192.
 43. Valencia, E., Rosell, A., Larroy, C., Farrés, J., Biosca, J. A., Fita, I. *et al.* (2003). Crystallization and preliminary X-ray analysis of NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Ranaperezi*. *Acta Crystallog. sect. D*, **59**, 334–336.
 44. Otwinowski, Z. (1993). Oscillation data reduction program. In *Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing* (Sawyer, L., Isaacs, N. & Bailey, S., eds), pp. 56–62, SERC Daresbury Laboratory, England.
 45. Navaza, J. (1994). AmoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallog. sect. A*, **50**, 157–163.
 46. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W. *et al.* (1998). Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallog. sect. D*, **54**, 905–921.
 47. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallog. sect. A*, **47**, 110–119.
 48. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structure. *J. Appl. Crystallog.* **26**, 283–291.
 49. Wallace, A. C., Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* **8**, 127–134.

Edited by R. Huber

(Received 24 September 2002; received in revised form 19 March 2003; accepted 19 March 2003)

RESUM I DISCUSSIÓ DELS RESULTATS DE L'ARTICLE: Crystal Structure of the Vertebrate NADP(H)-dependent Alcohol Dehydrogenase (ADH8)

J. Mol. Biol. (2003) **330**, 75-85

En aquest capítol es descriu l'estructura tridimensional de ADH8 i el complex binari ADH8-NADP⁺, que es va resoldre a 2.2Å i 1.8Å, respectivament (capítol 1).

Ens detindrem en l'estudi del centre catalític; la característica de tenir una butxaca d'unió a substrat de gran amplada, fet que es pot associar amb l'alta l'eficiència catalítica envers retinoids i baixa afinitat per etanol, ens aporta informació relacionada amb la funció que se li ha atribuït a l'enzim en la reducció d'aldehids com a reductasa de retinal.

L'observació detallada del centre d'unió a cofactor ens permet comprovar que la preferència per NADP(H) estaria determinada pels residus Gly223, Thr224 i His225, juntament amb el residu conservat Lys228, que defineixen la unió al fosfat extra del cofactor. L'anàlisi exhaustiu d'aquestes relacions es descriu al capítol 3 d'aquesta tesi.

Comprovarem com la conformació de la ADH8 que uneix NADP⁺ se superposa bé amb la d'altres ADHs en la unió de NAD(H), això explicaria la raó de la seva capacitat per unir-se també al cofactor NAD(H). Les característiques estructurals específiques de l'enzim, recolzen la classificació de la ADH8 com a una classe d'entre les ADHs.

1. Estructura de l'enzim ADH8

L'estructura de la ADH8 i complex binari ADH8-NADP⁺ es van resoldre per reemplaçament molecular amb el programa *AMoRe*, usant com a model les coordenades de la ADH1B1 humana, a partir de les dades recollides dels cristalls de proteïna ADH8 nativa i els obtinguts per co-cristal·lització amb NADP⁺ (Capítol 1)

Les posicions de les dues subunitats en la unitat asimètrica es van refinar fent una recerca de cos rígid amb les coordenades de l'apo-enzim, el refinament iteratiu de les posicions i del factor de temperatura isotròpic dels àtoms ens van aportar el model molecular final de l' *apo*-ADH8. Cada subunitat proteica contenia,

a més dels 372 residus, un glicerol i dos àtoms de zinc. En el complex ADH8-NADP⁺ la conformació global és la mateixa (r.m.s.d. pels Ca de 0.64Å), similar a la definida com a “tancada” en el complex de ADH de cavall. Potser la forma *apo* adopta la conformació “tancada” degut a la presència d’un grup fosfat i una molècula de glicerol (ambdós són components del medi) que mimetitzarien la unió del NADP⁺ a l’ADH8. Sembla en general, que la unió del cofactor requeriria de pocs reordenaments a la proteïna.

El Zn catalític coordina tetrahèdicament amb els residus Cys46, His67, Cys174 i amb una molècula d’aigua a la forma *apo*. En el complex binari la quarta connexió s’estableix amb una molècula de glicerol que estaria ocupant el lloc del substrat.

2. El lloc d’unió a substrat

En el complex ADH8-NADP⁺ la molècula de glicerol està localitzada de la manera apropiada per que fos possible la catàlisi. Vam poder comprovar experimentalment que tot i així no era un bon substrat i tampoc no actuava com inhibidor competiu envers els substrats reals.

El lloc d’unió a substrat d’ADH8 respecte el d’altres ADHs és comparativament una butxaca d’unió més àmplia, aquesta morfologia està directament relacionada amb la baixa afinitat per etanol i substrats alifàtics de cadena curta. La màxima eficiència catalítica d’ADH8 es dona amb substrats de cadena mitjana o llarga, com serien hexanal, *trans*-2-hexanal i diferents isòmers de retinoid, essent més eficient amb retinals que amb els corresponents retinols.

L’eficiència catalítica per all-*trans*-retinal ($33.8\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$) és la major descrita per ADHs de vertebrats amb qualsevol retinoid. La majoria de ADHs són actives amb all-*trans*-retinal i 9-*cis*-retinal, però tenen molt poca activitat amb 13-*cis*-retinal ($K_{\text{cat}}/K_m < 0.5\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1.26}$, Martras i col., resultats no publicats). En canvi, el 13-*cis*-retinal és un bon substrat per la ADH8 ($K_{\text{cat}}/K_m = 4.2\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$).

El modelat de la unió de diversos isòmers de retinol a l’ADH8 ens permet apreciar que hi hauria interaccions hidrofòbiques que estabilitzarien la unió amb all-*trans*-retinol, també veiem com el 9-*cis*-retinal es pot acomodar a la butxaca d’unió tot i

la seva grandària i quines interaccions hidrofòbiques es donarien en unir 13-*cis*-retinol, destaca la interacció amb Met141, el 13-*cis*-retinol ocupa part de l'espai que en la ADH1B1 i ADH4 està ocupat pel residu Phe140.

3. El sistema de transferència protònica (“proton-relay”)

La catàlisi de les ADHs ocorre en una conformació tancada on la reacció no està en contacte directe amb el solvent (Niederhut i col. 2001; Xie i col., 1997; Hurley i col., 1994; Colonna-Cesari i col., 1986). L'existència d'un patró de “proton relay” facilitaria la transferència del protó hidroxil del substrat al solvent.

Per varies ADHs (Eklund i Brändén, 1976; Sun i Plapp, 1992; Davis i col., 1994) s'havia descrit que hi havia un canal tipus pont d'hidrogen que consistia en un grup hidroxil del residu 48 (Ser/Thr), el 2'-hidroxil de la nicotinamida ribosa del NAD(H) i actuant com a base catalítica l'imidazol del NAD(H) de la His47 o la His51. La geometria de les interaccions que estableix el Zn^{2+} amb els parells d'electrons del nitrogen dels heterocicles com l'imidazol i els seus derivats va ser estudiada per Vedani i Huhta (1990). Els ponts d'hidrogen són importants per la funció de la histidina com a lligant del zinc a les proteïnes (Ippolito i col., 1990) L'ADH8 no té aquesta His, a les mateixes posicions té Gly47 i Ser51. Altres ADHs com ADH2 i ADH6 de rosegadors, ADH2B de conill, ADH5 humana tampoc tenen His en les posicions 47 i 51 (Svensson i col., 2000; Yasunami i col., 1991; Höög i Brandt, 1995; Svensson i col., 1998).

En el complex ADH8-NADP⁺, el glicerol interactua amb el grup hidroxil de la Ser48 que a l'hora connecta amb el 2'-hidroxil de la nicotinamida ribosa del NADP⁺. La distància que hi ha entre el grup hidroxil del NADP⁺ i el de la Ser51 podria ser massa gran per permetre la transferència protònica, a l'ADH8 hi ha una molècula d'aigua que fa pont en el buit entre el coenzim i la Ser51 que pot facilitar la connexió del centre actiu amb el solvent. Per la ADH2 de ratolí s'ha proposat un mecanisme de “proton relay” que segueix aquests mateix patró i té una asparagina a la posició 51. (Svensson i col., 2000).

L'aigua s'observa sovint com a lligant en l'estructura de metal·loproteïnes, particularment quan aquest zinc-H₂O o zinc-hidròxid és important per la funció catalítica dels enzims. Es sabut que la coordinació de una molècula d'aigua a un ió zinc tetracoordinat redueix el pK_a del solvent aproximadament a 7 (Groves i Olson, 1985; Groves u Baron, 1989).

4. Estructura del NADP⁺ i les interaccions

En el cristall del complex ADH8-NADP⁺, totes dues subunitats presenten NADP⁺ en conformació estesa, amb les dues meitats de la ribosa amb l'anell C2'-endo girat, tal com es va trobar a les molècules de NAD(H) dels complexos d'altres ADHs. Tot i que la unió dels cofactors té lloc de la mateixa manera, les modificacions conformacionals entre les proteïnes que uneixen NADP i les que uneixen NAD són significatives:

Destaca el canvi en el residu Asp223, aquest residu carregat negativament està localitzat a l'extrem terminal de la 2^a cadena β als enzims dependents de NAD(H), i en els enzims dependents de NADP es substitueix per un residu neutre, l'ADH8 en concret té una glicina.

Altres canvis interessants són Thr224 i His225 presents als enzims dependents de NADP respecte als residus conservats Ile/Leu224 i Asn225 propis d'enzims dependents de NAD. Treonina i histidina confereixen un ambient polar que és més favorable per unir el fosfat.

S'havia suggerit també que la presència d'un o més residus bàsics interaccionant amb el fosfat extra podia ser un punt important d'especificitat per NADP(H). Aquest residu bàsic a la ADH8 és la Lys228 que està molt conservat entre les ADHs dependents de NAD(H).

Així doncs, el canvi d'uns pocs residus (D223G/I224T/N225H) i el reclutament de Y228 són suficients per donar l'especificitat per NADP. Aquest tipus d'adaptació imposa només un mínim canvi conformacional entre la unió a NADP o a NAD(H) i explica perquè la ADH8 és capaç d'unir també NAD. Aquest fet específic ens ha ocupat un estudi exhaustiu que es recull al capítol 3 de la tesi.

Els residus conservats a les ADHs dependents de NAD(H): Ile224 i Ile269 confereixen una forta interacció amb l'adenina del NAD(H), aquests residus es substitueixen per Thr224 i Ala269 a la ADH8, la interacció que exerceixen amb el cofactor serà menor, això facilita l'alliberació del NADP i explicaria perquè incrementa la K_{cat} de forma similar al que es va descriure pel llevat i els mutants d'ADH de cavall.

Altres ADHs dependents de NADP(H) de microorganismes també tenen una glicina, i un residu hidrofòbic i un bàsic a les posicions 223, 224 i 225. Però tot i coincidir en aquestes posicions, hi ha diferències importants sobretot en el *loop* que envolta la butxaca d'unió a NADP. Això reflexa per tant, que els membres de la superfamília MDR han seguit una estratègia diferent per adquirir l'especificitat de reconeixement per NADP(H).

CAPÍTOL 3

Complete Reversal of Coenzyme Specificity by Concerted Mutation of Three Consecutive Residues in Alcohol Dehydrogenase.

J. Biol. Chem. Vol. 278, No. 42, pp.40573_40580, 2003

Complete Reversal of Coenzyme Specificity by Concerted Mutation of Three Consecutive Residues in Alcohol Dehydrogenase*

Received for publication, July 10, 2003, and in revised form, August 4, 2003
Published, JBC Papers in Press, August 4, 2003, DOI 10.1074/jbc.M307384200

Albert Rosell‡, Eva Valencia§, Wendy F. Ochoa§, Ignacio Fita§, Xavier Parés‡, and Jaume Farrés‡¶

From the ‡Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (Barcelona), Spain and the §IBMB-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Jordi-Girona 18–26, E-08034 Barcelona, Spain

Gastric tissues from amphibian *Rana perezi* express the only vertebrate alcohol dehydrogenase (ADH8) that is specific for NADP(H) instead of NAD(H). In the crystallographic ADH8-NADP⁺ complex, a binding pocket for the extra phosphate group of coenzyme is formed by ADH8-specific residues Gly²²³-Thr²²⁴-His²²⁵, and the highly conserved Leu²⁰⁰ and Lys²²⁸. To investigate the minimal structural determinants for coenzyme specificity, several ADH8 mutants involving residues 223 to 225 were engineered and kinetically characterized. Computer-assisted modeling of the docked coenzymes was also performed with the mutant enzymes and compared with the wild-type crystallographic binary complex. The G223D mutant, having a negative charge in the phosphate-binding site, still preferred NADP(H) over NAD(H), as did the T224I and H225N mutants. Catalytic efficiency with NADP(H) dropped dramatically in the double mutants, G223D/T224I and T224I/H225N, and in the triple mutant, G223D/T224I/H225N ($k_{\text{cat}}/K_m\text{NADPH} = 760 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$), as compared with the wild-type enzyme ($k_{\text{cat}}/K_m\text{NADPH} = 133,330 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$). This was associated with a lower binding affinity for NADP⁺ and a change in the rate-limiting step. Conversely, in the triple mutant, catalytic efficiency with NAD(H) increased, reaching values ($k_{\text{cat}}/K_m\text{NADH} = 155,000 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) similar to those of the wild-type enzyme with NADP(H). The complete reversal of ADH8 coenzyme specificity was therefore attained by the substitution of only three consecutive residues in the phosphate-binding site, an unprecedented achievement within the ADH family.

Coenzyme specificity is an important property of NAD(P)-dependent oxidoreductases that is linked to their metabolic function. Thus the type of coenzyme, NAD⁺ or NADP⁺, often distinguishes between enzymes involved in alternative pathways (e.g. oxidative versus reductive or degradative versus biosynthetic). Because NAD⁺ and NADP⁺ only differ structurally in the phosphate group esterified at the 2' position of adenosine ribose, dehydrogenases must possess a limited number of residues to discriminate between the two coenzyme types. Moreover, among dehydrogenases from a given enzyme family, the

same protein fold is often used to bind either coenzyme type and even some enzymes show dual activity, meaning that they can use both coenzymes with similar efficiency (1).

A rather unique NADP-dependent alcohol dehydrogenase (ADH8)¹ was discovered in the gastric tissues of amphibians (2). ADH8 belongs to the medium chain dehydrogenase/reductase (MDR) superfamily and is phylogenetically related to the NAD-dependent vertebrate ADH family. This enzyme is active with ethanol and functionally may participate in the reduction of retinal to retinol (k_{cat}/K_m all-*trans*-retinal = $33,750 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Recently, the three-dimensional structure of the ADH8-NADP⁺ binary complex was determined at 1.8-Å resolution (3). Structural data suggested that the preference for NADP(H) depends on the segment Gly²²³-Thr²²⁴-His²²⁵ (Asp²²³-Ile/Leu²²⁴-Asn²²⁵ in most vertebrate NAD-dependent ADHs; Ref. 4), which together with Leu²⁰⁰ and Lys²²⁸, define a binding pocket for the terminal phosphate group of NADP(H). Henceforth residue numbering will correspond to that of horse ADH1 with the Swiss Prot entry P00327. Interestingly, NADP-dependent ADHs from distantly related microorganisms (5–7), also have a glycine and two more hydrophilic residues at the positions corresponding to 223, 224, and 225, respectively. In ADHs, residue 223 is located at the C-terminal end of the second β -strand of the Rossmann fold (8) and classically is considered as determinant for coenzyme specificity. The substitution D223G, as found in ADH8, would avoid the possible steric and electrostatic hindrances because of the extra phosphate group of NADP(H). In fact, different attempts to switch the coenzyme specificity in medium chain ADHs have been focused on mutations involving residue 223 (9–12). However, full reversal of coenzyme specificity, in terms of having a mutant enzyme as catalytically efficient as the wild type, has been rarely achieved. This implies that conversion of coenzyme specificity may require multiple substitutions in the coenzyme-binding domain. Other residues found in ADH8, such as Thr²²⁴ and His²²⁵, which are making hydrogen bonds with the oxygen atoms from the terminal phosphate group (3), could also be important in defining coenzyme specificity of ADH8.

In the present work, we have investigated, by means of site-directed mutagenesis, steady-state kinetics, and computer modeling, the individual and combined contribution of the adjacent residues Gly²²³-Thr²²⁴-His²²⁵ of ADH8 to coenzyme specificity. Moreover, because the ADH8 sequence is only 30% deviant from the closest NAD-dependent ADH structure (*Rana perezi* ADH1, Ref. 13), it was a suitable candidate for attempting the redesign of coenzyme specificity.

* This work was supported by grants from the Dirección General de Investigación Científica: BMC2000-0132 (to J. F.), BMC2002-02659 (to X. P.), and BIO2002-04419-C02-01 (to I. F.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (Barcelona), Spain. Tel.: 34-93-5812557; Fax: 34-93-5811264; E-mail: jaume.farres@uab.es.

¹ The abbreviations used are: ADH, alcohol dehydrogenase; K_{ia} , dissociation constant for coenzyme; K_{a} , K_{m} for coenzyme; K_{b} , K_{m} for ethanol; MDR, medium chain dehydrogenase/reductase.

TABLE I
Kinetic constants of wild-type and mutant ADH8 with NAD⁺ and NADP⁺ at pH 10.0

Activities were measured with 1 M ethanol and 0.1 M glycine/NaOH at pH 10.

Enzyme	Coenzyme	K_m mM	k_{cat} min ⁻¹	k_{cat}/K_m mM ⁻¹ min ⁻¹
Wild-type	NADP ⁺	0.050 ± 0.002	1,600 ± 80	32,000 ± 6,600
	NAD ⁺	0.50 ± 0.05	1,490 ± 60	2,980 ± 295
G223D	NADP ⁺	0.08 ± 0.01	600 ± 50	7,500 ± 1,100
	NAD ⁺	0.42 ± 0.06	1,550 ± 50	3,690 ± 530
T224I	NADP ⁺	0.20 ± 0.01	900 ± 170	4,500 ± 890
	NAD ⁺	0.44 ± 0.03	2,370 ± 10	5,390 ± 320
H225N	NADP ⁺	0.16 ± 0.01	1690 ± 76	10,560 ± 640
	NAD ⁺	1.7 ± 0.4	1,820 ± 280	1,050 ± 270
G223D/T224I	NADP ⁺	NS ^a	NS	9.0 ± 0.3 ^b
	NAD ⁺	0.130 ± 0.002	1,227 ± 40	9,440 ± 360
T224I/H225N	NADP ⁺	1.37 ± 0.30	50 ± 3	36 ± 9
	NAD ⁺	0.20 ± 0.04	1,850 ± 70	9,250 ± 1,840
G223D/T224I/H225N	NADP ⁺	NS	NS	15 ± 2 ^b
	NAD ⁺	0.020 ± 0.003	2,275 ± 70	113,750 ± 10,700

^a NS, no saturation up to 4.8 and 9.6 mM NADP⁺ for G223D/T224I and G223D/T224I/H225N, respectively.

^b k_{cat}/K_m was calculated as the slope of the linear plot of V versus $[S]$.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Site-directed Mutagenesis—G223D, T224I, H225N, G223D/T224I, and T224I/H225N mutants were obtained using the wild-type ADH8 cDNA cloned into pGEX 4T-2 as a template. The mutations were introduced by sequential steps of PCR. In a first round, two reactions, 1 and 2, were performed with the following primers: 1) RanaL primer, 5'-TTATAGGATCCATGTGCACTGCGGGAAAAGAT-3', and one of the antisense primers containing the mutations (underlined): 223R, 5'-GTCTTTATGGGTATCAACCCCTATAATACG-3'; 224R, 5'-GTCTTTATGGATTCCAACCCCTATAATACG-3'; 225R, 5'-GTCTTTATGGTTCC-AACCCCTATAATACG-3'; 224/225R, 5'-GTCTTTATGGATTCCAACCCCTATAATACG-3'; 2) RanaR primer, 5'-CCACCTGAATTCTTAGTATATCATAATGCTTCG-3' and one of the primers containing the sense mutations. In a final amplification step, purified overlapping PCR products were used as templates, using RanaL and RanaR primers. All reactions were performed in a DNA thermal cycler (MJ Research) with High Fidelity DNA polymerase (Roche Diagnostics) under the following conditions: hot start at 95 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, extension at 68 °C for 12 min (11 cycles to step 2), and a final extension step. All PCR products were purified and cloned into pGEX 4T-2 as for wild-type cDNA (14).

The G223D/T224I and G223D/T224I/H225N mutants were obtained using a method based on the QuikChange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Full-length pGEX 4T-2, containing G223D and T224I/H225N cDNAs, were used as templates to obtain the double and triple mutants, respectively. Mutagenesis was performed by means of a single PCR using an antisense primer containing the mutation (223/224R, 5'-GTCTTTATGGATATCAACCCCTATAATACG-3' or TMR, 5'-GTCTTTATGGATATCAACCCCTATAATACG-3') and primers containing either sense mutation. PCR conditions were the same as above except for the use of Expand Long Template polymerase (Roche). PCR products were incubated with *DpnI* at 37 °C for 60 min. This treatment ensured the digestion of the *dam*-methylated parental strand (15). The resulting nicked circular mutagenic strands were transformed into *Escherichia coli* BL21, where bacterial DNA ligase repaired the nick and allowed normal replication to occur. Prior to expression, all mutated DNAs were completely sequenced, to ensure that unwanted mutations were absent.

Protein Expression and Purification—All mutants were expressed using the conditions previously described for the wild-type enzyme (14). Batch-wise purification of wild-type and T224I enzymes followed identical procedures (14). For G223D, H225N, G223D/T224I, T224I/H225N, and G223D/T224I/H225N mutants, the only difference was the matrix used in the last affinity chromatography step (Cibacron Blue 3-GA; Sigma). The degree of purity for each protein was assessed by means of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Coomassie Blue staining. Protein concentration was determined using the Bio-Rad assay, based on the method of Bradford (16).

Enzyme Activity Assays—Alcohol dehydrogenase activity was determined at 25 °C by monitoring the change in absorbance at 340 nm,

using a Cary 400 Bio (Varian) spectrophotometer. One unit of activity corresponds to 1 μ mol of reduced coenzyme formed or utilized per min, based on an absorption coefficient of 6220 M⁻¹ cm⁻¹ at 340 nm for NADH or NADPH. Cuvette path length was 1 cm in oxidation reactions and 0.2 cm in reduction reactions. Alcohol oxidation was performed in 0.1 M glycine/NaOH, pH 10.0, or in 0.1 M sodium phosphate/NaOH, pH 7.5, using 1 M ethanol or 1.5 mM octanol as a substrate, respectively. For aldehyde reduction, 0.1 M sodium phosphate/NaOH, pH 7.5, and 0.2 mM *m*-nitrobenzaldehyde were used. When saturation could be reached, kinetic parameters were obtained from activity measurements with substrate or coenzyme concentrations that ranged from 0.1 \times K_m to 10 \times K_m . Each individual rate measurement was run in duplicate. Three determinations were performed for each kinetic constant. Kinetic constants were obtained with the non-linear regression program Grafit 5.0 (Erithacus Software Ltd.) and expressed as the mean \pm S.D. Bisubstrate kinetic constants were calculated by fitting data to a Bi-Bi sequential mechanism (17). The standard assays were performed using 1 M ethanol as a substrate in 0.1 M glycine/NaOH, pH 10.0, and 1.2 mM NADP⁺ for wild-type and G223D mutants; 2.4 mM NADP⁺ for T224I and H225N mutants; 0.4 mM NAD⁺ for G223D/T224I/H225N; and 2.4 mM NAD⁺ for G223D/T224I and T224I/H225N mutants.

Deuterium Kinetic Isotope Effect—Kinetic constants for NAD⁺ and NADP⁺ were determined in 0.1 M Gly/NaOH, pH 10.0, with 1 M ethanol-*d*₆ (Merck) or ethanol as a substrate at different coenzyme concentrations, depending on the enzyme assayed. For the G223D/T224I and G223D/T224I/H225N mutants, saturation with NADP⁺ could not be achieved, and thus a single concentration of 4.8 mM NADP⁺ was used to measure enzyme activity. Assay buffer and ethanol-*d*₆ solution were prepared in deuterated water.

Structural Modeling of the Variants—The structures of all the variants were modeled using the available coordinates of the binary complex ADH8-NADP⁺ (Protein Data Bank entry 1P0F, Ref. 3), where the corresponding substituted residues were introduced with the graphics program O (18). Conformations of the replaced residues were initially assumed to be the rotamers that presented less steric constraints. The geometry of the models was then regularized and refined throughout cycles of energy minimization with the program XPLOR (19).

RESULTS

Our study focused on residues 223 to 225 of ADH8, with the aim of testing their role in the phosphate-binding site and attempting the switch of coenzyme specificity. The obvious choice was to mutate Gly²²³, Thr²²⁴, and His²²⁵ to Asp, Ile, and Asn, respectively, because the sequence Asp²²³-Ile/Leu²²⁴-Asn²²⁵ is well conserved among vertebrate NAD-dependent ADHs (4). Therefore, single ADH8 mutants, G223D, T224I, and H225N, double mutants, G223D/T224I and T224I/H225N, and the triple mutant, G223D/T224I/H225N, were generated by

TABLE II
Kinetic constants of wild-type and mutant ADH8 with NAD⁺ and NADP⁺ at pH 7.5

Activities were measured with 1.5 mM octanol and 0.1 M sodium phosphate/NaOH at pH 7.5.

Enzyme	Coenzyme	K_m mM	k_{cat} min ⁻¹	k_{cat}/K_m mM ⁻¹ min ⁻¹
Wild-type	NADP ⁺	0.045 ± 0.007	640 ± 35	14,220 ± 2,330
	NAD ⁺	2.0 ± 0.2	640 ± 15	320 ± 33
G223D	NADP ⁺	0.090 ± 0.008	160 ± 9	1,780 ± 430
	NAD ⁺	0.64 ± 0.02	420 ± 50	655 ± 80
T224I	NADP ⁺	0.07 ± 0.01	330 ± 11	4,715 ± 730
	NAD ⁺	0.36 ± 0.06	560 ± 38	1,555 ± 272
H225N	NADP ⁺	0.11 ± 0.01	590 ± 37	5,360 ± 640
	NAD ⁺	3.0 ± 0.2	450 ± 48	150 ± 21
G223D/T224I	NADP ⁺	NS ^a	NS	1.3 ± 0.1 ^b
	NAD ⁺	0.25 ± 0.03	330 ± 17	1,500 ± 220
T224I/H225N	NADP ⁺	9.0 ± 0.7	95 ± 5	10 ± 1
	NAD ⁺	0.34 ± 0.03	580 ± 31	1,700 ± 160
G223D/T224I/H225N	NADP ⁺	NS	NS	6 ± 1 ^b
	NAD ⁺	0.05 ± 0.01	785 ± 33	15,700 ± 2,890

^a NS, no saturation up to 4.8 and 9.6 mM NADP⁺ for G223D/T224I and G223D/T224I/H225N, respectively.

^b k_{cat}/K_m was calculated as the slope of the linear plot of V versus $[S]$.

site-directed mutagenesis. The expression level for the wild-type enzyme and mutants was ~30 mg/liter of culture. All enzymes were purified to homogeneity with a 10% yield, and they were stable for several weeks when stored at 4 °C.

Steady-state Kinetics of Wild-type and Mutant Enzymes—Steady-state kinetic constants of wild-type and substituted ADH8 with NAD⁺ and NADP⁺, at pH 10.0 and 7.5, determined under saturating concentrations of substrate, are presented in Tables I and II, respectively. Kinetic constants in the reductive direction for NADH and NADPH, at pH 7.5, are shown in Table III.

In the wild-type recombinant ADH8, the kinetic constants were similar to those previously reported for the native enzyme purified from frog stomach tissue (2). At a given pH and with the same substrate, the k_{cat} values attained with NADP(H) and NAD(H) were similar, suggesting a common rate-limiting step, independent of the cofactor used. By contrast, K_m values for NADP(H) were 10–40-fold lower than those for NAD(H). This resulted in an enzyme much more specific for NADP(H), especially at pH 7.5.

Regarding the effect of substitutions on coenzyme kinetics, most of the observations made at pH 10.0 (Table I) could be confirmed at pH 7.5, for both the oxidation (Table II) and the reduction (Table III) reactions. This suggests that the introduced mutations had a similar effect on each coenzyme kinetics, independently of pH and whether the cofactor used was in its oxidized or reduced form. However, the substitutions did have a different effect on whether the cofactor used was NADP(H) or NAD(H).

Single mutations only produced a small decrease (2–8-fold) in the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) with NADP(H). Generally, this was because of an increase in K_m values, whereas k_{cat} values did not significantly change in the mutants. The substitution G223D did not hamper NADP⁺ binding (see below) or change the catalytic rate significantly, as would have been anticipated, but resulted in an enzyme that still preferred NADP(H) over NAD(H). Similar results were obtained for the T224I mutant. The H225N substitution was well tolerated as it had the least effect on NADP(H) kinetics. No pH-dependent effect was observed associated with this mutation, perhaps because in the enzyme the His residue is deprotonated at both pH 7.5 and 10.0.

Single mutations provided a positive effect on NAD(H) kinetics, with a moderate increase in k_{cat}/K_m values. T224I showed the best catalytic efficiency for a single mutant, whereas H225N displayed the lowest catalytic efficiency, mostly due to its high K_m values for this coenzyme. In all single mutants, k_{cat} values for NAD(H) remained essentially constant, which is suggestive of a common rate-limiting step. At any pH employed, none of the three mutants showed a reversal of coenzyme specificity. Only the mutant T224I showed a very similar catalytic efficiency with the two cofactors at pH 10.0 (Table I).

A double mutation, G223D/T224I or T224I/H225N, was the minimal change to show a clearcut effect on coenzyme specificity, both at pH 7.5 and 10.0. The effect was most marked on NADP(H) kinetic constants, especially in the G223D/T224I mutant. This mutant could not be saturated with NADP(H) and thus K_m and k_{cat} values could not be determined. Kinetic constants could only be accurately measured for the T224I/H225N mutant in the oxidative direction: K_m values for NADP(H) increased dramatically (up to 200-fold) and k_{cat} values dropped down 30-fold. Catalytic efficiency with NADP(H) decreased from 1,500 to 10,000-fold for G223D/T224I and from 100 to 1,400-fold for T224I/H225N. Both mutants showed a moderate increase in k_{cat}/K_m values for NAD(H), mostly because of a small decrease in K_m values (more marked in G223D/T224I), with respect to the single mutant T224I. Overall, the double mutants showed a switch in coenzyme specificity, but without reaching full catalytic efficiency with NAD(H), which was only observed in the triple mutant.

The G223D/T224I/H225N triple substitution produced a complete reversal of coenzyme specificity, both at pH 7.5 and 10.0. In comparison with the double mutants, the effect was most marked on the NAD(H) kinetics. Thus, the catalytic efficiency of the triple mutant with NAD(H) increased 30–50-fold with respect to that of the wild-type enzyme, and it was even higher than the k_{cat}/K_m value of the wild-type enzyme with NADP(H). This was mainly provoked by a decrease in K_m values for NAD(H), which paralleled an increase in the affinity for the coenzyme (see below). On the other hand, the triple mutant could not be saturated by NADP(H) and the catalytic efficiency with NADP(H) decreased to about the same order of magnitude as those of the double mutants. Overall, the triple

TABLE III
Kinetic constants of wild-type and mutant ADH8 with NADH and NADPH at pH 7.5

Activities were measured with 0.2 mM *m*-nitrobenzaldehyde and 0.1 M sodium phosphate/NaOH at pH 7.5.

Enzyme	Coenzyme	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
		<i>mM</i>	<i>min</i> ⁻¹	<i>mM</i> ⁻¹ <i>min</i> ⁻¹
Wild-type	NADPH	0.030 ± 0.006	4,000 ± 10	133,330 ± 26,670
	NADH	0.44 ± 0.07	2,455 ± 190	5,580 ± 990
G223D	NADPH	0.110 ± 0.008	1,765 ± 120	16,050 ± 1,590
	NADH	0.150 ± 0.006	1,610 ± 50	10,735 ± 550
T224I	NADPH	0.050 ± 0.001	1,920 ± 80	38,400 ± 1,720
	NADH	0.110 ± 0.008	1,920 ± 10	17,455 ± 1,260
H225N	NADPH	0.080 ± 0.003	4,605 ± 110	57,560 ± 2,535
	NADH	0.660 ± 0.016	2,350 ± 70	3,560 ± 140
G223D/T224I	NADPH	NS ^a	NS	89 ± 7 ^b
	NADH	0.040 ± 0.002	1,500 ± 190	37,550 ± 5,100
T224I/H225N	NADPH	NS	NS	1,250 ± 50 ^b
	NADH	0.150 ± 0.016	2,805 ± 100	18,700 ± 2,100
G223D/T224I/H225N	NADPH	NS	NS	760 ± 21 ^b
	NADH	0.040 ± 0.001	6,200 ± 150	155,000 ± 4,100

^a NS, no saturation up to 1.2 mM NADPH.

^b k_{cat}/K_m was calculated as the slope of the linear plot of *V* versus [*S*].

TABLE IV
Bisubstrate kinetics of wild-type and mutant ADH8 with NAD⁺ and NADP⁺ at pH 10.0

Activities were measured in 0.1 M glycine/NaOH at pH 10.0, with ethanol as a substrate. Standard errors of fits were less than 20%, except for the indicated values.

Enzyme	Coenzyme	K_{ia}	K_a	K_b	k_{cat}	$k_{cat}/K_{ia}K_b$
		<i>mM</i>	<i>mM</i>	<i>mM</i>	<i>min</i> ⁻¹	<i>mM</i> ⁻² <i>min</i> ⁻¹
Wild-type	NADP ⁺	0.02	0.042	25	1,520	3,040
	NAD ⁺	0.56	0.83	31	1,790	103
G223D	NADP ⁺	0.037 ^a	0.14	109	570	141
	NAD ⁺	0.22 ^a	0.33	35	1,100	143
T224I	NADP ⁺	0.028	0.12	98	900	328
	NAD ⁺	0.12 ^a	0.20	41	2,250	457
H225N	NADP ⁺	0.16	0.10	40	1,700	265
	NAD ⁺	0.71	0.88	39	1,795	65
T224I/H225N	NADP ⁺	1.22	1.16	56	76	1
	NAD ⁺	0.12	0.23	68	2,090	256
G223D/T224I/H225N	NADP ⁺	NS ^b	NS	NS	NS	NS
	NAD ⁺	0.017 ^a	0.04	45	2450	3,200

^a Standard errors of fits were 20-30%.

^b NS, no saturation up to 9.6 mM NADP⁺.

mutant was much more NAD(H) specific than wild-type ADH8 was with NADP(H).

Bisubstrate kinetics were performed by covarying the concentrations of ethanol and either coenzyme, and were compatible with a Bi-Bi sequential kinetic mechanism (Table IV). In the enzymatic forms tested, K_m values for ethanol (K_b) ranged between 25 and 110 mM. Single substitutions had modest effects on the k_{cat} value with NADP⁺ but this dropped ~20-fold in the T224I/H225N double mutant and could not be determined in the triple mutant because saturation could not be reached. For the double mutant, this dramatic change in the k_{cat} value with NADP⁺ paralleled an increase in the dissociation (K_{ia}) and Michaelis constant (K_a) values for NADP⁺ by 60- and 30-fold, respectively. In contrast, the k_{cat} value with NAD⁺ remained relatively unchanged in all the substituted forms, suggesting a common rate-limiting step. Catalytic efficiency for NAD⁺, as measured by $k_{cat}/K_{ia}K_b$ (20), increased by 30-fold,

TABLE V
Deuterium kinetic isotope effects of wild-type and mutant ADH8 at pH 10.0

Activities were measured with 1 M ethanol-*d*₆ or ethanol as a substrate and 0.1 M glycine/NaOH at pH 10.0.

Enzyme	NADP ⁺		NAD ⁺	
	k_{catH}/k_{catD}	$(k_{catH}/K_{mH})/(k_{catD}/K_{mD})$	k_{catH}/k_{catD}	$(k_{catH}/K_{mH})/(k_{catD}/K_{mD})$
Wild-type	1.99	1.99	1.85	2.02
G223D	2.04	1.95	1.72	1.86
T224I	1.94	2.04	1.88	2.04
H225N	2.11	2.04	1.87	1.81
G223D/T224I	1.31 ^a	1.15 ^b	1.78	1.57
T224I/H225N	1.03	1.08	1.60	1.80
G223D/T224I/H225N	0.90 ^a	1.02 ^b	2.08	1.66

^a Activity ratio was calculated from a single concentration of coenzyme (4.8 mM NADP⁺) because saturation could not be reached.

^b k_{cat}/K_m was calculated as the slope of the linear plot of *V* versus [*S*], since saturation could not be reached.

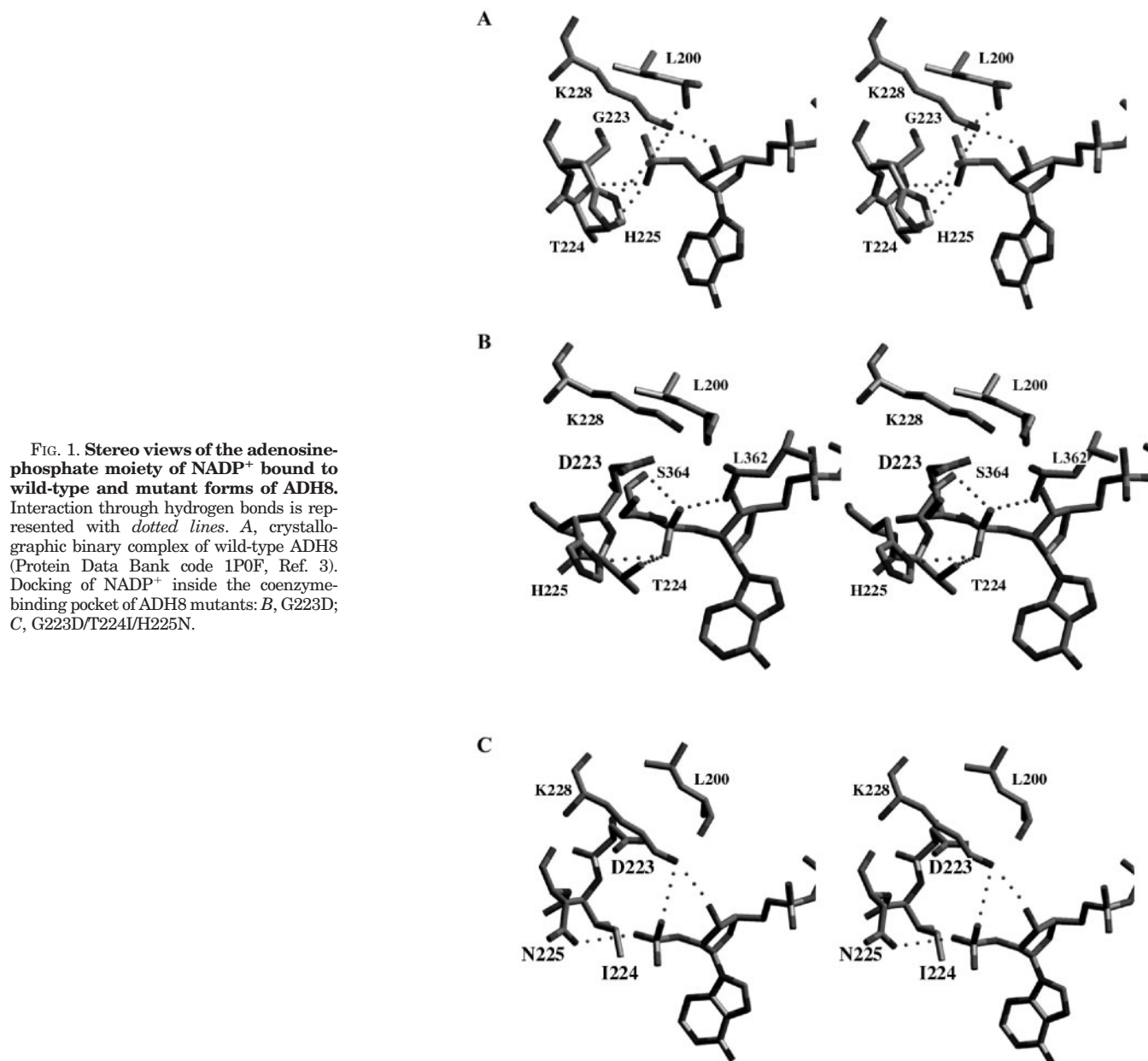


FIG. 1. Stereo views of the adenosine-phosphate moiety of NADP⁺ bound to wild-type and mutant forms of ADH8. Interaction through hydrogen bonds is represented with dotted lines. A, crystallographic binary complex of wild-type ADH8 (Protein Data Bank code 1POF, Ref. 3). Docking of NADP⁺ inside the coenzyme-binding pocket of ADH8 mutants: B, G223D; C, G223D/T224I/H225N.

reaching the same level as that of the wild-type enzyme for NADP⁺.

The kinetic isotope effect was studied with deuterated ethanol in the presence of either coenzyme. A substrate kinetic isotope effect of ~2-fold was observed with either NADP⁺ or NAD⁺ in the wild-type ADH8 (Table V), suggesting that hydride transfer may be the rate-limiting step during catalysis. When using NADP⁺ as a cofactor, the same increase was only seen in the single mutant forms. In contrast, the double and triple mutants did not display any significant isotope effect, indicating that hydride transfer was no longer rate-limiting. With NAD⁺ as a coenzyme, the 2-fold isotope effect was obtained for all the mutant forms.

Computer Modeling of Binary Complexes—Docking simulations of NADP⁺ and NAD⁺ to the wild-type and mutant enzymes were performed based on the three-dimensional structure of the binary complex ADH8-NADP⁺ (3). In this structure, the oxygen atoms from the extra phosphate group interact through five hydrogen bonds with the side chains of Thr²²⁴, His²²⁵, Lys²²⁸, and the nitrogen main chain atoms of Leu²⁰⁰

and Thr²²⁴ (Fig. 1A). In the G223D-NADP⁺ complex, steric and electrostatic hindrances by the side chain of Asp²²³ force the coenzyme phosphate to relocate in the binding site, moving away from Lys²²⁸ (compare Fig. 1, B and A). Thus, as a result of the G223D mutation, hydrogen bonds with Leu²⁰⁰, Lys²²⁸, and the nitrogen main chain atom of Thr²²⁴ are missing. But these losses are partially compensated by the existence of two new hydrogen bonds between the same oxygen atom of the terminal phosphate and the carbonyl oxygen atom of Leu³⁶² and the oxygen atom of Ser³⁶⁴. Thus, one oxygen atom of the extra phosphate group is left without interacting, although it could do so through a water molecule. Small differences are observed in T224I-NADP⁺ and H225N-NADP⁺ complexes with respect to NADP⁺ docked to the wild-type enzyme. In both cases, two hydrogen bond interactions involving the extra phosphate are lost, but a new hydrogen bond is formed in such a way that all the oxygen atoms of the extra phosphate group are interacting with some residue (data not shown). When comparing NADP⁺ binding to the T224I/H225N mutant with respect to the wild-type enzyme, an oxygen atom of the extra phos-

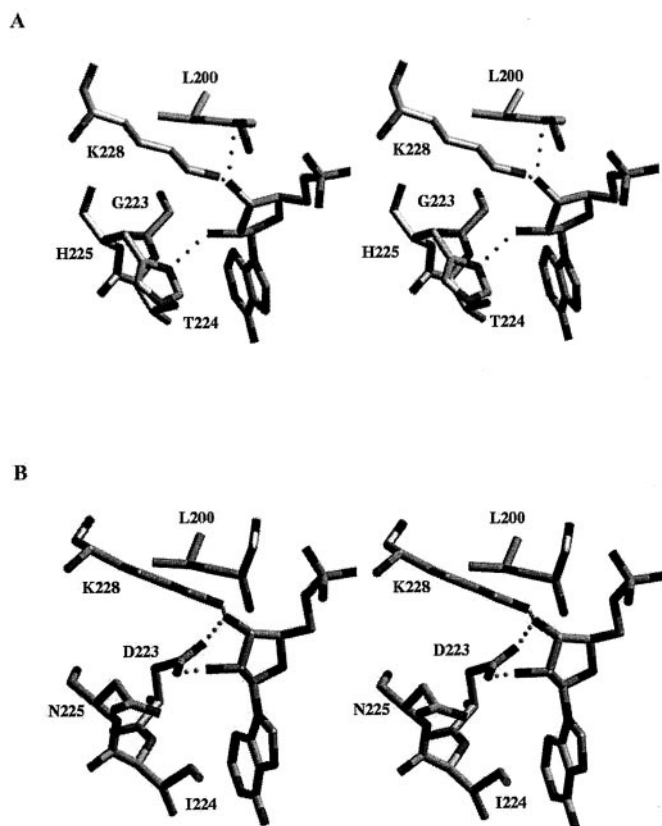


FIG. 2. Stereo views of the adenosine moiety of NAD⁺ docked inside the coenzyme-binding pocket of wild-type ADH8 and triple mutant. Interaction through hydrogen bonds is indicated with dotted lines. A, wild-type ADH8; B, G223D/T224I/H225N.

phate group would not interact with any residue, but it is conceivable that it could do so through a water molecule (data not shown).

In the simulation of docking NADP⁺ to the G223D/T224I/H225N mutant, as it was previously observed for the G223D mutant, there is a relocation of the coenzyme. In this case, although, several protein-phosphate interactions (three hydrogen bonds) are lost and they are not compensated by new hydrogen bond formation. As a result, an oxygen atom of the extra phosphate group does not interact with any residue, although interaction through water molecules is still possible (compare Fig. 1, C and A).

Remarkably, in the binary complex of the triple mutant with NAD⁺, Asp²²³ interacts with the 2' and 3' oxygen atoms of ribose, and Lys²²⁸ is hydrogen bonded with the 3' oxygen (compare Fig. 2, B and A). These features are characteristic of NAD-dependent ADHs (21–24). Likewise, a hydrophobic interaction is gained between the adenine ring and Ile²²⁴, which is not seen in the complex of the triple mutant with NADP⁺ (compare Figs. 2B and 1C). This hydrophobic interaction is also typical of NAD-dependent ADHs and other NAD-dependent enzymes (25).

DISCUSSION

ADH8 is unique within the vertebrate ADH family in that it uses preferentially NADP(H) as a cofactor (2). ADH8 also binds NAD(H), but with K_m values that are 10 to 40 times higher than those for NADP(H). Structural studies on the binary complex ADH8-NADP⁺ suggested that a phosphate binding pocket is configured by non-conserved residues 223, 224, and 225, and the highly conserved Leu²⁰⁰ and Lys²²⁸ (3). However, the contribution of these residues to the discrimination be-

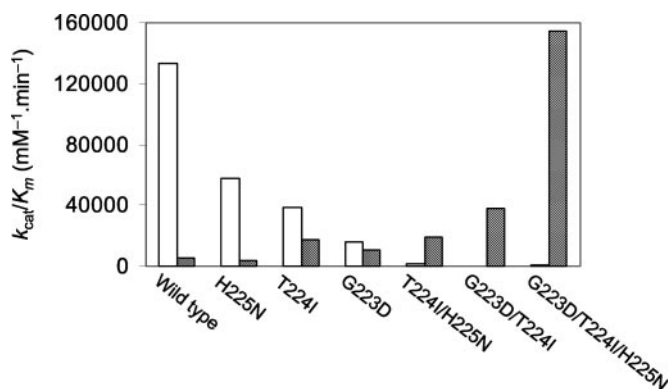


FIG. 3. Bar graph representing the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for each coenzyme of the wild-type and ADH8 mutants. NADPH, white bars; NADH, hatched bars. Data are taken from Table III.

tween NAD(H) and NADP(H) remains unknown. This fundamental question and the challenge of reverting coenzyme specificity prompted us to perform the present site-directed mutagenesis study. Therefore adjacent residues 223, 224, and 225 were systematically mutated and checked, separately or in different combinations.

Effect of Substitutions on the Rate-limiting Step and Catalytic Constant—In ADH8 single mutants, k_{cat} values for NADP(H) decreased slightly, whereas a moderate increase in K_{ia} values for NADP⁺ was observed. Hydride transfer appeared to be the rate-limiting step. In contrast, in the T224I/H225N mutant, k_{cat} values for NADP⁺ suffered a sharp decrease, which was associated with a marked increase in the K_{ia} value for NADP⁺. In this regard, in double and triple mutants, the catalytic efficiency dropped dramatically, reflecting the fact that K_m values for NADP(H) increased, and even in most cases saturation could not be reached, and apparent k_{cat} values likely decreased. In concordance with this observation, the kinetic isotope effect was lost, indicating a change in the rate-limiting step, no longer being hydride transfer. A slower limiting step, such as a conformational change associated with coenzyme binding could be involved. However, at this time, we have no evidence for a conformational change upon coenzyme binding, because the crystal structure of the apoenzyme showed a closed conformation (3). On the other hand, it is likely that coenzyme dissociation was not the new rate-limiting step because the increase in K_{ia} values was not followed by an increase in k_{cat} values.

The k_{cat} values for NAD(H) remained relatively unchanged for the mutant enzymes with respect to the wild-type recombinant ADH8, indicating that the rate-limiting step was likely the same for all the enzymatic forms when NAD(H) was the coenzyme. This result was consistent with the finding of a slight deuterium kinetic isotope effect whenever NAD⁺ was the coenzyme, suggesting that hydride transfer was rate-limiting. Hydride transfer has also been found limiting in other ADHs using ethanol as a substrate, such as human ADH3 (26) and horse liver I269S (27). The finding in ADH8 differs from what has been described for horse liver ADH and other ADH forms, with ethanol and other aliphatic alcohols as substrates, where the rate-limiting step is NADH dissociation (28, 29). In those cases, an increase in K_{ia} and K_{iq} (dissociation constants for NAD and NADH, respectively) often parallels an increase in k_{cat} values, which is not observed in ADH8.

Residue 223 Is Not the Only Discriminating Residue for Coenzyme Specificity—In the coenzyme-binding domain of NAD-dependent dehydrogenases with the Rossmann fold, an acidic residue (Asp²²³ in NAD-dependent ADHs, Ref. 4) is located at

the C-terminal end of the second β -strand (30). Asp²²³ is doubly hydrogen bonded to the adenine ribose diol in ADH-NAD⁺ complexes (21–24). The significance of this acidic residue has been observed long ago and has been considered a fingerprint for NAD(H) binding pockets (8, 31). In ADHs, it has been proposed as the residue that discriminates against NADP(H) (9). NADP-dependent enzymes exhibit a smaller and uncharged residue, usually Gly, Ala, or Ser (3, 10, 32–34), that would reduce steric and electrostatic hindrances on binding of the extra phosphate group of NADP(H). Thus, to reverse coenzyme specificity, several studies have targeted this residue by site-directed mutagenesis. In one case, the homologous Asp residue in yeast ADHI was substituted by Gly and the resulting D223G mutant utilized the two coenzymes with similar but very low efficiency (9). In cinnamyl alcohol dehydrogenase, an NADP-dependent enzyme from the MDR superfamily, the equivalent reverse mutation S212D did not change the coenzyme specificity either (10). Similarly, the substitution of the corresponding Asp in other NAD-dependent dehydrogenases having the Rossmann fold did not generate NADP-dependent enzymes, although substitution improved the catalytic efficiency for NADP⁺ and made it worse for NAD⁺ (35, 36).

In the present paper, single mutations G223D, T224I, and H225N only provided small changes to coenzyme kinetics, which were slightly detrimental for NADP(H) and beneficial for NAD(H). For NADP(H), in general, there existed a good correlation between the loss of a few hydrogen bonds and electrostatic interactions, and a modest increase in K_m and K_{ia} values, as predicted by molecular docking simulations. In particular, the substitution G223D did not greatly hamper NADP⁺ binding as it would have been anticipated but resulted in an enzyme that still preferred NADP(H) over NAD(H) (Fig. 3) although with a lower catalytic constant. The modeling results for the G223D mutant confirm the generation of unfavorable steric and electrostatic conditions on NADP(H) binding. But interestingly, the extra phosphate group of coenzyme can still be accommodated in the coenzyme binding pocket by moving away from Asp²²³ and Lys²²⁸, at the expense of losing some hydrogen bonds and favorable electrostatic interactions. According to these results and confirming previous findings in other ADHs (9–12), Asp²²³ alone cannot be considered the discriminating residue in the coenzyme specificity of ADH8, and thus the combined substitutions in other positions along with that of residue 223 would be important as well.

Complete Reversal of Coenzyme Specificity in the Triple Mutant—In the triple mutant, the attained K_m , k_{cat} , and k_{cat}/K_m values for NAD(H) and K_{ia} for NAD⁺ are in the same order of magnitude as those for NADP(H) in the wild-type enzyme. Thus, complete reversal of coenzyme specificity has been achieved (Fig. 3). Moreover, the k_{cat}/K_m values with NAD(H) obtained in the triple mutant are similar to those of typical NAD-dependent ADHs (37–42). It is conceivable that some kind of threshold in catalytic power has been attained in many ADHs regarding coenzyme usage. Overall, the triple mutant is much more “coenzyme specific” than the wild-type enzyme, as illustrated by the ratio $k_{cat}/K_m(\text{NADH})/k_{cat}/K_m(\text{NADPH})$ (Fig. 3). This behavior is typical of NAD-dependent vertebrate ADHs, which frequently are highly specific for NAD(H) although some have residual activity with NADP(H). In the triple mutant, the extra phosphate group poses steric and electrostatic problems for NADP(H) binding, especially because of the presence of both Asp²²³ and a less hydrophilic environment at positions 224 and 225. In contrast, NAD(H) can easily be accommodated in the vacant phosphate-binding site (with Gly) and interact with His²²⁵ and Lys²²⁸ in the NADP-dependent wild-type enzyme.

Synergistic Effects between Adjacent Residues Determine Co-

enzyme Specificity—Our results highlight the importance of cooperative or synergistic effects between two or more adjacent amino acid residues. Single amino acid substitutions had only very limited effects, whereas double and triple mutations involving the same residues caused great changes on coenzyme binding and kinetics. In ADH8, it is the combined contribution of these groups, interacting with one another and with the coenzyme, that provides alternative binding sites for the adenosine/adenosine-phosphate moiety of NAD(H)/NADP(H). NAD(H) requires the simultaneous presence of Asp²²³, Ile²²⁴, and Asn²²⁵, although it does not interact with Asn²²⁵ in ADH8 nor in other ADH structures. NADP(H) needs Gly²²³, Thr²²⁴, and His²²⁵, but it does not interact with Gly²²³. Apparently, in ADH8, the small side chain of Gly²²³ provides additional space for the phosphate group of NADP(H) to interact with Lys²²⁸, while in the triple mutant Asn²²⁵ leaves more space than His, for the adenine ring of NAD(H) to interact hydrophobically with Ile²²⁴. Asp²²³ helps discriminate against NADP(H) and provides hydrogen bonding at the precise distance for NAD(H) to interact properly with Ile²²⁴ and Lys²²⁸. Lys²²⁸ is a versatile highly conserved residue that performs a dual function, *i.e.* the electrostatic interaction with the extra phosphate of NADP(H) or the hydrogen bond interaction with the 3' oxygen of NAD(H) ribose. It is clear that each of these residues has in ADH8 a different function from that in NAD-dependent ADHs. As expected, ionic interactions play a predominant role in NADP(H) binding, whereas hydrogen bonding and hydrophobic interactions are more prevalent for NAD(H) binding. The present results are consistent with the previous finding that NADP⁺ binds to ADH8 in a similar conformation to that of NAD⁺ found in ADH binary complexes, showing small differences only in the adenosine moiety of coenzyme (3).

The most effective switches in coenzyme specificities have come from multiple mutations in different regions of the primary structure of dehydrogenases (43–46). In contrast, the complete reversal of coenzyme specificity in ADH8 has been obtained by means of substitution of only three consecutive amino acid residues. The absence of an acidic residue together with the presence of polar residues around the extra phosphate group contribute to the NADP(H) specificity of ADH8. ADH architecture appears to be flexible enough to satisfy changes in coenzyme requirements and thus NADP-dependent enzymes have convergently evolved within the MDR superfamily at different times using seemingly different strategies and independent pathways: *e.g.* secondary ADH in bacteria (5–7), cinnamyl ADH in plants and fungi (10), quinone oxidoreductase in animals and bacteria (33), sorbitol dehydrogenase in insects (34), and ADH8 in amphibians (3). Our data support that concerted evolution of adjacent amino acid residues (223 to 225) within a short sequence segment, requiring minimally four point mutations in the gene sequence, has allowed coenzyme specificity in amphibian ADH to switch. This may reflect ADH8 late enzymogenesis, with a relatively recent evolutionary origin of this NADP-dependent structure from an ancestral NAD(H)-specific structure (class I ADH, 70% identity), as well as a fast functional adaptation to different metabolic needs (*i.e.* reduction of aldehydes, such as retinal, instead of oxidation of alcohols) (2). Undoubtedly, the simplicity of these evolutionary changes has contributed to facilitate the redesign of the coenzyme-binding site and to achieve the complete reversal of coenzyme specificity reported here.

Acknowledgment—We thank A. A. Santos for performing site-directed mutagenesis, expression, and purification of T224I and H225N mutants.

REFERENCES

1. Backer, P. J., Britton, K. L., Rice, D. W., Rob, A., and Stillman, T. J. (1992) *J. Mol. Biol.* **228**, 662–671
2. Peralba, J. M., Cederlund, E., Crosas, B., Moreno, A., Julià, P., Martínez, S. E., Persson, B., Farrés, J., Parés, X., and Jörnvall, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 26021–26026
3. Rosell, A., Valencia, E., Parés, X., Fita, I., Farrés, J., and Ochoa, W. F. (2003) *J. Mol. Biol.* **330**, 75–85
4. Sun, H. W., and Plapp, B. V. (1992) *J. Mol. Evol.* **34**, 522–535
5. Burdette, D. S., Vieille, C., and Zeikus, J. G. (1996) *Biochem. J.* **316**, 115–122
6. Korkhin, Y., Kalb, A. J., Peretz, M., Bogin, O., Burstein, Y., and Frolow, F. (1998) *J. Mol. Biol.* **278**, 967–981
7. Kumar, A., Shen, P. S., Descoteaux, S., Pohl, J., Bailey, G., and Samuelson, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10188–10192
8. Rossmann, M. G., Moras, D., and Olsen, K. W. (1974) *Nature* **250**, 194–199
9. Fan, F., Lorenzen, J. A., and Plapp, B. V. (1991) *Biochemistry* **30**, 6397–6401
10. Lauvergeat, V., Kennedy, K., Feuillet, C., McKie, J. H., Gorrichon, L., Baltas, M., Boudet, A. M., Grima-Pettenati J., and Douglas, K. T. (1995) *Biochemistry* **34**, 12426–12434
11. Metzger, M. H., and Hollenberg, C. P. (1995) *Eur. J. Biochem.* **228**, 50–54
12. Fan, F., and Plapp, B. V. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **367**, 240–249
13. Cederlund, E., Peralba, J. M., Parés, X., and Jörnvall, H. (1991) *Biochemistry* **30**, 2811–2816
14. Valencia, E., Rosell, A., Larroy, C., Farrés, J., Biosca, J. A., Fita, I., Parés, X., and Ochoa, W. F. (2003) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **59**, 334–337
15. Nelson, M., and McClelland, M. (1992) *Methods Enzymol.* **216**, 279–303
16. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
17. Cleland, W. W. (1979) *Methods Enzymol.* **63**, 103–138
18. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991) *Acta Crystallogr. Sect. A* **47**, 110–119
19. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905–921
20. Plapp, B. V. (1995) *Methods Enzymol.* **249**, 91–119
21. Eklund, H., Samama, J. P., and Jones, T. A. (1984) *Biochemistry* **23**, 5982–5996
22. Hurley, T. D., Bosron, W. F., Hamilton, J. A., and Amzel, L. M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 8149–8153
23. Xie, P., Parsons, S. H., Speckhard, D. C., Bosron, W. F., and Hurley, T. D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 18558–18563
24. Svensson, S., Höög, J. O., Schneider, G., and Sandalova, T. (2000) *J. Mol. Biol.* **302**, 441–453
25. Carugo, O., and Argos, P. (1997) *Proteins* **28**, 10–28
26. Lee, S. L., Wang, M. F., Lee, A. I., and Yin, S. J. (2003) *FEBS Lett.* **544**, 143–147
27. Fan, F., and Plapp, B. V. (1995) *Biochemistry* **34**, 4709–4713
28. Brändén, C. I., and Eklund, H. (1980) *Experientia Suppl. (Basel)* **36**, 40–84
29. Stone, C. L., Bosron, W. F., and Dunn, M. F. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 892–899
30. Bellamacina, C. R. (1996) *FASEB J.* **10**, 1257–1269
31. Ohlsson, I., Nordstrom, B., and Brändén, C. I. (1974) *J. Mol. Biol.* **89**, 339–354
32. Lesk, A. M. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 775–783
33. Edwards, K. J., Barton, J. D., Rossjohn, J., Thorn, J. M., Taylor, G. L., and Ollis, D. L. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **328**, 173–183
34. Banfield, M. J., Salvucci, M. E., Baker, E. N., and Smith, C. A. (2001) *J. Mol. Biol.* **306**, 239–250
35. Feeney, R., Clarke, A. R., and Holbrook, J. J. (1990) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **166**, 667–672
36. Chen, Z., Lee, W. R., and Chang, S. H. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202**, 263–267
37. Bosron, W. F., Li, T. K., Dafeldecker, W. P., and Vallee, B. L. (1979) *Biochemistry* **20**, 1101–1105
38. Bosron, W. F., Magnes, L. J., and Li, T.-K. (1983) *Biochemistry* **22**, 1852–1857
39. Burnell, J. C., and Bosron, W. F. (1989) in *Human Metabolism of Alcohol* (Crow, K. E., and Batt, R. D., eds) Vol. II, pp. 65–75, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL
40. Farrés, J., Moreno, A., Crosas, B., Peralba, J. M., Allali-Hassani, A., Hjelmqvist, L., Jörnvall, H., and Parés, X. (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**, 549–557
41. Peralba, J. M., Crosas, B., Martínez, S. E., Julià, P., Farrés, J., and Parés, X. (1999) *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**, 343–350
42. Crosas, B., Allali-Hassani, A., Martínez, S. E., Martras, S., Persson, B., Jörnvall, H., Parés, X., and Farrés, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 25180–25187
43. Scrutton, N. S., Berry, A., and Perham, R. N. (1990) *Nature* **343**, 38–43
44. Mittl, P. R. E., Berry, A., Scrutton, N. S., Perham, R. N., and Schulz, G. E. (1993) *J. Mol. Biol.* **231**, 191–201
45. Mittl, P. R. E., Berry, A., Scrutton, N. S., Perham, R. N., and Schulz, G. E. (1994) *Protein Sci.* **3**, 1504–1514
46. Bocanegra, J. A., Scrutton, N. S., and Perham, R. N. (1993) *Biochemistry* **32**, 2737–2740

RESUM I DISCUSSIÓ DELS RESULTATS DE L'ARTICLE : Complete Reversal of Coenzyme Specificity by Concerted Mutation of Three Consecutive Residues in Alcohol Dehydrogenase.

Publicat a J. Biol. Chem. **278** (42): 40573 - 80

L'ADH8 és l'única de la família de les ADHs de vertebrats que utilitza preferentment NADP(H) com a cofactor, tot i que és capaç d'unir NAD(H) però amb molt menys afinitat, amb valors de K_m de 10 a 40 vegades superiors que per NADP(H). Els estudis estructurals del complex binari ADH8-NADP⁺, com hem vist en el capítol 2, suggereixen que la butxaca d'unió a fòsfat està configurada pels residus no conservats 223, 224 i 225 i els residus altament conservats Leu200 i Lys228. Es desconeixia la manera com contribueixen aquests residus a la discriminació entre NAD(H) i NADP(H).

En aquest capítol es recullen els resultats de la caracterització cinètica dels mutants pels residus no conservats 223, 224 i 225. Els experiments de mutagènesi dirigida van ser dissenyats per donar resposta a la qüestió fonamental de com discriminen aquests residus entre NAD(H) i NADP(H) i si es podria revertir l'especificitat per coenzim amb mutacions puntuals. Els resultats d'aquests experiments queden resumits a continuació, comprovarem com l'efecte de reversió en l'especificitat de NADP⁺ a NAD⁺ apareix en el triple mutant.

També es descriu gràficament, a partir de modelats, la manera com afectarien a l'especificitat d'unió i per tant a l'activitat de l'enzim les interaccions dels residus mutats amb el coenzim concret. Es van modelar els coenzims NADP⁺ i NAD⁺ a l'interior de la butxaca d'unió a cada un dels tipus de mutants generats i aquests es van comparar amb el modelat per l'enzim salvatge i per la unió del cofactor NAD⁺. De l'estudi global d'aquests resultats s'extreu que l'efecte d'aquestes mutacions afecta disminuint l'afinitat per NADP⁺ i en un canvi en l'etapa limitant de la reacció.

Cal destacar però, que la part dels treballs del paper que volem exposar en aquesta tesi és concretament la que es correspon amb els treballs de modelat i que per aquesta raó han estat descrits i analitzats amb més deteniment que els experiments de mutagènesi dirigida i cinètica enzimàtica, que en realitat es van dur a terme per altres coautors del paper.

1. Efecte de les substitucions en l'Etapa limitant de la reacció i en la Constant Catalítica

Es van mutar sistemàticament els residus adjacents: 223, 224 i 225 per separat i amb diferents combinacions i es va estudiar quin era l'efecte provocat per aquestes mutacions en l'etapa limitant i en la constant catalítica. Els mutants senzills de ADH8 que es van generar per mètodes de mutagènesi dirigida van ser concretament G223D, T224I i H225N. Cada un d'aquests mutants per separat provocava una disminució insignificant de la k_{cat} (es mantenia quasi invariable la capacitat catalítica de l'enzim) i un increment moderat en els valors de K_{ia} per $NADP^+$ (disminuïa moderadament l'afinitat per coenzim). L'etapa limitant semblava ser la transferència hídrida.

Es van fer estudis de cinètica bisubstrat covariant les concentracions tant d'etanol com de coenzim a pH 10.0 de $NADP^+$ i NAD^+ . En els dobles i triple mutants l'eficiència catalítica disminueix dramàticament, reflectint el fet que els valors de K_m per $NADP(H)$ incrementen i fins i tot en la majoria dels casos no s'arriba a la saturació. Els dobles mutants G223 / T224I o T224I / H225N, afecten la relació d'especificitat per coenzim però sense enriquir del tot l'eficiència catalítica amb $NAD(H)$, cosa que només s'observa en el triple mutant que produeix la reversió completa de l'especificitat per coenzim, adquirint una eficiència catalítica amb $NAD(H)$ de 30 a 50 vegades superior a la que té l'enzim ADH8 salvatge, arribant a ser el valor de K_{cat} / K_m amb $NAD(H)$ superior al de l'ADH8 salvatge amb $NADP(H)$. El triple mutant no pot ser saturat per $NADP(H)$ i la disminució d'eficiència catalítica amb $NADP(H)$ és del mateix ordre que en els dobles mutants.

Es va estudiar també l'efecte cinètic d'isòtops dels mutants d'ADH8 i d'ADH8 salvatge utilitzant com a substrat etanol deuterat (etanol- d_6) en presència de cada un dels coenzims. L'efecte cinètic per l'ADH8 salvatge, tant amb NAD^+ com $NADP^+$ resultava ser aproximadament el doble que pels mutants dobles i el triple mutant. Això suggereix que la transferència hídrida hauria de ser l'etapa limitant durant la catàlisi. Quan s'utilitza $NADP^+$ com a cofactor aquest efecte només s'aprecia en els mutants senzills, els dobles i triples mutants no el presenten, però amb NAD^+ l'efecte es veu en tots els mutants, es comporten com l'ADH8 salvatge. Així doncs, en els mutants dobles i el triple mutant l'efecte cinètic de l'isòtop es perdia quan utilitza $NADP^+$ com a cofactor,

indicant un canvi en l'etapa limitant, deixa d'haver transferència hídrida. Aquest canvi pot estar relacionat amb un canvi conformacional associat a la unió del coenzim del que no tenim evidències perquè l'estructura cristal·lina de l'apoezim mostrava una conformació tancada.

D'altra banda, és molt possible que la dissociació del coenzim no sigui l'etapa limitant perquè l'increment de la K_{ia} (l'increment en la constant de dissociació del coenzim suposa una davallada en l'afinitat per NADP, aquest es dissocia de l'enzim amb més facilitat) no va seguida d'un increment en la K_{cat} (que es dissociï més fàcilment el coenzim no millora la capacitat catalítica d'aquest). La K_{cat} per NAD(H) es manté bastant invariable, això és consistent amb que s'hagi trobat una cinètica de l'isòtop deuteri insignificant quan el coenzim és el NAD^+ , reacció en la qual la transferència hídrida es l'etapa limitant, com també ho és en altres ADHs que usen etanol com a substrat, com seria la ADH3 (Lee i col., 2003) o el mutant I269S de la ADH de cavall (Fan i Plapp, 1995) i a diferència del que es coneixia de l'ADH de cavall i altres ADHs específiques d'etanol i alcohols alifàtics en què l'etapa limitant és la dissociació de NADH (l'increment en K_{ia} i K_{iq} , constants de dissociació per NAD i NADH respectivament, és a dir l'alliberació de cofactor reduït afavoria la constant catalítica, feia incrementar la K_{cat})

2. Modelat dels complexos binaris

Es van fer la simulació de col·locar NADP^+ i NAD^+ a la butxaca d'unió a coenzim als enzims salvatges i mutants a partir de l'estructura 3D coneguda del complex binari ADH8- NADP^+ .

Tal com es mostra a la figura 1 del paper es poden identificar les interaccions establertes entre el cofactor i els residus de proteïna en els diferents complexos:

- ADH8- NADP^+ : Els àtoms d'hidrogen del grup fosfat extra interaccionen amb cinc enllaços d'hidrogen de les cadenes laterals de Thr224, His225 i Lys228 i el nitrogen de la cadena principal de Leu200 i Thr224.
- G223D- NADP^+ : Les interaccions estèriques i electrostàtiques amb la cadena lateral d' Asp223 forcen al coenzim a recolzar-se en el lloc d'unió i allunyar-se de Lys228.

Els enllaços amb Leu200, Lys228 i Thr224 es perden. Aquesta pèrdua es compensa parcialment per l'existència de dos enllaços d'hidrogen nous entre el mateix àtom

d'oxigen del fosfat terminal i l'oxigen carbonil de Leu362 i l'àtom d'oxigen de Ser364. Un àtom d'oxigen del fosfat extra queda sense interaccionar, podria fer-ho amb un aigua.

- T224I-NADP⁺ i H225N-NADP⁺: les dues interaccions per ponts d'hidrogen involucrades amb el fosfat extra es perden, però es forma un nou pont d'hidrogen de manera que tots els àtoms d'oxigen del grup fosfat extra estan interaccionant amb algun residu.
- (T224I / H225N)-NADP⁺: Si comparem amb el complex salvatge ADH8-NADP⁺, un oxigen del PO₃ no interacciona amb cap residu i potser ho faria amb una aigua.
- (G223D / T224I / H225N)-NADP⁺: Es dona una recol·locació del coenzim tal com passa a G223D. Es perden tres ponts d'hidrogen que no es compensen per nous ponts d'hidrogen. Un dels oxígens del PO₃ no interacciona amb cap residu i potser ho faria amb molècules d'aigua.
- (G223D / T224I / H225N)-NAD⁺: Aquest mutant pren el patró característic de les ADHs dependents de NAD⁺ que consisteix en un enllaç entre Asp223 i els oxígens 2' i 3' de la ribosa i un enllaç d'hidrogen entre la Lys228 i l'oxigen 3' de la ribosa. Es guanyen interaccions hidrofòbiques entre l'anell de l'adenina i la Ile224 (això no apareix en el complex del triple mutant amb NADP⁺). Aquestes interaccions hidrofòbiques són també típiques d'ADHs i altres enzims dependents de NAD.

El residu 223 no és l'únic residu que discrimina l'especificitat de coenzim. En ADHs amb "Rossmann fold" dependents de NAD un residu acídic (Asp223 en ADHs dependents de NAD) està localitzat a l'extrem C-terminal de la segona làmina β. L'Asp223 forma dos ponts d'hidrogen amb l'adenin ribosa diol en el complex ADH-NAD⁺. És molt significatiu i està considerat determinant de la butxaca d'unió de NAD(H). Els enzims dependents de NADP tenen un residu petit i no carregat, normalment : Gly, Ala o Ser, això redueix les relacions estèriques i electrostàtiques que es donarien en unir el grup fosfat extra del NADP(H).

A més d'aquest fet hi ha estudis de mutagènesi dirigida en aquest residu que reverteixen l'especificitat de coenzim, p.e., el mutant D223G de la ADHI de llevat utilitza els dos coenzims amb eficiència similar encara que molt baixa (Fan i col., 1991). A la Cinamil alcohol deshidrogenasa, que és una MDR dependent de NADP, la mutació del residu equivalent però a la inversa, S212D no provoca cap canvi en absolut en l'especificitat per cofactor (Lauvergeat i col., 1995). La substitució de l'Asp corresponent en altres deshidrogenases dependents de NAD que tenen "Rossmann fold" no genera enzims dependents de NADP, però sí és cert que millora l'eficiència catalítica amb NADP⁺ i l'empitjora amb NAD⁺.

Les mutacions senzilles G223D, T224I, H225N, només donen petits canvis en la cinètica de coenzim en detriment no molt significatiu de l'afinitat per NADP(H) i benefici per NAD(H). Pel NADP(H) existeix una correspondència entre pèrdua d'alguns ponts d'hidrogen i interaccions electrostàtiques que es poden predir amb els modelats i un modest increment en la K_m i el la K_{ia} (disminució d'afinitat). G223D no impedeix la unió de NADP⁺, l'enzim segueix preferint NADP(H) davant de NAD(H) però amb una K_{cat} més baixa.

El modelat confirma la generació de condicions estèriques desfavorables per la unió del NADP(H). Però el grup fosfat encara es pot acomodar enretirant-se de l'Asp223 i la Lys228, a costa de perdre alguns ponts d'hidrogen i interaccions electrostàtiques. L'Asp 223 no es pot considerar per ell mateix el residu discriminador de l'especificitat de coenzim en ADH8, altres posicions també són importants.

3. Reversió completa d'especificitat de coenzim en el triple mutant

Els valors de K_m , K_{cat} i K_{cat}/K_m per NAD(H) i K_{ia} per NAD⁺ són de la mateixa magnitud que per NADP(H) en l'enzim ADH8 salvatge i aquests són valors de K_{cat}/K_m semblants als típics per les ADHs dependents de NAD. En el triple mutant els grup fosfat té problemes estèrics i electrostàtics per unir-se sobretot per la presència de l'Asp223 i l'ambient menys hidrofòbic en les posicions 224 i 225, en canvi el NAD pot entrar al lloc d'unió i interaccionar amb la His225 i la Lys228 en la ADH8 salvatge dependent de NADP.

L'especificitat per coenzim ve determinada per efectes sinèrgics entre residus adjacents.

Els efectes de les mutacions simples són limitats, mentre que les mutacions dobles i la triple mutació provoquen grans canvis en la cinètica d'unió dels coenzims, podríem dir que es dona un efecte sinèrgic cooperatiu entre dos o més residus.

El NAD(H) requereix simultàniament Asp223, Ile224 i Asn225 (sense interaccionar amb aquesta última ni en ADH8 ni tampoc en altres ADHs) i el NADP(H) requereix Gly223, Thr224 i His225. La Gly223 no interacciona directament sinó que la seva cadena lateral mínima aporta un espai addicional pel grup fosfat del NADP(H) per interactuar amb la Lys228, mentre que en el triple mutant l'Asn225 deixa més espai que la His per tal que l'anell adenina del NAD(H) interaccioni apropiadament amb la Ile224 i la Lys228.

La Lys228 és un residu versàtil altament conservat que té una doble funció segons si actua amb NADP(H) o NAD(H): D'una banda exerceix interacció electrostàtica amb el fosfat extra del NADP(H) i d'altra banda interacciona per pont d'hidrogen amb l'oxigen 3' de la ribosa del NAD(H).

Cada un dels residus té una funció en l'ADH8 diferent de la que tenen en les ADHs dependents de NAD. Tal com s'esperava, la interacció iònica juga un paper predominant en la unió de NADP(H), mentre que els ponts d'hidrogen i les interaccions hidrofòbiques són prevalents en la unió del NAD(H).

Aquests resultats són consistents amb els resultats previs de que el NADP⁺ s'uneix a la ADH8 en una conformació similar a com ho fa el NAD⁺ en els complexos binaris, mostrant petites diferències només en la part adenosin del coenzim.

Els rangs d'especificitat per coenzim s'han obtingut de mutacions múltiples en diferents regions de l'estructura primària de deshidrogenases en general, en canvi en ADH8 s'ha aconseguit revertir completament l'especificitat per coenzim mutant només tres aminoàcids consecutius. La manca d'un residu acídic (Asp223) i la presència de residus polars al voltant del fosfat extra contribueixen a l'especificitat de l'ADH8 per NADP(H).

L'arquitectura de les ADHs sembla ser suficientment flexible per satisfer els canvis en els requeriments de coenzim i aquests enzims dependents de NADP han convergit evolutivament entre la superfamília de les MDRs en diferents moments usant similarmet diferents estratègies i patrons (processos) independents, p.e. ADH secundària en bacteris (Burdette i col., 1996; Korkhin i col., 1998; Kumar i col., 1992), cinamil alcohol deshidrogenasa de plantes i fongs (Lauvergeat i col., 1995), quinona oxidoreductasa en animals i bacteris (Edwards i col., 1996), sorbitol deshidrogenasa en insectes (Banfield i col., 2001) i ADH8 en amfibis (Rosell, Valencia i col., 2003). Tots ells enzims dependents de NADP.

Les dades nostres donen suport a la idea que l'evolució concertada dels aminoàcids adjacents (223-225) que vénen codificats per un segment de seqüència curta i requereixen només quatre punts de mutació en la seqüència gènica, ha permès intercanviar l'especificitat de coenzim a les ADHs d'amfibis. Això pot reflectir una enzimogènesi tardana de l'ADH8, amb un origen evolutiu relativament recent d'aquesta estructura dependent de NADP a partir de l'estructura ancestral dependent de NAD(H) (identitat del 70% amb la ADH de classe I). La resta d'ADHs dependents de NADP i la ADH8 haurien convergit amb la mateixa disposició de residus al lloc d'unió a cofactor. Hauria estat una adaptació funcional ràpida a diferents necessitats metabòliques, p.e., reducció d'aldehids com seria el retinal en comptes d'oxidar alcohols.

Sens dubte que la simplicitat d'aquests canvis evolutius hauran contribuït a facilitar el disseny del lloc d'unió a coenzim i a aconseguir la reversió completa de l'especificitat de cofactor.

CAPÍTOL 4

Apo and Holo structures of an NADP(H)-Dependent Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae.*

Enviat a J. Mol. Biol.

***Apo and Holo structures of an NADP(H)-Dependent Cinnamyl Alcohol
Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae****

**Eva Valencia¹, Carolina Larroy², Wendy F. Ochoa¹, Xavier Parés²,
Ignacio Fita¹, Josep A. Biosca^{2, *}**

¹ Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC). Jordi-Girona 18-26. 08034
Barcelona. Spain.

² Department of Biochemistry and Molecular Biology. Universitat Autònoma de
Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona). Spain.

*Corresponding author: Josep A. Biosca

Phone: 34-93-5813070

Fax: 34-93-5811264

e-mail: josep.biosca@uab.es

Running Title: Crystal Structure of *Saccharomyces cerevisiae* ScAdh6p

SUMMARY

The crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* ScAdh6p has been solved using the anomalous signal from the two zinc atoms found per subunit, and it constitutes the first structure determined from a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) family. ScAdh6p subunits exhibit the general fold of the medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR) but with distinct specific characteristics. In the three crystal structures solved (two trigonal and one monoclinic), ScAdh6p molecules appear to be structural heterodimers constituted by one subunit in the *apo* and the second subunit in the *holo* conformation. Between the two conformations the relative disposition of domains remains unchanged while two loops, Cys250-Asn260 and Ile277-Lys292, experience large movements. The *apo-apo* structure is disfavoured because of sterical impairment involving the loop Ile277-Lys292, while in the *holo-holo* conformation some of the hydrogen bonds between subunits would break apart. These suggest that the first NADP(H) molecule would bind much more tightly than the second to the dimer. Therefore, ScAdh6p appears to function according to a half-of-the-sites reactivity mechanism resulting from a pre-existing (prior to cofactor binding) asymmetry. Specificity of ScAdh6p towards NADP(H) is mainly due to the tripod-like interactions of the terminal phosphate with Ser210, Arg211 and Lys215. The size and the shape of the substrate binding pocket correlate well with the substrate specificity of ScAdh6p towards cinnamaldehyde and other aromatic compounds. Structural relationships of ScAdh6p with other MDR structures are also analysed.

INTRODUCTION

Enzymes with alcohol dehydrogenase activity are widespread among several superfamilies, in particular medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR)¹, from the oxidoreductases class. The MDR superfamily, with over one thousand entries in the protein sequence databases (see, for instance, entrance 00107 in Pfam Protein Families Database) (1), includes enzymes that participate in a large diversity of physiological functions such as alcoholic fermentation, detoxification of aldehydes and alcohols, biosynthesis of lignin, protection from oxidative damage or biosynthesis of fatty acids. MDR enzymes, detected in most of the genome projects, have a subunit size of about 350 residues and are grouped in eight protein families, four of them containing zinc (2-4):

i) dimeric alcohol dehydrogenases (ADH), ii) tetrameric alcohol dehydrogenases (YADH), iii) polyol dehydrogenases (PDH) and iv) cinnamyl alcohol dehydrogenases (CAD). Crystal structures of several members from the ADH, YADH and PDH families are known, but no structure from the CAD family has yet been reported.

CAD enzymes were originally detected in plants (5) (Figure 1), where they catalyze the last steps of the biosynthesis of monolignols, the lignin precursors (6). In fact, transgenic trees with reduced CAD activity are easier to delignificate, which confers these enzymes a major biotechnological potential (7). However, some recently reported members of the plant CAD family appear to have different enzymatic activities not related to lignin synthesis. Thus, ELI3 proteins involved in plant disease resistance, have activity with aromatic benzyl aldehydes (8), while another plant CAD enzyme (MTD from celery), shows NAD-dependent mannitol dehydrogenase activity (9) and is involved in salt tolerance and possibly also in the response to pathogen attacks. CAD enzymes are also found in bacteria and yeast with not yet clearly established functions.

Saccharomyces cerevisiae contains, in its genome, 12 MDRs with the zinc-binding signature: Sfa1p (that belongs to the ADH family), Adh1p, 2p, 3p and 5p (YADH family), Sor1p, Sor2p, Xyl2p, Bdh1p and Yal061p (PDH family) and, finally, Adh6p and Adh7p that share over 60 % sequence identity and have recently been characterized as belonging to the CAD family, by their primary structure and enzymatic activities (Figure 1) (10-11). ScAdh6p and ScAdh7p use NADP(H) as a cofactor and display a broad substrate specificity with aromatic and aliphatic (lineal and branched-chain) primary alcohols and aldehydes, and high activity with cinnamyl alcohol, cinnamyl aldehyde and their derivatives. Most likely, ScAdh6p is not involved in lignin biosynthesis, since this is a pathway not demonstrated in *S.cerevisiae*. Furthermore, the enzyme shows little activity with sinapylaldehyde and coniferylaldehyde (two lignin precursors) (10). However, ScAdh6p might contribute to lignin degradation as it can act on products derived from the biodegradation of lignin, such as veratraldehyde and anisaldehyde (10). In any case, ScAdh6p exhibits high sequence similarity with some plant CAD enzymes involved in lignification, i.e. 53 % with CAD2 from *Eucaliptus gunnii* (12).

The crystal structure of the NADP(H)-dependent CAD enzyme Adh6p from *S. cerevisiae* (ScAdh6p) has now been determined. This is the first three-dimensional structure for a CAD enzyme and also for a member of the MDR superfamily in *S.cerevisiae*. These results provide a structural framework to understand the functioning of ScAdh6p that can also be used as a reference for CAD proteins, in particular those related with lignification.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Protein purification and crystallization

ScAdh6p was obtained following a previously described protocol (13), but using a different yeast strain, named BL9. To eliminate a contaminating protein (saccharopine dehydrogenase, identified by MALDI-TOFF) that copurify with ScAdh6p, the BL9 strain was constructed disrupting the corresponding gene (*LYS9*) in the BJ2168 strain (14,15). The oligonucleotides 5' GCGGAGCTCCGTTTTGTTGCTAGGATCTGG 3' and 5' GCGAAGCTTCCTTTAGATAGATGCCG 3' were used to amplify *LYS9* by PCR. The resulting fragment was cloned into the *SacI* and *HindIII* sites of the PCR-Script vector (Stratagene), that was digested with *BamHI*, removing 230 bp from *LYS9*, and followed by the insertion of the *URA3* marker. Finally, the construct *lys9::URA3* was amplified by PCR with the above oligonucleotides and used to transform the BJ2168 yeast strain by the lithium acetate protocol (16), resulting in a disrupted *lys9* (checked by PCR) strain (BL9). In order to overexpress ScAdh6p, BL9 was transformed with the vector pAA318 (derived from the yeast expression vector pAAH5) (17), that contained the *ADH6* gene under the *ADHI* promoter. The BL9 [pAA318] strain was grown until the late exponential phase in selective medium containing glucose, resulting in 27 g of cells. ScAdh6p was purified by the sequential use of DEAE-Sepharose, Red-Sepharose and, finally, by gel-filtration HPLC to eliminate the NADP⁺ used to elute the enzyme from the affinity column (10).

Samples of ScAdh6p were used, as reported previously (13), in crystallization screenings with the hanging-drop vapor-diffusion method producing trigonal crystals (Table I). Best diffracting crystals were obtained in about two days at room temperature with 1 μ l of a 10 mg/ml protein solution and 1 μ l of the reservoir solution containing 1.6 M ammonium sulfate (AS) and 0.1 M Hepes pH 7.0 (Table I). A second crystal form, previously unreported, was also obtained with the hanging-drop vapor diffusion method

when a solution of 10.5 mg/ml protein was precipitated with 30 % PEG 4000 buffered by 0.1 M Tris-HCl pH 8.5. These new crystals were monoclinic, space group C2, and grew in about a week to maximum sizes of 0.2 x 0.3 x 0.5 mm³ (Table I). Attempts to prepare binary complexes with NADP⁺ or NADPH by either soaking or co-crystallization gave crystals, isomorphous to the trigonal ones, when ScAdh6p was incubated overnight with 3.5 mM NADP⁺ (Table I).

Data collection

Data collection for the ScAdh6p trigonal crystals (without NADP⁺ added), was performed at the zinc absorption K-edge peak wavelength, previously determined by an X-ray fluorescence analysis that confirmed the presence of the metal in the enzyme (13). Crystals, soaked in a 20 % (v/v) glycerol cryoprotectant solution, were flash cooled at the nitrogen boiling temperature. Diffraction data, collected using a MARCCD detector in the beam line BM14 at the ESRF (Grenoble, France), was processed with programs *DENZO* and *SCALEPACK* (18) (Table I). Data collection (ESRF beam line ID14EH4) and data processing for the monoclinic and for the trigonal (with NADP⁺ added) crystals were performed similarly, except for the wavelength used (Table I).

Structures determination and refinement

The first ScAdh6p structure was solved with the anomalous signal at the Zn²⁺ edge obtained from the trigonal crystals by single anomalous dispersion (SAD), with the program *SOLVE-v2.02* (19). Two anomalous scatterers with high occupancies were found in the crystal asymmetric unit, which corresponded to the two Zn²⁺ ions found per protein subunit (Table I). Phases, consistently better for space group P3₂21 than for its enantiomeric P3₁21, were notoriously improved by density modification (performed with

program *RESOLVE* (20)), in particular solvent flattening, likely due to the high volume solvent content of these crystals (78 %). The quality of the electron density map, at 3.1 Å resolution, allowed to follow with confidence most of the protein main chain path, 332 residues from a total of 360 possible (Figure 2). Only in the N and C terminal regions and in the vicinity of a crystal two-fold axis, which was coincident with the molecular two-fold axis, density was difficult to interpret. The model built into the experimental map, using the graphic program O (21), included residues Lys6-Ser252, Ile257-Ser276 and Ala293-Glu357. Using this incomplete model, the structures of the monoclinic and of the trigonal (with NADP⁺ added) crystals were solved by molecular replacement with program *AMoRe* (22). In the monoclinic crystals the asymmetric unit contained two ScAdh6p subunits with a volume solvent content of 68 % (Table I)

For the three crystal structures, refinement was carried out by following standard protocols and using iteratively the program CNS (23) with the bulk solvent correction and alternating with manual rebuilding using program O. Refinement of the isotropic individual B-factors was performed only in the final rounds. Due to the available resolution in the three crystal structures, of about 3 Å, no water molecules have been explicitly included (Table I). Coordinates and structure factors are deposited in the Protein Data Bank with accession codes 1QIN (trigonal crystal without NADP⁺), 1PS0 (trigonal crystal with NADP⁺) and 1PIW (monoclinic crystal).

RESULTS AND DISCUSSION

Overall ScAdh6p structure

As indicated in the Experimental Procedures section, the structures of three ScAdh6p crystals, two trigonal and one monoclinic, have been determined and refined at about 3.0 Å resolution (Table I). The molecular structure corresponding to the trigonal crystals without NADP⁺ added, comprises all the amino acid residues of one ScAdh6p subunit, Met1-Asp360, two zinc ions and two phosphate (or sulfate) groups (Figure 2a and 3a). In this trigonal structure the loops Cys250-Asn260 and Ile277-Lys292 presented alternative conformations, each with about 50 % occupancy. In the trigonal crystals, obtained by co-crystallization with NADP⁺, the ScAdh6p structure is very similar, including the alternative conformations in the two loops, with a root mean square deviation (r.m.s.d.) for all the C α atoms of 0.32 Å. However, in these crystals an NADP⁺ molecule, with about 50 % occupancy, was found instead of the phosphates (Figure 3b). The model corresponding to the monoclinic crystal comprises all the amino acid residues and the two zinc atoms from each of the two subunits found in the asymmetric unit (Table I). In these monoclinic crystals the cofactor binding site of one subunit was empty while the site in the second subunit contained a strong density that was suited for an NADP⁺ molecule except because it lacked the region corresponding to the nicotinamide moiety (Figure 3c). Similarly, a phospho-ADP-ribose has been found in the active site of the crystal structure of spinach acetoxyacid isomeroreductase (24), suggesting the hydrolysis of the nicotinamide group of NADP⁺ during the purification and/or crystallization procedures.

The C α superimposition of the two crystallographically independent subunits found in the monoclinic crystals, with a r.m.s.d. of 1.19 Å, indicated only significant

differences for loops Cys250-Asn260 and Ile277-Lys292 with displacements as large as 6.0 and 6.9 Å for residues 255 and 280, respectively (Figure 2b). The r.m.s.d. decreases to 0.36 Å when the two loops are excluded from the superimposition, which also reflects that the relative disposition of domains remains unchanged between both subunits. In the subunit containing phospho-ADP-ribose the two loops close the binding site interacting with the adenine, the pyrophosphate and the two riboses (Figure 2a). Therefore, due to the loops and to the cofactor site occupancy differences, the ScAdh6p molecule in the monoclinic crystal can be considered a structural heterodimer in which subunits have adopted the *apo* (A) and *holo* (H) conformations, respectively (Figure 4a). Furthermore, the disposition of loops in the A and H conformations coincide with the alternative conformations, seen in the trigonal crystals, for the same two loops. Therefore, the structure in the trigonal crystal must consist of a mixture, in about equal amounts, of subunits with the A and H conformations. For an ScAdh6p molecule having the two subunits in the A conformation appears sterically unfeasible, because loop Ile277-Lys292 would clash with the same loop in the second subunit (Figure 4b). Consequently, also in the trigonal crystals, ScAdh6p molecules should be mainly present as structural heterodimers of subunits in the A and H conformations. In the trigonal crystals with NADP⁺ added, the subunit in the H conformation would be the one containing the NADP⁺ cofactor. In the trigonal crystals without NADP⁺ added, the subunit in the H conformation could be stabilized by the presence of the phosphate groups. If in a ScAdh6p molecule both subunits were to adopt the H conformation some of the hydrogen bonds between subunits, seen in the heterodimer, would break apart (Figure 4c). Therefore, structural heterodimers with one subunit in the A and one subunit in the H conformation appears to be the most stable situation for ScAdh6p molecules. This molecular asymmetry favors cofactor binding to only one of the subunits in the dimer, which suggests a half-of-the-

sites reactivity mechanism, a term coined to describe multimeric enzymes that react only at half of their active sites (25). Loops Cys250-Asn260 and Ile277-Lys292 are involved in crystal packing interactions in the monoclinic crystals, but not in the trigonal crystals (Figure 5). This, together with the absence of domain displacements between the A and H conformations, allows the coincidence of the crystallographic two fold axis with the approximate binary axis of the heterodimer and explains the disorder found in the trigonal crystals.

Despite the low sequence identity (<22 %) with all protein structures available, ScAdh6p subunits present a topology similar to other MDRs (Figure 6) with a catalytic domain (residues Met1-Cys163 and Leu301-Asp360) and a coenzyme binding domain (residues Gly164-Ala300) separated by a deep cleft (Figures 2a). Superimposition of the ScAdh6p subunit in the *holo* conformation with the corresponding structures of horse liver alcohol dehydrogenase (PDB code 2OHX) and *Clostridium beijerinckii* secondary alcohol dehydrogenase (PDB code 1KEV), gave in both cases r.m.s.d. values of about 2.8 Å for 330 equivalent residues (26). The superimposition of the *apo* conformations of ScAdh6p and ketose reductase from *Baemissia argentifolii* (PDB code 1E3J), gave an r.m.s.d. value of 2.5 Å. However, contrary to what has been found for ScAdh6p, coenzyme binding induces significant interdomain movements in many MDR structures (27-29), though this is not always the case (30). Sequence alignments (Figure 6) show an insertion of six residues (from Pro124 to Tyr129 in ScAdh6p), which might confer rigidity to ScAdh6p.

Cofactor binding and specificity

An NADP⁺ and a phospho-ADP-ribose molecules were found, as indicated before, bound to ScAdh6p in the trigonal and monoclinic crystals, respectively. Both molecules

show extended conformations, with the two riboses likely having C2'-endo sugar ring puckerings, as commonly found in *holo*-MDR structures (31,32). Cofactor binding is defined by an extensive array of polar and hydrophobic interactions with also the participation of residues from the two mobile loops Cys250-Asn260 and Ile277-Lys292 (Figure 7). Loop Cys250-Asn260 interacts exclusively with the phospho-ADP-ribose moiety while loop Ile277-Lys292 interacts mostly with the second subunit and with the nicotinamide that, similarly to other MDRs, is close to the catalytic zinc ion and with the sulfur atom of the conserved residue Cys163 (29). The direct interaction of the mobile loops with the cofactor, in combination with the half-of-the-sites cofactor occupancy, might facilitate the dissociation of products, a frequently rate-limiting step in NAD(P)-dependent enzymes (25).

NAD(H)-dependent MDRs have a conserved negatively-charged residue at the C-terminal end of the β B strand (33), which forms hydrogen bonds with the 2'- and 3'-hydroxyl groups of the adenosine ribose from the coenzyme. In contrast, NADP(H)-dependent enzymes have a small and neutral residue at this position (34), such as glycine in amphibian ADH8 (35) or Ser210 in ScAdh6p, since an aspartic or a glutamic would sterically and electrostatically interfere with the NADP(H) terminal phosphate (36). In ScAdh6p the hydroxyl group of Ser210 hydrogen-bonds two oxygens from the terminal phosphate, which also binds to the guanidinium group of Arg211 and to the ϵ -amino group of Lys215 (Figures 3 and 7). These tripod-like interactions leave only one of the phosphate oxygen atoms exposed towards the solvent and without interaction with the protein. It had already been suggested that the presence of one or two basic residues is important for NADP(H) specificity (37) and this is also the situation in ScAdh6p with Arg211 and Lys215, remarkably a residue conserved in all NAD(H)-dependent ADHs. In NADP(H)-dependent ADHs from bacteria (38-40), NADP(H) binding involves a

contiguous Ser and Arg residues and a Tyr that makes a hydrogen bond to the ribose phosphate (39). In turn, in ADH8 the preference for NADP(H) is achieved by the disposition and the interactions of residues Gly223, Thr224, and His225 (35). Therefore the binding strategy of the terminal phosphate by ScAdh6p is different, though the sequence changes required are very few, in particular due to the recruitment of the conserved Lys215 for a new role in NADP(H) binding. These results agree well with the modeling and biochemical studies on CAD2 from *Eucalyptus gunnii*, where it was concluded that Ser212 and Arg217 (equivalent to Ser210 and Lys215 in ScAdh6p) had to participate in the binding of the terminal phosphate group of NADP(H) (41-42).

Sequence comparisons between the CAD enzymes from Figure 1, show that, in all cases, binding of the cofactor terminal phosphate would likely follow the same pattern as in ScAdh6p. A conspicuous exception is MTD from *Apium graveolens*, with NAD-dependent mannitol dehydrogenase activity and where an aspartic occupies the position equivalent to Ser210 in ScAdh6p.

The catalytic site

The active site of ScAdh6p is situated in the cleft between the catalytic and coenzyme-binding domains, centered around the catalytic zinc ion. The catalytic zinc ion displays a tetrahedral coordination with residues Cys46, His68, Cys163 and a solvent molecule in the *apo* and *holo* forms (visible in both the trigonal and the monoclinic structures) (Figure 8). This catalytic zinc ion binding mode is structurally equivalent to the one shown by the *apo* and *holo* forms of HLADH (29).

In order to generate a model for the ternary complex, cinnamaldehyde has been “docked” to the active site of ScAdh6p-NADP⁺ in such a way that the carbonyl oxygen would coordinate to the Zn atom, and locating the C1 close to the nucleotide cofactor

(Figure 8). The figure shows the ScAdh6p residues in close contact to cinnamaldehyde, corresponding to the inner, middle and outer parts of the substrate binding site. While some of these residues are structurally analogous to the ones found in the active center of HLADH (specially those located in the inner part), some others do not have correspondence, since some positions of the substrate binding site in HLADH belong to the loop 116-138 not present in ScAdh6p. In fact, the funnel shaped active site of ScAdh6p is larger than the active site of HLADH, mainly because part of the loop 116-138 from HLADH restrains the entrance to the active site. The large size of the active site of ScAdh6p is in agreement with the broad substrate specificity shown by the enzyme and its activity with bulky aromatic compounds (10). Thus, both active sites are lined mostly with hydrophobic side chains, being the polar groups brought about by the residues that coordinate the catalytic Zn, the nicotinamide moiety of the coenzyme and the side chain of Ser48. In general, the residues involved in the binding of the catalytic and structural Zn, and those of the substrate binding pocket predicted by McKie et al. (41) in their modeling study with CAD2 from *Eucalyptus gunnii*, correspond well to the residues here found in the ScAdh6p structure, suggesting that the pattern is common in the CAD enzymes.

Conclusions

The ScAdh6p crystal structures are the first determined from the CAD family, which completes the availability of structural information for at least one representant from each of the four families of the zinc-binding MDR enzymes. ScAdh6p exhibits the well characterized structural features of zinc-containing dimeric MDRs, but with important peculiarities. Thus, the size and shape of the active site appear adapted to the bulky and hydrophobic substrates of CADs. The specificity towards NADP(H) is achieved mainly by tripod-like interactions of the cofactor terminal phosphate with side

chains from Ser210, Arg211 and Lys215. The interconversion between the *apo* and *holo* conformations does not require changes in the relative disposition of domains, while two loops, Cys250-Asn260 and Ile277-Lys292, experience large movements. However, the most striking observation is that ScAdh6p molecules appear to be present mostly as structural heterodimers constituted by one subunit in the *apo* and the second subunit in the *holo* conformation, respectively. While homodimers with the *apo-apo* conformations would be sterically unfeasible, the *holo-holo* homodimers might result energetically unfavorable due to the absence of some of the intersubunit hydrogen bonds present in the heterodimer. These results suggest that the first NADP(H) molecule would bind much more tightly than the second to the ScAdh6p dimer. Therefore, ScAdh6p might function according to a half-of-the-sites reactivity mechanism resulting from a pre-existing (prior to cofactor binding) asymmetry of the enzyme. This type of mechanism might contribute to the catalytic efficiency by facilitating the dissociation of products and, in particular, of the transformed cofactor, a frequently rate-limiting step in NADP(H)-dependent enzymes. Pre-steady state kinetics studies should help to analyze the viability of these hypotheses.

FOOTNOTES

¹ The abbreviations used are: MDR, medium chain dehydrogenases/reductases; ADH, dimeric alcohol dehydrogenases; YADH, tetrameric alcohol dehydrogenases; PDH, polyol dehydrogenases; CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenases; ELI3, elicitor-inducible defense-related proteins; MTD, mannitol dehydrogenase; r.m.s.d., root mean square deviation

Acknowledgements

This work was supported by grants BMC2000-0132 to J.B., BMC2002-02659 to X.P. and BIO2002-04419 to I.F.

REFERENCES

- 1) Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Ewinger L, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Howe KL, Marshall M, Sonnhammer EL (2002)
Nucleic Acids Res. **30**, 276-80.
- 2) Nordling E, Jornvall H, Persson B. (2002)
Eur J Biochem. **269**, 4267-76.
- 3) Jornvall H, Shafiqat J, Persson B. (2001)
Chem Biol Interact. **130-132**, 491-498.
- 4) Riveros-Rosas H, Julian-Sanchez A, Villalobos-Molina R, Pardo JP, Pina E. (2003)
Eur J Biochem. **270**, 3309-3334.
- 5) Luderitz T, Grisebach H. (1981)
Eur J Biochem. **119**, 115-124.
- 6) Boerjan W, Ralph J, Baucher M. (2003)
Annu Rev Plant Biol. **54**, 519-546.
- 7) Pilate G, Guiney E, Holt K, Petit-Conil M, Lapierre C, Leple JC, Pollet B, Mila I, Webster EA, Marstorp HG, Hopkins DW, Jouanin L, Boerjan W, Schuch W, Cornu D, Halpin C. (2002)
Nat Biotechnol. **20**, 607-612.
- 8) Somssich IE, Wernert P, Kiedrowski S, Hahlbrock K. (1996)
Proc Natl Acad Sci U S A. **93**, 14199-14203.
- 9) Williamson JD, Stoop JM, Massel MO, Conkling MA, Pharr DM. (1995)
Proc Natl Acad Sci U S A. **92**, 7148-7152.
- 10) Larroy C, Fernandez MR, Gonzalez E, Pares X, Biosca JA. (2002)
Biochem J. **361**, 163-172.
- 11) Larroy C, Pares X, Biosca JA. (2002)

- Eur J Biochem.* **269**, 5738-5745.
- 12) Grima-Pettenati J, Feuillet C, Goffner D, Borderies G, Boudet AM. (1993)
Plant Mol Biol. **21**, 1085-1095.
- 13) Valencia, E., Rosell, A., Larroy, C., Farrés, J., Biosca, J.A., Fita, I., Parés, X. & Fernández-Ochoa, W. (2002).
Acta Crystallog. sect. D Biol Crystallogr. **59**, 334-337.
- 14) Jones, E.W. (1991)
Methods Enzymol. **195**, 428-453.
- 15) Rothstein, R.J. (1983)
Methods Enzymol. **101**, 202-211.
- 16) Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. (1983)
J Bacteriol. **153**, 163-168.
- 17) Ammerer, G. (1983)
Methods Enzymol. **101**, 192-201.
- 18) Otwinowski, Z. (1993). Oscillation data reduction program. In *Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing* (Sawyer, L., Isaacs, N. & Bailey, S., eds), pp. 56-62, England, SERC Daresbury Laboratory.
- 19) Terwilliger, T.C. and J. Berendzen. (1999)
Acta Cryst. D55, 849-861.
- 20) Terwilliger, T. C. (2000)
Acta Cryst. D56, 965-972.
- 21) Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S. & Kjeldgaard, M. (1991).
Acta Crystallog. sect. A, **47**, 110-119
- 22) Navaza, J. (1994).
Acta Cryst. Sect. A **50**, 157-163

- 23) Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL. (1998)
Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. **54**, 905-921.
- 24) Thomazeau K, Dumas R, Halgand F, Forest E, Douce R, Biou V. (2000)
Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. **56**, 389-397.
- 25) Fersht, A. (1999) *Structure and mechanism in protein science*, 3rd Ed., Freeman and Co, NY.
- 26) Holm L, Sander C. (1996)
Methods Enzymol. **266**, 653-662
- 27) Eklund, H., Samama, J.P., Wallén, L., Brändén, C.I., Åkeson, Å. & Jones, T.A. (1981).
J. Mol. Biol. **146**, 561-587.
- 28) Colonna-Cesari, F., Perahia, D., Karplus, M., Eklund, H., Brändén, C.I. & Tapia, O. (1986).
J. Biol. Chem. **261**, 15273-15280.
- 29) Eklund, H. & Brändén, C.I. (1987). Alcohol dehydrogenase. In: *Biological Macromolecules and Assemblies* (Jurnak, F.A. & McPherson, A., eds.), pp. 73-142, John Wiley & Sons Inc., London.
- 30) Sanghani, P.C., Robinson, H., Bosron, W.F. & Hurley, T.D. (2002).
Biochemistry **41**, 10778-10786.
- 31) Hurley TD, Bosron WF, Hamilton JA, Amzel LM.(1991)
Proc Natl Acad Sci U S A. **88**, 8149-8153.
- 32) Xie P, Parsons SH, Speckhard DC, Bosron WF, Hurley TD. (1997)
J Biol Chem. **272**, 18558-18563.

- 33) Bellamacina, C.R. (1996)
FASEB J. **10**, 1257-1269.
- 34) Wierenga, R.K., Terpstra, P. & Hol, W.G.J. (1986)
J. Mol. Biol., **187**, 101-107.
- 35) Rosell A, Valencia E, Pares X, Fita I, Farres J, Ochoa WF. (2003)
J Mol Biol. **330**, 75-85.
- 36) Fan, F., Lorenzen, J.A. & Plapp, B.V. (1991).
Biochemistry, **30**, 6397-6401.
- 37) Carugo, O. & Argos, P. (1997).
Proteins, **28**, 10-28.
- 38) Burdette, D.S, Vieille, C. & Zeikus, J.G. (1996).
Biochem. J. **316**, 115-122.
- 39) Korkhin Y, Kalb(Gilboa) AJ, Peretz M, Bogin O, Burstein Y, Frolov F. (1998)
J Mol Biol. **278**, 967-981.
- 40) .Kumar, A., Shen, P.S., Descoteaux, S., Pohl, J., Bailey, G. & Samuelson, J. (1992).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 10188-10192.
- 41) McKie JH, Jaouhari R, Douglas KT, Goffner D, Feuillet C, Grima-Pettenati J,
Boudet AM, Baltas M, Gorrichon L. (1993)
Biochim Biophys Acta **1202**, 61-69.
- 42) Lauvergeat V, Kennedy K, Feuillet C, McKie JH, Gorrichon L, Baltas M, Boudet
AM, Grima-Pettenati J, Douglas KT (1995)
Biochemistry **34**, 12426-12434.
- 43) Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibbson, J.J. (1994)
Nucleic Acids Res. **22**, 4673-4680.

44) Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. (2001)

Bioinformatics **17**, 1244-1245.

45) Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I. and Metoz, F. (1999)

Bioinformatics **15**, 305-308 .

46) Eklund, H., Nordström, B., Zeppezauer, E., Söderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T.,

Söderberg, B.O., Tapia, O., Brändén, C.I. & Åkeson, Å. (1976)

J. Mol. Biol. **102**, 27-59.

47) Wallace, A.C., Laskowski, R.A. & Thornton, J.M. (1995).

Protein Eng. **8**, 127-134.

Table I. Data and model refinement statistics.

(A) Data collection statistics

	TRIGONAL		MONOCLINIC
	SAD ScAdh6p	ScAdh6p/NADP ⁺	ScAdh6p
Space group	P3 ₂ 21	P3 ₂ 21	C2
Cell parameters (Å / °)	a=b=101.9, c=149.15 γ=120.0	a=b=102.1, c=149.72 γ=120.0	a=234.9, b=100.3, c=52.4 β=92.2
Resolution range (Å) ^(a)	22.0-3.1	29.0-3.0	29.0-3.0
Unique reflections	15485	18395	24484
R_{sym} (%) ^(b)	12.2 (25.0)	15.1 (30.0)	5.0 (20.0)
Completeness (%)	96.7 (96.0)	99.5 (99.9)	98.8 (93.4)
<I/σ(I)>	11.5 (1.0)	12.5 (1.0)	8.0 (1.0)

(B) Data refinement statistics

R_{work} (%) ^(c)	26.2	26.5	22.7
R_{free} (%) ^(d)	31.9	29.6	27.9
Solvent content (%)	78	78	68
Asymmetric unit content			
Protein subunits	1	1	2
Protein residues	360	360	2x360
Zn²⁺	2	2	2x2
NADP⁺	(?) ^(e)	0.5 ^(f)	--
Phospho-ADP-ribose	--	--	1
PO4⁻	2x0.5 ^(e)	--	--
Geometry deviation:			
r.m.s.d. bonds (Å)	0.008	0.008	0.008
r.m.s.d. angles (°)	1.5	1.4	1.4

(a) Values in parentheses correspond to data in the highest resolution shell.

- (b) $R_{\text{sym}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_{\text{hkl}, i} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle| / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_{\text{hkl}, i}$, where $I_{\text{hkl}, i}$ is the observed intensity and $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ is the average intensity of multiple observations of symmetry-related reflections.
- (c) $R_{\text{work}} = \sum_{\text{hkl}} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$, where F_{obs} and F_{calc} are the observed and calculated structure factors, respectively.
- (d) R_{free} same definition as R_{work} for a cross-validation set of 5% of the reflections.
- (e) A low occupancy of the nucleotide seems still present in these crystals (Figure 3).
- (f) The partial occupancy is likely reflecting the presence of structural heterodimers with an even presence of subunits in the *apo* and *holo* conformations (see in the text).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Phylogenetic tree of CADs.

The 74 sequences more similar to ScAdh6p (as detected by BLASTP with E-values below 10^{-39}) were aligned by using the ClustalW program (43). These sequences contained the sequence pattern for CADs derived by Nordling et al. (2), except 12 bacterial proteins that substitute the first Cys of the pattern by an Ala/Ser residue. Phylogenetic analysis was carried out by the neighbor-joining method using the program MEGA2 (44), with 10,000 bootstrap samplings. Plant enzymes are distributed in two clusters: one containing enzymes involved in lignin synthesis (Plant I, in the Figure), such as CAD2 from *Eucalyptus gunnii* (12), and the second ELI3 proteins and enzymes annotated either as cinnamyl alcohol dehydrogenases, or as mannitol dehydrogenases (such as MTD from *Apium graveolens* (9)) (Plant II, in the Figure). ScAdh6p is in one cluster with 4 more yeast enzymes (Yeast, in the Figure). All remaining proteins of the tree are from bacteria, except Q9U1F0, from *Leishmania major*, and Q8TTM5, from the Archaea *Methanosarcina acetivorans* (Bacteria*, in the Figure). The sequences are named by their accession numbers or by their Swissprot or TrEMBL abbreviations.

Figure 2. Apo and holo conformations of ScAdh6p

(a) Superimposition of the ScAdh6p subunits in the *apo* (blue) and the *holo* (brown) conformations. Zinc ions are represented as green spheres and the NADP⁺ cofactor found in the *holo* monomer is also displayed. Secondary structural elements are explicitly indicated only for the two mobile loops Cys250-Asn260 and Ile277-Lys292. (b) R.m.s.d. between main chain C α atoms of the ScAdh6p subunits in the *apo* and *holo* conformations. The absence of significant domain movements between both conformations and the large displacement of the mobile loops are evident in (a) and (b).

Figure 3. Electron density for the ScAdh6p cofactor binding site.

The ScAdh6p cofactor binding site as found: (a) in the trigonal crystals *without* NADP⁺ added, (b) in the trigonal crystals *with* NADP⁺ added and (c) in the subunit having the *holo* conformation from the monoclinic crystals. In the three cases a complete NADP⁺ cofactor is displayed with ball and sticks coloured according to the atom type. Non-protein density is displayed using a chicken box representation. Coordination of the catalytic zinc ion, depicted as a blue sphere, is indicated with dashed lines. The presence of phosphate (or sulfate) groups together with a low occupancy of the whole cofactor can be assumed in (a). Density corresponds well with an NADP⁺ molecule having about 50% occupancy in the trigonal crystals with NADP⁺ added (b). Density in an omit map (green) is absent for the NADP(H) moiety corresponding to the nicotinamide and density in this region becomes negative (red) in an Fo-Fc map when the nicotinamide is included in the model (c). Therefore, a phospho-ADP-ribose, likely derived from an NADP⁺ molecule by hydrolysis of the nicotinamide group, appears to occupy the cofactor binding site of the *holo* subunit in the monoclinic crystals (see in the text). In the three crystal structures density is found in the location corresponding to the terminal phosphate when the NADP⁺ is bound. Instead, no density is found in the corresponding location in the *apo* subunit of the monoclinic crystal (not shown). Residues Ser210, Arg211 and Lys215, which interact with the terminal phosphate, are labelled

Figure 4. ScAdh6p dimers view down the molecular two fold axis

Subunits having the *apo* conformation are coloured blue and the ones in the *holo* conformation brown with the NADP⁺ cofactor explicitly shown. **(a)** Experimentally determined structural heterodimer. Departure from the strict molecular symmetry seems

required to allow the antiparallel pairing of strand His281-Tyr289 between the two subunits in the dimer (inset). In turn, *apo-apo* homodimers (**b**) would present steric problems, while *holo-holo* homodimers (**c**) seem to break apart the four hydrogen bonds found in the heterodimer between strands His281-Tyr289.

Figure 5. Crystal packing in the trigonal and monoclinic crystals

(a) In the trigonal crystals, with a volume solvent content of 78%, molecules do not contact in the vicinity of the molecular two fold axis, which, together with the absence of interdomain movements, explains the random disposition of the heterodimers and, consequently, the disorder found in these crystals. (b and c) In the monoclinic crystals, with a volume solvent content of 68%, molecules are closely packed only when viewed down the **b** axis. This close packing involves contacts of the mobile loops, in particular of loop Cys250-Asn260, which allows to discriminate a unique orientation of the heterodimer, as found in the monoclinic crystals.

Figure 6. Structure-based alignment of MDR sequences.

The alignment was obtained from the DALI server (26) and refined manually. The main secondary structural elements for each sequence were displayed by using the ESPRIPT program (45). The structural elements are from the *holo* form of ScAdh6p (PDB code 1PIW), *apo* form from *Baemissia argentifolii* ketose reductase (BaKR, PDB code 1E3J), *holo* form from *Clostridium beijerinckii* ADH (CbADH, PDB code 1KEV) and *holo* form from horse liver ADH (HLADH, PDB code 2OHX). Residues highlighted in red are conserved among all the sequences, while residues highlighted in green are conserved in at least three of the sequences. Triangles indicate the residues involved in the subunit interactions between the *apo* and *holo* subunits of the dimer (in red those

interactions that would be lost upon the hypothetical NADP⁺-binding to both subunits). Circles indicate the residues involved in the binding of NADP⁺ by hydrogen bonding and hydrophobic contacts (further described in Figure 7). The secondary structural elements of the nucleotide-binding domain are labeled after Eklund et al. (46) for HLADH. η denotes $\alpha_{3,10}$ helices.

Figure 7. Schematic diagram of interactions between ScAdh6p and NADP⁺.

LIGPLOT (47) describing the interactions of the bound NADP⁺ molecule. Only side chains of residues Ser210, Arg211 and Lys215 interact with the terminal phosphate group of the NADP⁺ cofactor. Residues Ser210 and Arg211 are sequence variations specific of ScAdh6p while residue Lys215 is conserved among NAD(H)-dependent ADHs. The nitrogen atom of the carboxamide group of the nicotinamide is hydrogen bonded to the carbonyl oxygen atoms of Ile275 and Ser299, while the oxygen atom is hydrogen bonded to the main chain nitrogen of Leu301. The pyrophosphate oxygen atoms of the coenzyme establish hydrogen bonds to main chain nitrogen atoms of Gly47, Gly190 and Ile191 and to the side chain of Ser252. The O-2' and 3' of the nicotinamide-ribose are forming hydrogen bonds with the main chain carbonyl atoms of Ile277 and Ser252.

Figure 8. Docking of a substrate in the catalytic centre of ScAdh6p.

View of the ScAdh6p active centre in the *holo* conformation, with the NADP⁺ cofactor explicitly shown, and a cinnamaldehyde molecule modelled inside the substrate-binding pocket. The molecular accessible surface is displayed as a transparent surface and residues conforming the active centre and the substrate binding site are labelled. Coordination of the catalytic zinc ion, with residues Cys46, His68 and Cys163, is indicated with dashed lines. The nature and disposition of residues that conform the,

mostly hydrophobic, funnel shaped substrate-binding site in ScAdh6p appear well suited for large, cinnamaldehyde like, substrates.

Figure 1

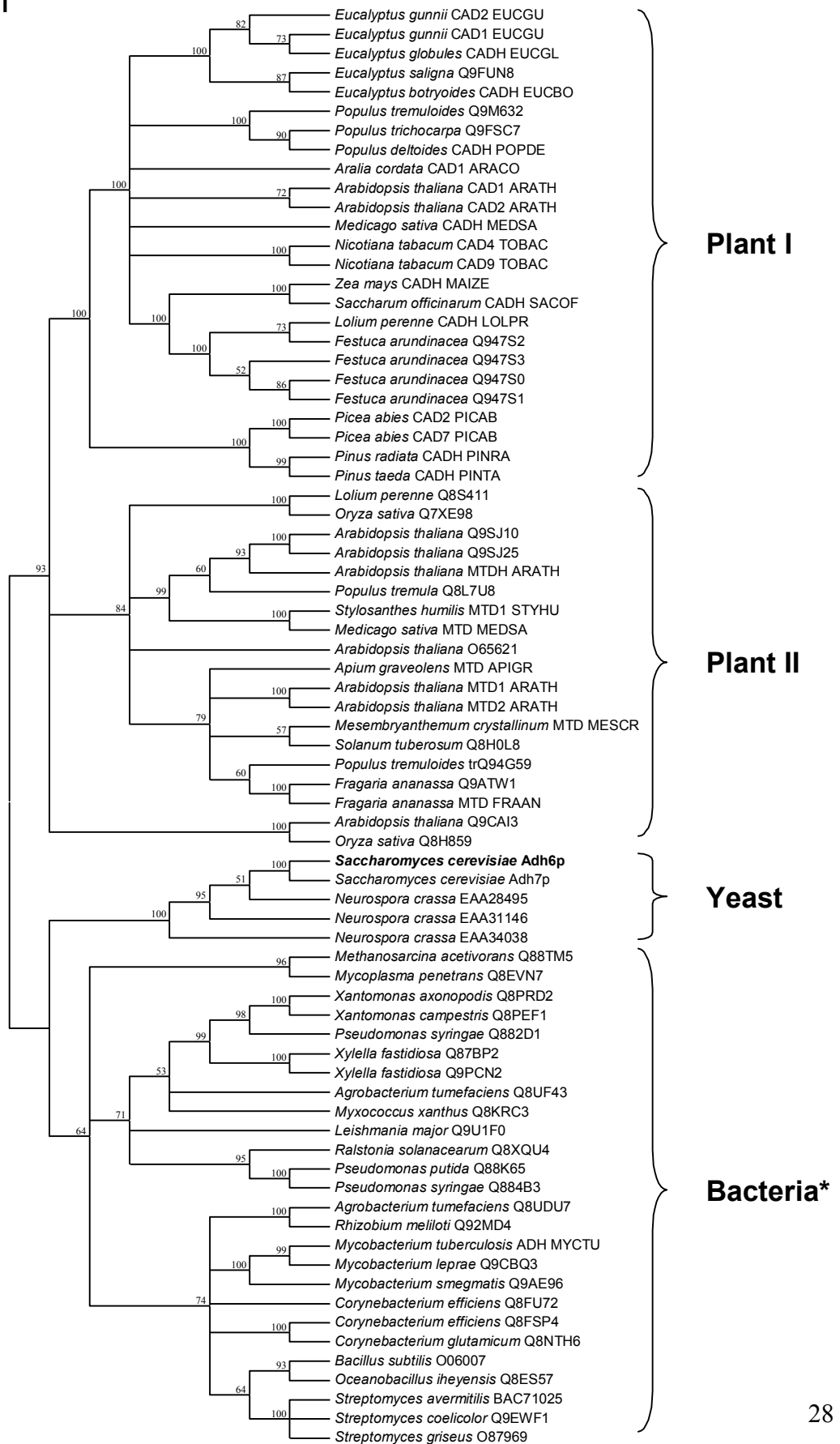
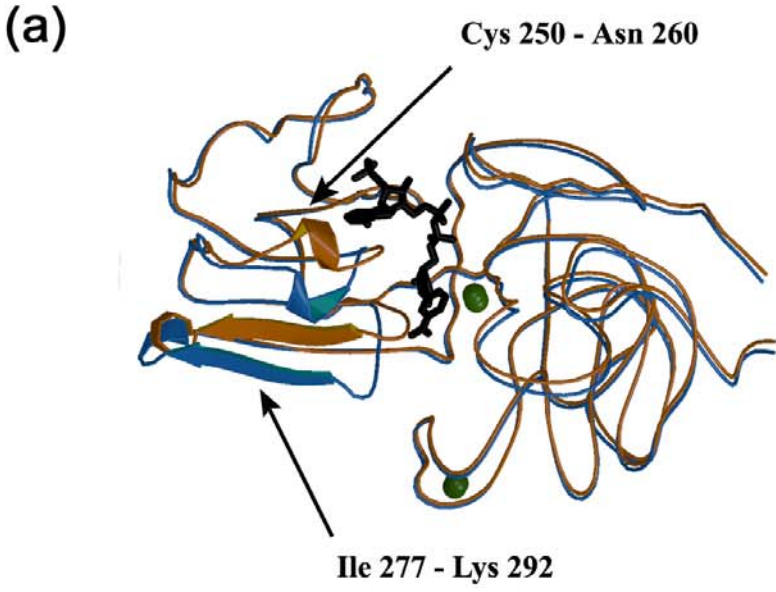


Figure 2



(b)

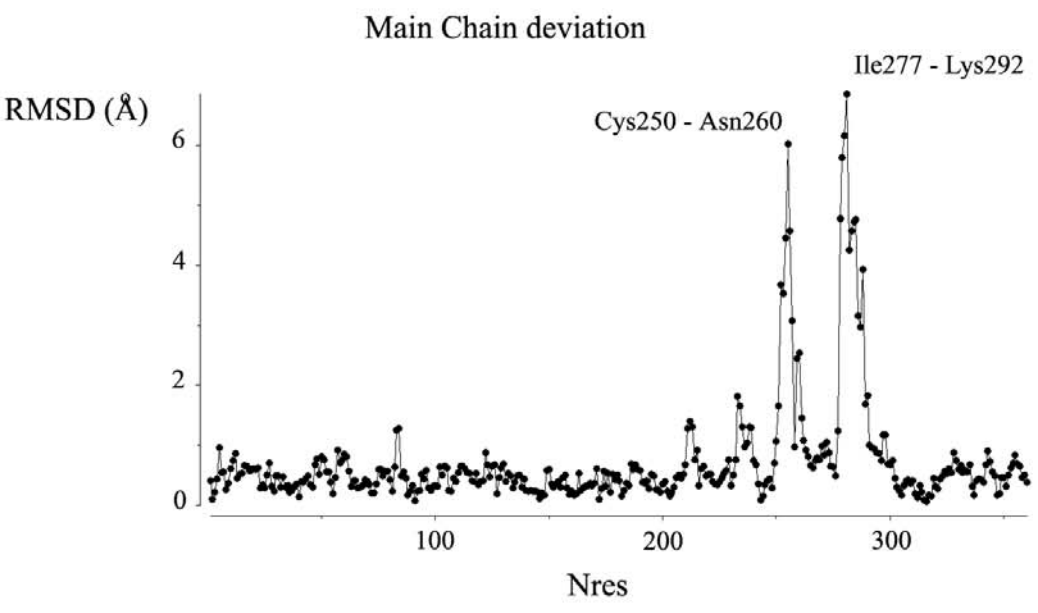
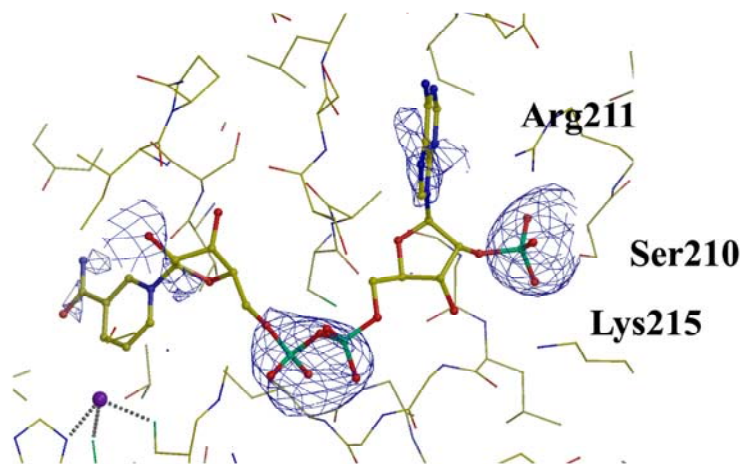


Figure 3

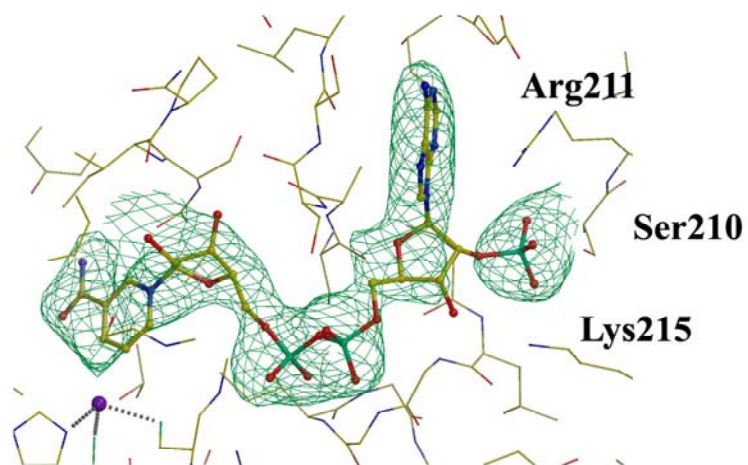
A

(a)



B

(b)



C

(c)

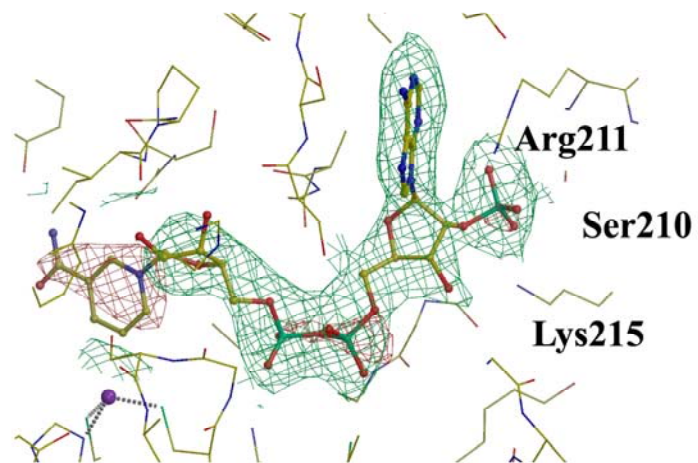


Figure 4

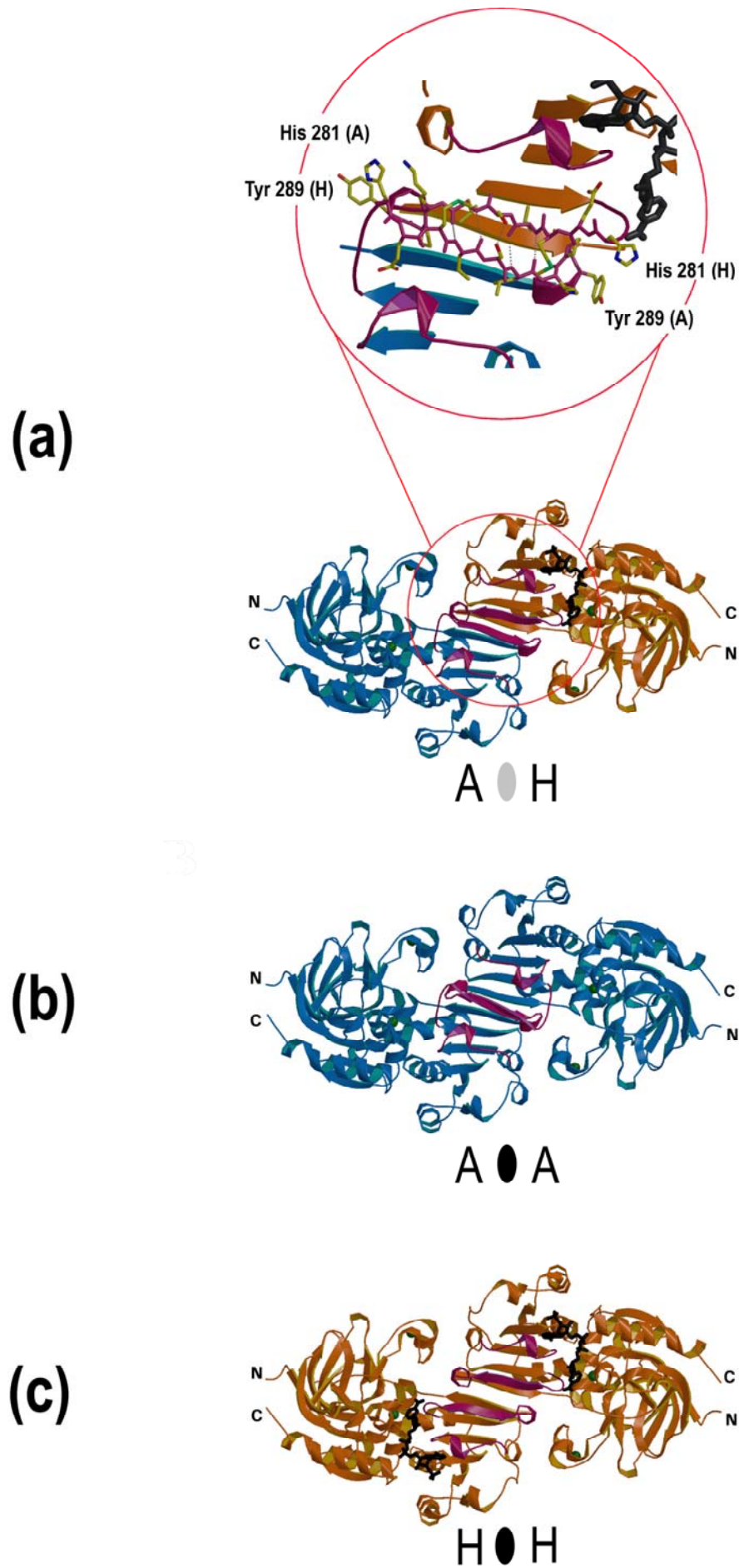


Figure 5

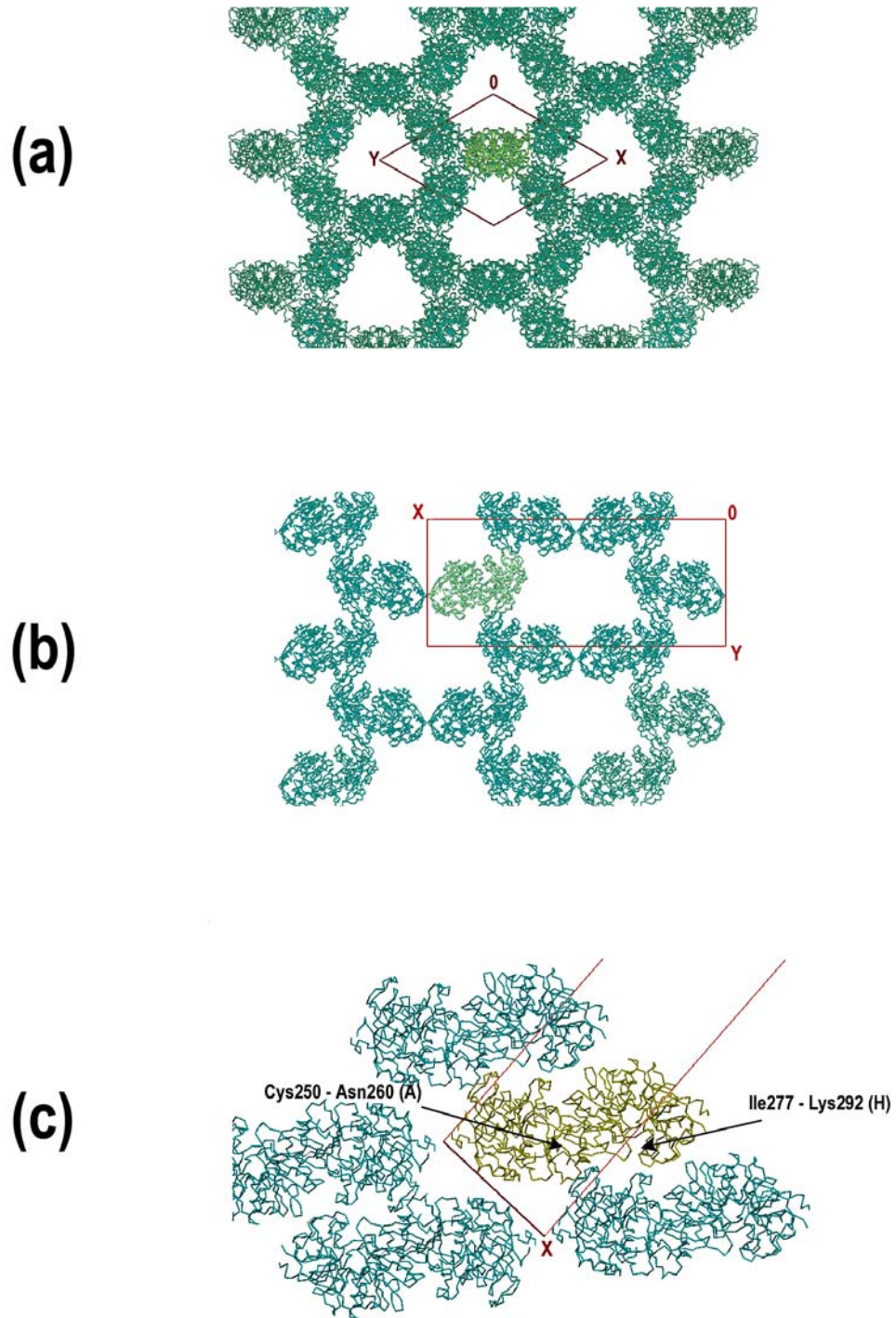
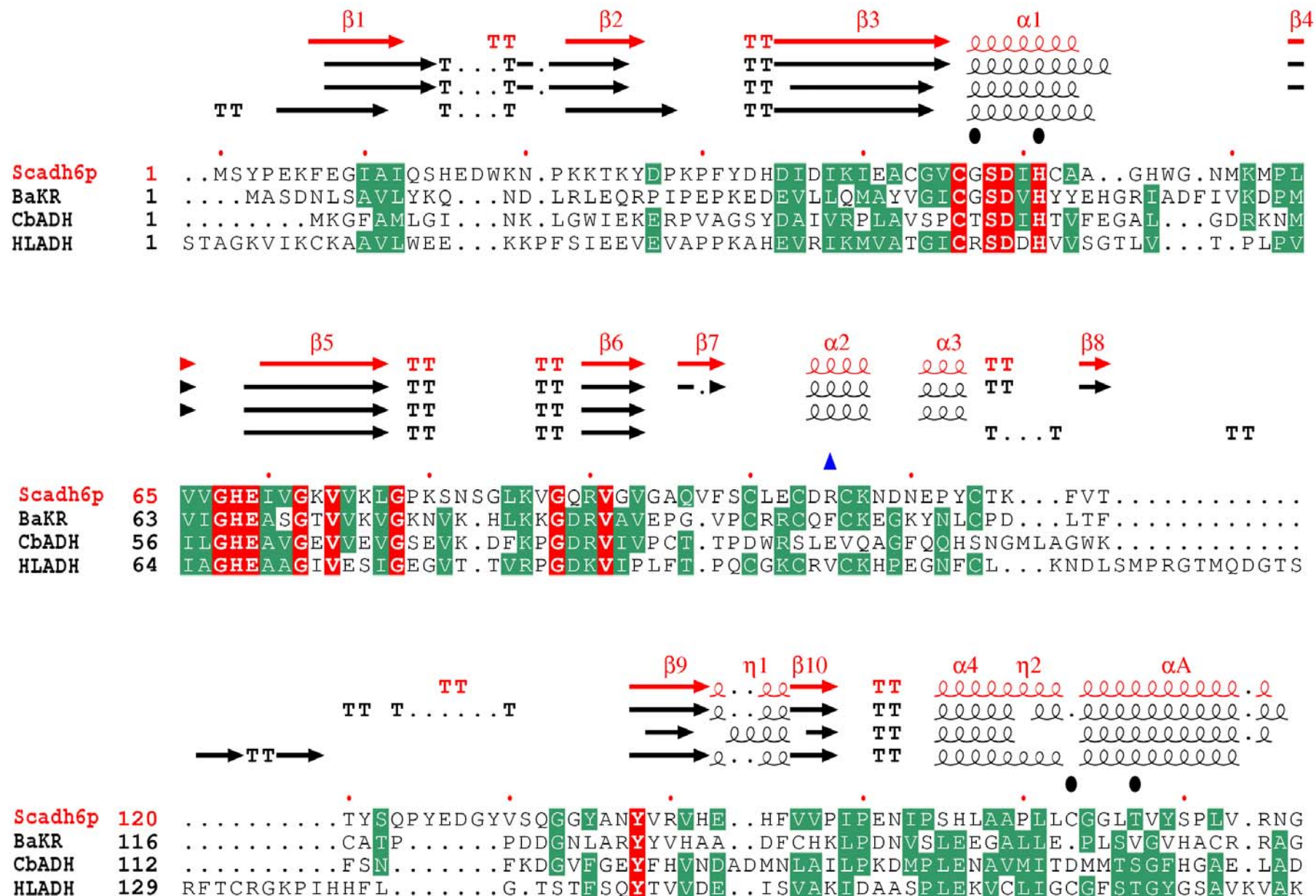


Figure 6



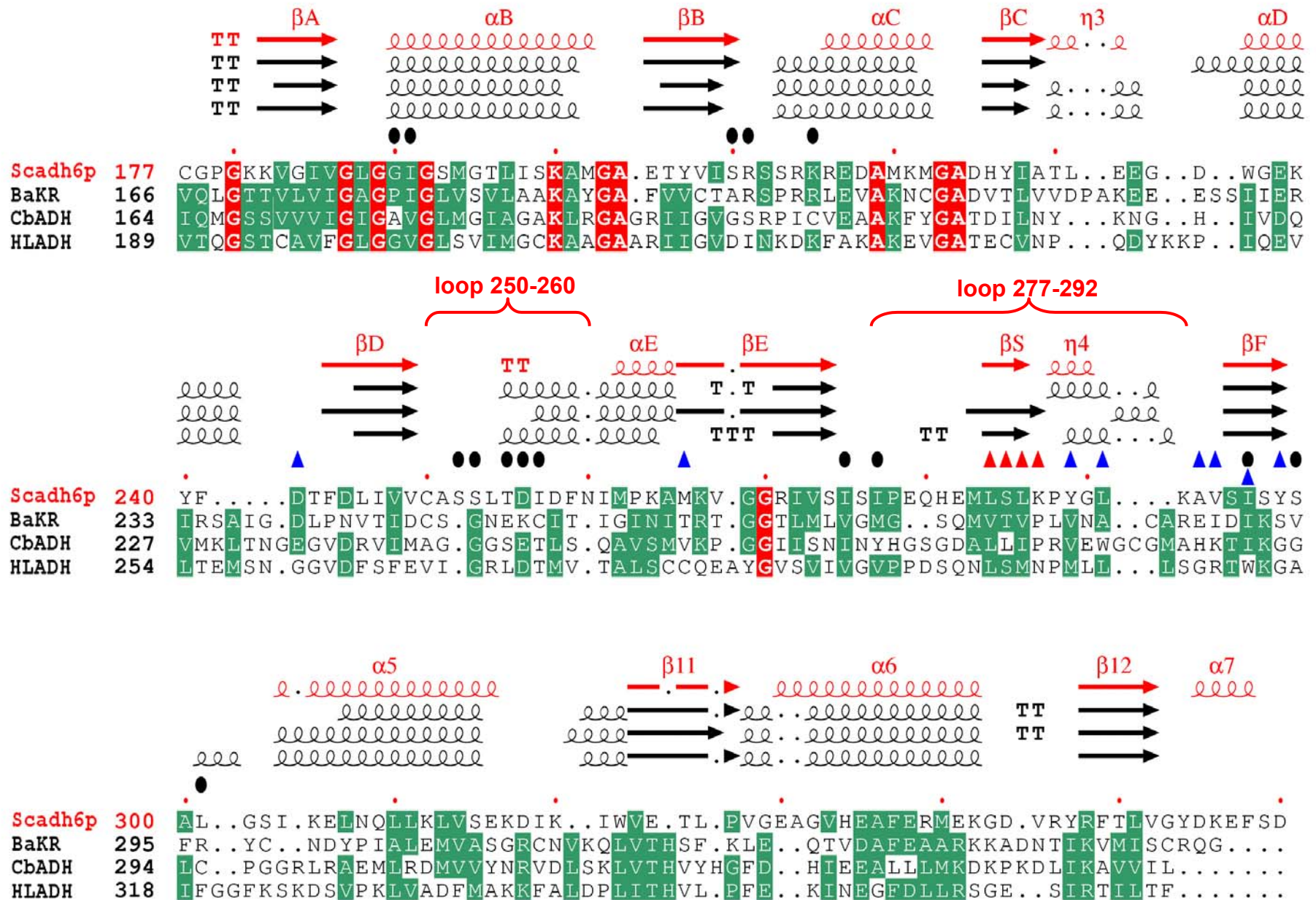


Figure 7

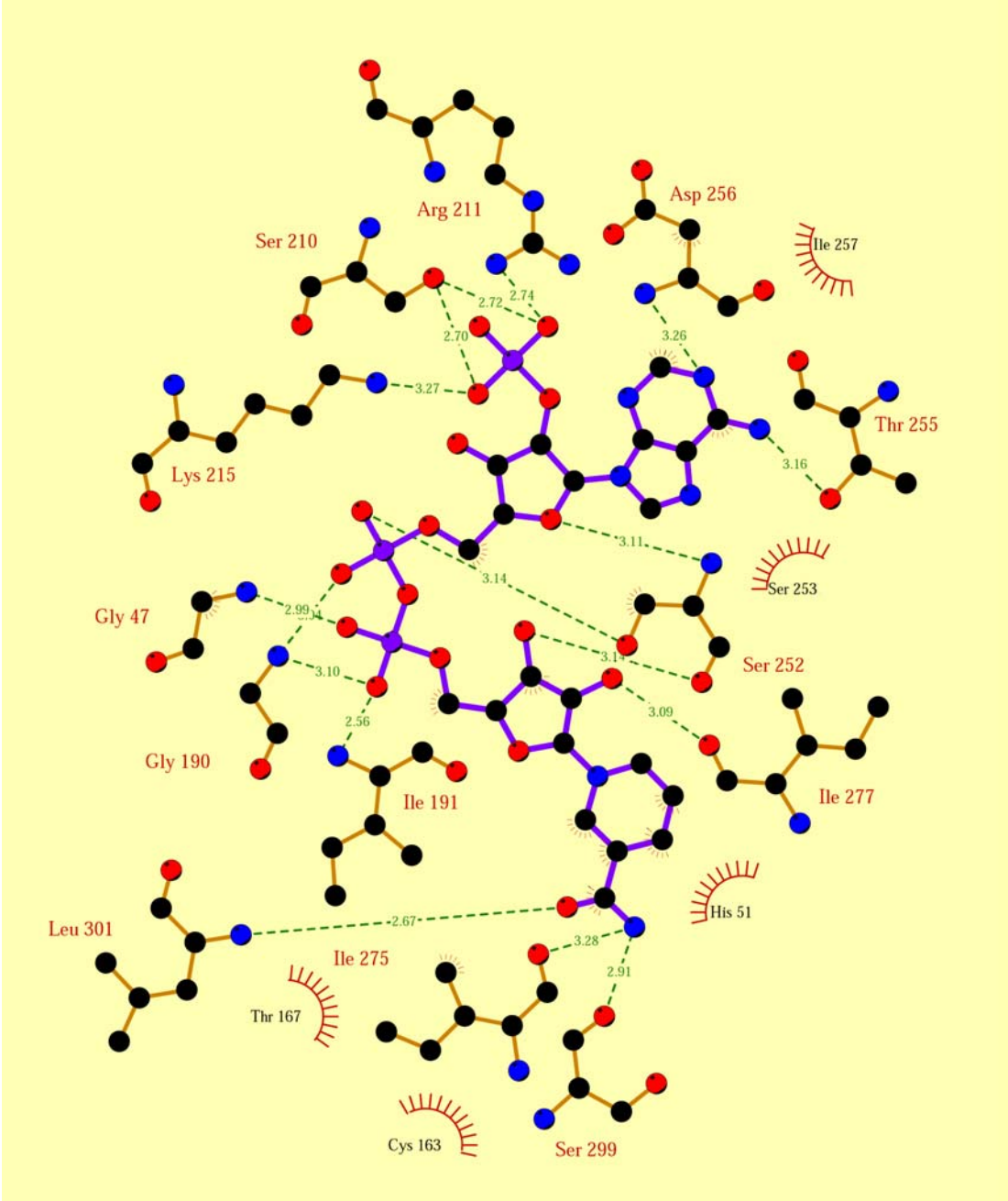
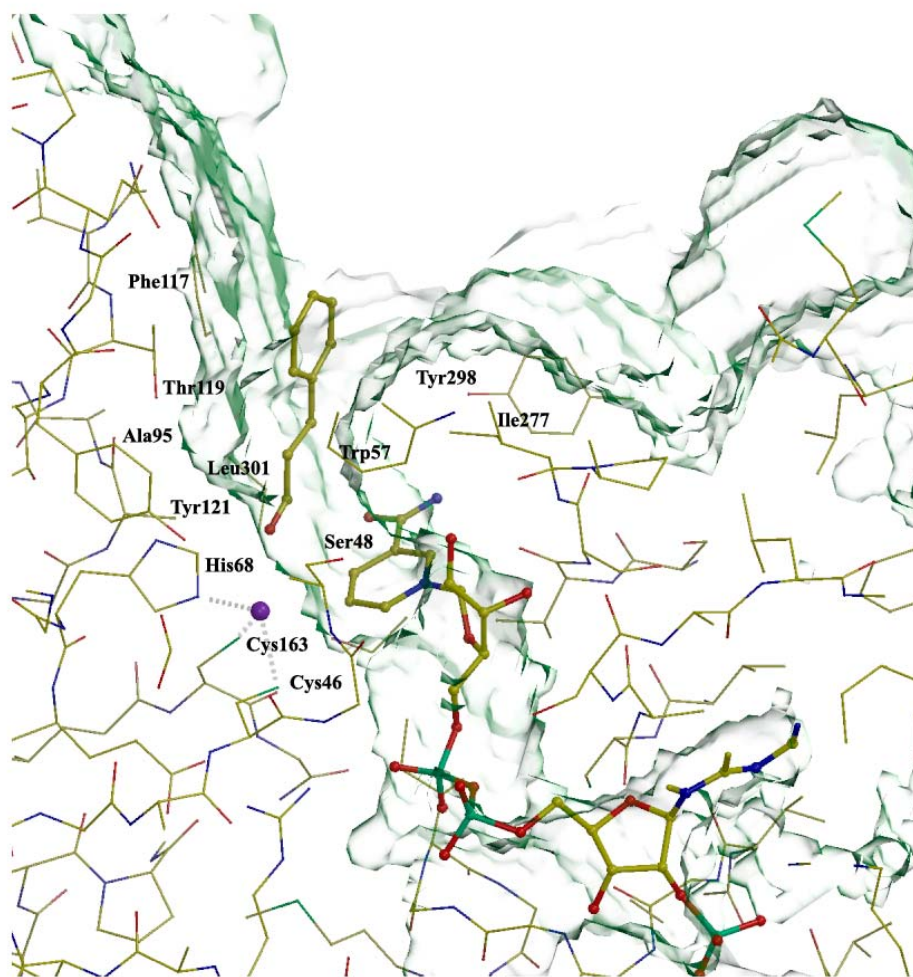


Figure 8



RESUM I DISCUSSIÓ DELS RESULTATS DEL MANUSCRIT *Apo* and *Holo* structures of an NADP(H)- Dependent Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*.

Enviat a J. Mol. Biol.

En aquest capítol es descriu com es va determinar i refinar l'estructura a 3Å de resolució de tres tipus de cristalls de ScAdh6p, dos trigonals i un monoclínic. S'analitzen els models estructurals obtinguts de cada un dels cristalls fent especial esment en la discussió del fenomen d'heterodimèria estructural observat tant en els cristalls trigonals com en els monoclínic. Es relaciona aquesta estructura heterodimèrica amb el fet que el cofactor s'hagi trobat només a la meitat dels llocs d'unió, relació molar (1mol cofactor/ 2mol llocs d'unió) que es correspon amb la descrita pels enzims que presenten "half-site reactivity", propietat que s'ha identificat en diversos enzims entre els quals també hi ha enzims de la família ADH (Bernhard i col., 1970; McFarland i Bernhard, 1972, Seydoux, Malhotra i Bernhard, 1974).

Es discuteix l'estratègia específica de la ScAdh6p per unir NADP(H), respecte d'altres ADHs d'igual especificitat, i es fa també un anàlisi comparatiu a nivell d'estructura primària amb altres proteïnes CAD, comprovant que la distribució de residus implicats en l'especificitat sembla compartir un mateix patró a les CADs. Ens hem detingut també en l'observació acurada del centre actiu, l'estudi del modelat del qual revela una relació directa entre la seva forma i volum i l'especificitat per substrats voluminosos.

D'altra banda, donada la baixa identitat de seqüència de la ScAdh6p amb altres estructures 3D disponibles, per resoldre la fase es va utilitzar una tècnica de recent aplicació al nostre laboratori, el SAD (*single anomalous diffraction*), utilitzant en aquest cas la difracció anòmala provocada per la presència dels dos únics àtoms de zinc que conté la molècula en els cristalls trigonals. Es descriu doncs detalladament, al començament d'aquest capítol, el procediment emprat per resoldre la fase en el context més general de la cristal·lografia.

1. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL PER A LA RESOLUCIÓ DE L'ESTRUCTURA CRISTAL·LINA DE ScAdh6p de S. Cerevisiae.

La proteïna pura ScAdh6p es va obtenir tal com es descriu en el capítol 1 d'aquesta tesi (Valencia i col., 2002), però usant una soca de llevat diferent, anomenada BL9 a la qual, tal com està descrit a l'apartat de procediments experimentals del manuscrit, se li van generar per mutagènesi certes modificacions específiques per eliminar una proteïna contaminant que copurificava amb ScAdh6p.

1.1 Obtenció de diverses formes cristal·lines

La taula 1 del manuscrit presenta la relació de dades corresponents als cristalls que es van utilitzar per difractar. Els primers cristalls es van obtenir de la manera com es descriu al capítol 1 (Valencia i col., 2002). Es van fer més assaigs de cristal·lització buscant una forma cristal·lina que difractés a major resolució. Els cristalls que millor difractaven s'obtenien després d'un parell de dies d'equilibri a temperatura ambient en gotes de 1 µl de solució de proteïna a 10mg/ml amb 1µl de solució del dipòsit que contenia sulfat amoni 1.6M i Hepes 0.1M a pH 7.0., es tractava d'uns cristalls trigonals de morfologia igual als primers obtinguts, hexahèdrics bipiramidals.

Es va formar també un segona forma cristal·lina que prèviament no havíem descrit, també amb el mateix mètode de difusió de vapor en gota-penjanant quan una solució de proteïna a 10.5mg/ml es precipitava amb 30%PEG 4000 tamponat amb 0.1 M Tris-HCl pH 8.5. Aquests cristalls eren monocíncics, del grup espacial C2, i creixien en un temps aproximat d'una setmana fins a una mida màxima de 0.2 x 0.3 x 0.5 mm. Aquests cristalls apareixien molt rarament.

Per tal de tenir cristalls dels complexos binaris de l'enzim amb NADP⁺ i/o NADPH es van fer proves de "soaking" i co-cristal·lització. Vam obtenir cristalls isomorfs als trigonals, quan incubàvem la mostra de proteïna concentrada a 10.5 mg/ml amb NADP⁺ 3.5mM tota la nit.

1.2 Recol·lecció de dades cristal·logràfiques.

La recol·lecció de dades pels cristalls trigonals de ScAdh6p sense NADP⁺ afegit, es va fer a als pics de longitud d'ona corresponents a l'espectre d'absorció del zinc (*the*

zinc absorption K-edge peak wavelength) que prèviament haver confirmat la presència del metall a l'enzim tal com explicàvem en el capítol 1 de la tesi (Valencia i col., 2002). Els cristalls, immersits en una solució crio protectora a 20% (v/v) glicerol, es van congelar a la temperatura d'ebullició del nitrogen. Les dades de difracció es van processar i escalar amb els programes *DENZO* i *SCALEPACK* (Otwinowski, 1993). La recollida i processament de dades dels cristalls monoclínic i del trigonal amb NADP⁺ afegit es van dur a terme de manera similar, excepte pel que fa a la longitud d'ona utilitzada, els paràmetres de recollida dels quals es recullen a la taula 1 del manuscrit.

2. TÈCNiques DE DIFRACCIó DE RAIGS X EN EL CONTEXT GENERAL DE LA CRISTAL·LOGRAFIA

El fenomen de difracció de raigs X obeeix a una fórmula física senzilla, que depèn de la longitud d'ona i de l'angle d'incidència de la radiació, a més de les distàncies entre els plans interns de la xarxa cristal·lina. Les intensitats mesurades estan relacionades amb la densitat electrònica $\rho(\mathbf{r})$ de la macromolècula en el cristall per la transformada de Fourier:

$$\rho(\mathbf{r}) = \int_{S^*} \mathbf{F}(\mathbf{r}^*) \exp(-2\pi i \mathbf{r}^* \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r}^* \quad (1)$$

$$\mathbf{F}(\mathbf{r}^*) = |\mathbf{F}(\mathbf{r}^*)| \exp(i\alpha(\mathbf{r}^*)) \quad (2)$$

$$|\mathbf{F}(\mathbf{r}^*)| = c\sqrt{I(\mathbf{r}^*)} \quad (3)$$

($|\mathbf{F}|$): mòdul del factor d'estructura; \mathbf{F} : factor d'estructura, α : angle fase del factor d'estructura; \mathbf{r}^* : vector posició a l'espai recíproc ($\mathbf{h}, \mathbf{k}, \mathbf{l}$); \mathbf{r} : vector posició a l'espai real ($\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}$) S^* : espai recíproc.)

En el cas de la cristal·lografia, els raigs X que emergeixen del cristall estan en la mateixa situació que els raigs de llum visible que emergeixen d'un objecte. Per la seva naturalesa, en canvi, els raigs X no són redireccionables per una lent. La recuperació de la imatge, és a dir, de l'estructura del cristall, precisa de la recuperació de la fase.

2.1 Com resoldre el problema de fases

Per obtenir la imatge final es necessiten informacions sobre l'amplitud i les fases de les ones difractades. La intensitat d'un punt de difracció en el detector defineix l'amplitud de l'ona, però la informació sobre la fase en què les ones es troben no és accessible directament. És l'anomenat problema de les fases de la cristal·lografia. La determinació de les fases de les ones informa quan considerar cada una, per així fer la suma total. Existeixen tres mètodes principals per determinar les fases d'ones. La substitució molecular, la substitució isomorfa senzilla o múltiple (SIR/MIR) i la difracció anòmala amb múltiples longituds d'ona (MAD) o una única longitud d'ona (SAD).

La substitució molecular necessita del coneixement previ de l'estructura tridimensional d'una altra proteïna, un model, que tingui almenys d'un 30 a 50% de seqüència homòloga a la que es vol analitzar. Aquest mètode el vam emprar per resoldre les fases de l'ADH8 utilitzant com a models les coordenades d'altres ADHs dipositades al PDB i també per resoldre la fase en els cristalls de ScAdh6p que van seguir al primer de tots. El model previ permet atribuir el valor de les fases inicials per les dades de difracció recollides.

La substitució isomorfa és el mètode clàssic per determinar fases d'estructures noves quan no existeixen models disponibles en els bancs de dades. En aquest mètode es comparen diversos conjunts de dades obtinguts per difracció de raigs X en "derivats" els quals consisteixen en l'addició a la mateixa d'un determinat àtom pesant (mercuri, platí o d'altres). Aquests poden localitzar-se amb precisió i serveixen com a referència artificial: les comparacions dels seus efectes, en els diferents conjunts de dades, permeten determinar la fase. Tot i que finalment no vam aprofitar les dades recollides amb aquest sistema, per resoldre l'estructura de ScAdh6p que té només un 25% d'identitat de seqüència amb la proteïna dipositada més semblant, vam fer derivats de Hg i Pt i Pb mitjançant "soaking" amb compostos que contenen aquests metalls, i vam recollir els espectres.

3. DIFRACCIÓ ANÒMALA (MAD /SAD)

Finalment, en el nostre cas, va ser més senzill aprofitar la presència constitutiva dels dos àtoms de Zn^{2+} de la molècula i resoldre les fases utilitzant la difracció anòmala produïda per aquests àtoms. Aquest mètode també permet obtenir les fases de les ones difractades per proteïnes sense disposar de models. Es basa en les diferències d'absorció de raigs X per àtoms pesants incorporats a la nostra proteïna. Aquest mètode és millor que l'anterior perquè només es necessita un "derivat" per determinar les fases. Variant la longitud d'ona dels raigs X que incideixen en l'àtom pesant, el mateix derivat actua de maneres diferents, la comparació de les dades obtingudes amb les longituds d'ona diferents (MAD, *multiwavelength anomalous diffraction*) permet calcular les fases tant del derivat com de la proteïna original. Vam recollir dades a les tres longituds d'ona que es corresponen amb al màxim f'' (9671.41 eV), en el punt d'inflexió mínim f' (9663.33 eV), i una remota (1050.0 eV) (Figura 8).

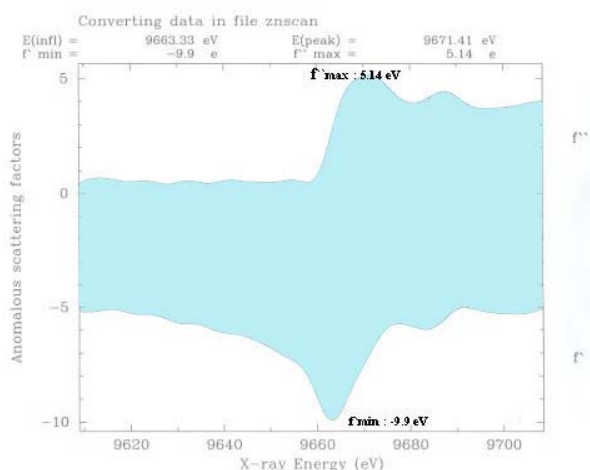


Figura 8. Difracció anòmala en funció de l'energia de raigs X

Vam processar i escalar les dades amb els programes *DENZO* i *SCALEPACK*. Les dades escalades juntes es van introduir a al programa *SOLVE-v2.02* (Terwilliger, 2000), però no trobàrem cap solució única amb les tres longituds d'ona, en canvi, amb les dades de només el pic màxim f'' (9671.4 eV) introduïdes al mateix programa *SOLVE-v2.02* (Terwilliger, 2000) es van trobar dues dispersions anòmals d'alta ocupació a la unitat asimètrica, que es corresponen amb els dos ions de Zn^{2+} per subunitat de proteïna.

3.1 Els programes SOLVE i RESOLVE

Els programes SOLVE i RESOLVE han mostrat que és possible automatitzar una part significativa dels processos de determinació de l'estructura de macromolècules per raigs X (Terwilliger TC, 2003) poden portar a terme tot tipus d'etapes per arribar a la solució de l'estructura molecular, des de l'escalat a la localització dels àtoms pesants i a través d'aquests trobar la fase, modificació de densitat (*density modification*) i construcció de model en els casos de MAD, SAD i MIR.

SOLVE utilitza un esquema de tempteig per convertir el fet de decidir la solució de l'estructura molecular en un problema d'optimització. RESOLVE porta a terme la identificació de NCS (simetria no cristal·logràfica), la modificació de densitat (*density modification*) i la construcció automàtica del model. El procés pot arribar a ser automàtic i pot funcionar a resolucions per sota de 3Å. En el nostre cas hem obtingut solució i una porció considerable del model construït a partir de dades a un grau de resolució que estava als límits (3.1Å), i usant la senyal anòmala no molt forta pròpia d'un àtom pesant com el zinc, gràcies a la bona qualitat del mapa aportada per la millora deguda a la modificació de la densitat electrònica per l'alt contingut de solvent dels cristalls, que estava entorn al 80%. (Figura 9)

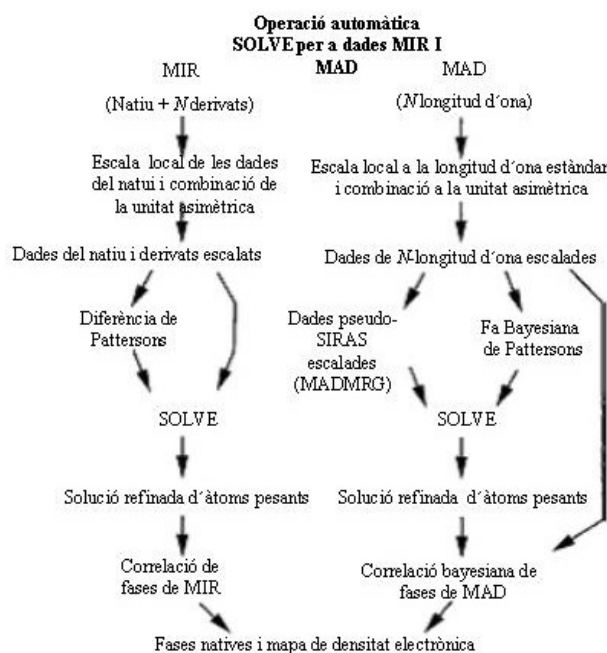


Figura 9. Etapes en la determinació automàtica d'estructura amb SOLVE

El tempteig de la Fourier nativa està basat en la identificació del solvent i les regions que contenen la molècula que són contigües i clarament separades unes de les altres. Utilitza l'algoritme de dividir la unitat asimètrica en caixes de 5-10Å d'una banda i de calcular la *desviació estandard* de la densitat electrònica entre cada caixa. Per les caixes que estan a la regió que conté proteïna és alta i per les que contenen solvent és baixa, tenir una gran quantitat de solvent incrementa la qualitat del mapa que es pot obtenir amb aquests programes (Terwilliger i Berendzen, 1999)

El procés estadístic de *density modification* es segueix d'una aproximació a la solució de l'estructura perquè el mètode és relativament insensible a la selecció del contingut de solvent i el nombre de cicles. La construcció del model automàtica comença amb una recerca d'hèlixs i fulles (Terwilliger, 1999) i ha donat resultat per mapes amb resolucions fins a 3Å. Com que els programes SOLVE i RESOLVE són unitats independents, la sortida de SOLVE (les amplituds i les fases dels factors d'estructura) són entrades necessàries per RESOLVE, però tots dos programes poden funcionar seqüencialment sense cap decisió de l'usuari i/o ho poden fer si introduïm les dades separatament.

3.2 Determinació de l'estructura i refinament de ScADH6p

La primera estructura es va resoldre amb la senyal anòmala a la longitud d'ona del Zn². Les fases es van millorar amb modificació de densitat (*density modification*) usant el programa *RESOLVE* (Terwilliger, 2000), en particular tractant les dades amb correcció de solvent (*solvent flatering*). Degut a l'alt contingut de solvent dels cristalls (78%) les fases milloraven molt amb aquest tractament. La qualitat d'aquest mapa de densitat ens va permetre seguir amb la coincidència de la majoria de la cadena principal, vam poder fer un traçat de 332 residus d'un total de 360.

Només costava interpretar les regions corresponents als extrems N i C terminals o la zona pròxima a l'eix binari cristal·logràfic, que coincidia amb l'eix binari molecular. El model construït en el mapa experimental usant el programa O (Jones i col., 1991) incloïa els residus Lys6-Ser252, Ile257-Ser276 i Ala293-Glu357. Usant aquest model incomplet, les estructures del cristall monoclínic i trigonal (amb NADP⁺ afegit) es van resoldre per reemplaçament molecular amb el programa *AMoRe* (Navaza, 1994). En els

cristalls monoclíncics, la unitat asimètrica contenia dues subunitats de ScAdh6p amb un volum de contingut de solvent del 68%.

Les tres estructures cristal·lines van ser refinades seguint els protocols habituals i usant iterativament el programa CNS (Brunger i col., 1998) amb la correcció de solvent i alternant amb la reconstrucció amb el programa O. El refinament dels factors de temperatura (*isotropic individual B-factors*) es va fer solament a les darreres etapes. Donada la resolució disponible dels cristalls, d'aproximadament 3Å, no vam incloure explícitament molècules d'aigua al model. Les coodenades i els factors d'estructura estan dipositats al banc de dades de proteïna (*Protein Data Bank*) amb els codis d'accés 1QIN (cristall trigonal sense NADP⁺), 1PS0 (cristall trigonal amb NADP⁺), 1PIW (cristall monoclínic).

4. ANÀLISIS DE L'ESTRUCTURA RESOLTA DE *ScAdh6p*

L'estructura molecular corresponent als cristalls trigonals obtinguts a partir de la mostra sense NADP⁺ afegit, comprèn tots els residus aminoacídics d'una subunitat de ScAdh6p, Met1-Asp360, dos ions de zinc i dos grups fosfat (o sulfat). En aquests cristalls trigonals, els *loops* Cys250-Asn260 i Ile277-Lys292 presenten conformació alternativa, cada un d'ells amb una ocupació aproximada del 50%.

L'estructura resolta a partir dels cristalls trigonals, obtinguts per co-cristal·lització amb NADP⁺, és molt similar, incloent-hi la conformació alternativa en els dos *loops*, amb una desviació (*root mean square deviation*) (r.m.s.d.) per tots els àtoms C α de 0.32Å. En aquests cristalls vam trobar una molècula de NADP⁺, amb aproximadament un 50% d'ocupació en el lloc d'unió a cofactor, on en l'altre cristall havíem trobat fosfats.

El modelat corresponent al cristall monoclínic comprèn tots els residus i els àtoms de zinc de cada una de les dues subunitats que es troben a la unitat asimètrica. En aquests cristalls monoclíncics el lloc d'unió a cofactor estava buit mentre que el mateix lloc en la segona subunitat contenia una forta densitat que és conseqüent amb la presència d'una molècula de NADP⁺ excepte pel fet que li manca la regió corresponent a la nicotinamida. De manera similar, també es va trobar una fosfo-ADP-ribose en el centre actiu de l'estructura cristal·lina de l'acetohidroxiàcid isomeroreductasa d'espinaç

(Thomazeau i col., 2000), suggerint que ha tingut lloc la hidròlisi del grup nicotinamida del NADP⁺ durant els processos de purificació o cristal·lització de les proteïnes.

4.1 ScAdh6p: *holo-* / *apo-* heterodímer estructural i “half- site reactivity”

La superposició dels C α de les dues subunitats independents que es van trobar als cristalls monocònics, amb un r.m.s.d. de 1.19Å, indicava només diferències significatives pels *loops* Cys250-Asn260 i Ile277-Lys292 amb desplaçaments majors de 6.0 i 6.9Å pels residus 255 i 280, respectivament (Figura 2b, manuscrit). El r.m.s.d. decreix fins a 0.36Å quan tots dos *loops* s'exclouen de la superposició, aquests valors reflecteixen que la disposició relativa dels dominis es manté invariable entre subunitats. A la subunitat que conté la fosfo-ADP-ribose, els dos *loops* es tanquen sobre el lloc d'unió del cofactor i interaccionen amb l'adenina, el pirofosfat i les dues riboses, tal com mostra la figura 2a del manuscrit que representa la superposició en l'espai de les conformacions H i A corresponents al cristall monocònic.

Així doncs, degut a les diferències entre aquests dos *loops* i l'ocupació diferent del cofactor (presència o no de cofactor) a cada subunitat de l'enzim, la molècula ScAdh6p del cristall monocònic es pot considerar un heterodímer estructural les subunitats dels quals han adoptat les conformacions *apo* (A) i *holo* (H) que es corresponen respectivament amb les pròpies de l'apoenzim (enzim no unit a cofactor) i de l'holoenzim (complex binari d'enzim unit a cofactor).

Per introduir el concepte de que el canvi conformacional està íntimament relacionat amb la funció de la proteïna, Monod, Wyman, i Changeux (MWC) van intentar descriure el fenomen de la regulació enzimàtica. El clàssic model MWC, es basa en la conservació de la simetria molecular per explicar els canvis conformacionals deguts a la unió de lligant (Monod i col., 1965), aporta una explicació plausible per diversos fenòmens al·lostèrics incloent-hi les interaccions homotròpiques positives i la modulació d'aquestes interaccions per efectors heterotròpics positius i negatius en canvi no pot explicar les interaccions homotròpiques negatives i per tant tampoc el fenomen de “half-site reactivity”. El model proposat per Koshland, Nemethy, i Filmer (KNF; Koshland i col., 1966) sovint es presenta com una alternativa al model MWC. Aquest

model evita assumir que es doni simetria de subunitats i permet l'existència de formes conformacionals intermèdies. El model KNF proposa que el canvi conformacional és induït en les subunitats individuals com una conseqüència de la unió del lligant i que els canvis conformacionals tenen lloc de manera seqüencial. D'aquesta manera, en absència de lligants la proteïna existeix en una única conformació. Pot explicar també la major part de fenòmens al·lostèrics amb l'excepció novament de les interaccions homotròpiques negatives.

El terme cooperativitat negativa s'utilitza empíricament per referir-se a unions en les quals l'afinitat aparent es torna més dèbil quan la concentració de lligant incrementa o per a unions que semblen saturar quan la ocupació és menor al nombre total de llocs (p.e.: "half-site reactivity").

Basant-se en l'observació de que algunes proteïnes oligomèriques i enzims estan compostats per dímers asimètrics, p.e., parelles de polipèptids amb idèntica estructura covalent que tenen diferent conformació terciària, Seydoux, Malhotra i Bernhard (SMB; Seydoux i col., 1974) van proposar les bases estructurals plausibles per explicar la cooperativitat homotròpica negativa. El model SMB postula que la simetria subòptima pot donar cabuda a dues classes de llocs d'unió entre les unitats del dímer, i en l'extrem, la unió a una classe de lloc (a un tipus de subunitat) pot impedir la unió a la segona classe de lloc (a l'altra subunitat), una condició designada com a "half-site reactivity" (Reactivitat de la meitat del lloc) (Matthews i Bernhard, 1973).

El model SNB (Seydoux i col. 1974) es pot descriure utilitzant quatre supòsits en quant a l'estructura d'una proteïna oligomèrica.

- (1) Estan compostats per subunitats o protòmers de seqüència primària idèntica, agrupats en unitats dimèriques amb un eix de simetria binari imperfecte (pseudosimètriques).
- (2) L'agregació en n número de unitats dimèriques té lloc en un ordenament regular sobre un eix de perfecta simetria n .
- (3) Al menys existeixen dues conformacions globals diferents dels protòmers per l'estructura nativa, anomenades T i R en analogia de la nomenclatura MWC.
- (4) La unió dels lligants té lloc a diferents llocs simètricament realcionats que estan separats per àmplies distàncies.

Les propietats de “half-site reactivity”, interaccions homotròpiques positives i negatives, així com les interaccions heterotròpiques positives i negatives es donen com a conseqüència d’aquestes propietats físiques dels oligòmers.

Tenim diferents raons per pensar que la molècula presentaria, prèviament a la unió del cofactor, la conformació d’heterodímer estructural. Existiria a la ScAdh6p una asimetria inherent a l’enzim, és a dir, serien molt més estables els dímers pseudoisòlegs que no pas els aparellaments isòlegs (segons la terminologia utilitzada pel model SMB, Seydoux, Malhotra i Bernhard, 1974).

El primer indicatiu d’aquest fet el vam trobar en la impossibilitat d’obtenir l’apoenzim en forma pura i lliure de fosfats en el medi. Mentre que el procés de purificació de l’enzim, que ha estat posat a punt i perfeccionat amb tècniques d’enginyeria genètica (Larroy i col. 2002a,b) donava un bon rendiment de proteïna purificada, la forma no acomplexada i sense fosfats en el medi no es podia recuperar en absolut dels processos de purificació. Aquest fet fa pensar que l’estabilitat de la conformació inicial de l’apoenzim és molt inestable i presentaria una forta tendència a convertir-se en la forma heterodimèrica (de més baixa simetria) que a l’hora és la conformació més estable.

Una altra dada que recolza aquesta idea es basa en el fet que en els cristalls trigonals hi havia un desordre localitzat pròxim a l’eix de simetria i relacionat amb el lloc d’unió a cofactor, aquest desordre el vam interpretar i traçar com a dues posicions alternatives de dos *loops*. Aquests mateixos dos *loops* són els que adopten conformacions A i H, en els cristalls monocíncics i les seves posicions en l’espai són coincidents amb les posicions alternatives dels cristalls trigonals. El traçat alternatiu dels cristalls trigonals, es pot explicar doncs, si considerem que la seva estructura seria una barreja que contindria aproximadament un nombre equivalent de subunitats en la conformació A i la conformació H. Per tant, tots els cristalls obtinguts, tant els formats a partir de mostres amb NADP⁺ afegit com els que apareixen a partir de mostres sense NADP⁺ afegit, tindrien el seu origen en una mostra de molècules dimèriques en la qual la meitat de les subunitats tindrien la conformació corresponent a la pròpia de l’apoenzim i l’altra meitat la conformació corresponent a la de l’holoenzim.

Corroboren aquesta hipòtesi els resultats obtinguts de modelar una hipotètica molècula de ScAdh6p que tingués totes dues subunitats en la conformació *apo* (Figura 4 del manuscrit). Aquesta conformació de l'apoenzím com a dímer isòleg d'A seria estèricament impossible perquè el *loop* Ile277-Lys292 es toparia amb el mateix *loop* en la segona subunitat. Davant de la dificultat que presentaria la molècula per trobar-se en conformació A com a dímer isòleg, s'esperaria d'aquesta conformació hipotètica una gran inestabilitat i aquesta seria la raó per la qual en els cristalls trigonals obtinguts de mostres sense NADP⁺ afegit, les molècules de ScAdh6p són també heterodímers estructurals de les conformacions A i H (conformació més estable) en les quals la conformació H podria ser estabilitzada per la presència de grups fosfat que ocuparien els mateixos llocs que ocupen els grups fosfat propis de la molècula cofactor NADP⁺.

Un raonament similar serveix per explicar el doble traçat en els cristalls trigonals aconseguits de mostres d'enzím amb NADP⁺ afegit. En el modelat de la hipotètica molècula de ScAdh6p amb conformació *holo* com a dímer isòleg, és a dir, que totes dues subunitats adoptessin la conformació H, alguns dels ponts d'hidrogen entre subunitats, els que es veuen en heterodímer o dímer pseudoisòleg, es trencarien, així doncs la molècula en forma *holo* com a dímer isòleg també seria inviable o molt difícil d'aconseguir, i altre cop en la mostra que va donar lloc als cristalls hi hauria hagut un equilibri al·lostèric en què la majoria de molècules estaria en la conformació més estable, com a dímer pseudoisòleg. En aquest cas, per la saturació de NADP⁺ en el medi, la major part de les molècules estarien lligades a l'efector en el tipus de lloc on és possible la unió, és a dir només la meitat de les subunitats estarien unides a NADP⁺.

Així doncs, la forma energèticament més estable per les molècules ScAdh6p seria la de heterodímers estructurals amb una subunitat en la conformació A i l'altra en la conformació H. Aquest tipus d'asimetria molecular afavoreix que s'uneixi el cofactor únicament a una de les subunitats del dímer, això suggereix un mecanisme de reactivitat de la meitat dels llocs d'unió ("half-site reactivity"), terme utilitzat per descriure enzims que reaccionen només en la meitat dels seus centres actius (Fersht, 1999).

La "half-site reactivity" reflexa l'asimetria inherent entre els enzims oligomèrics, mentre que la "full-site reactivity" reflexa capacitat del substrat real per facilitar o induir la simetria recíproca (Seydoux i col., 1974). Alguns dels enzims que

tenen cooperativitat negativa i “half-site reactivity” estan involucrats en dos processos de catàlisi diferents. Fins i tot quan només participen en un procés catalític sembla que hi ha un mecanisme de regulació via efectors de conformació positiva o negativa relacionat amb aquesta capacitat de tenir “half-site reactivity”. Es pensa que en general hi haurà un equilibri via *flip-over* entre les dues subunitats i que el rang d’interconversió depèn de l’estructura del lligant. p.e.: l’enzim GPDH quan s’uneix al seu substrat “real” 3-fosfoglicerol té reactivitat en tots els llocs però quan s’uneix al β -2furil acetil acil (pseudosubstrat) té reactivitat a la meitat dels llocs (Conway i Koshland, 1968, Seydoux i col., 1973).

Els contactes d’empaquetament que es donen en els cristalls monoclíncics impliquen l’eix de simetria binària molecular. Els *loops* Cys250-Asn260 i Ile277-Lys292 participen en l’empaquetament dels cristalls monoclíncics. L’ordenació del cristall i la segregació entre subunitats H i A permet veure clarament com es disposen els *loops* mòbils a la molècula heterodimèrica. En els cristalls trigonals aquests *loops* no participen en l’empaquetament dels cristall, el centre de simetria cristal·logràfica coincideix amb l’eix binari aproximat de la molècula heterodimèrica en el qual es troben els dos *loops* mòbils esmentats, això permet explicar el desordre que es troba als cristalls trigonals.

A pesar de la baixa identitat de seqüència que comparteix la ScAdh6p amb altres estructures disponibles (<22%), la ScAdh6p presenta una topologia similar a altres MDRs amb un domini catalític (residus Met1-Cys163 i Leu301-Asp360) i un domini d’unió a coenzim (residus Gly164-Ala300) separats per un solc profund. La superposició de la subunitat ScAdh6p en la conformació *holo* amb la corresponent estructura de alcohol deshidrogenasa de fetge de cavall (codi PDB: 2OHX) i amb la alcohol deshidrogenasa secundària de *Clostridium beijerinckii* també en conformació *holo* (codi PDB: 1KEV), dóna en ambdós casos un valor de r.m.s.d. al voltant de 2.8 Å per 330 residus equivalents (Holm i Sander, 1996). La superposició de la conformació *apo* de la Cetosa reductasa de *Baemissia argentifolii* (codi PDB: 1E3J), dóna un r.m.s.d. de 2.5Å. A diferència del que s’ha trobat per la ScAdh6p, la unió del coenzim indueix moviments significatius inter-donimi en varies MDRs (Eklund i col., 1981, 1987; Colonna-Cesari i col., 1986), tot i que no sempre passa així (Sanghani, P.C., i col., 2002). Els alineaments de seqüència mostren una inserció de sis residus (Pro124-

Tyr129 en ScAdh6p), que podria tenir sobretot funció estructural i actuarien conferint rigidesa a la molècula de ScAdh6p.

4.2 Especificitat d'unió a cofactor

Les MDRs dependents de NAD(H) tenen un residu conservat negatiu al C-terminal de la làmina β que forma enllaços d'hidrogen amb els grups hidroxils 2' i 3' de l'adenosin ribosa del coenzim. En canvi, els enzims dependents de NADP(H) tenen un residu petit i neutre en aquesta posició, com seria la glicina en amfibis (ADH8) o la Ser210 a ScAdh6p, perquè un aspàrtic o glutàmic podria interferir estèricament i electrostàticament amb el fosfat terminal del NADP(H). Estava descrit que la presència d'un o dos residus bàsics, és important per l'especificitat per NADP(H) i aquesta situació es compleix també amb l'Arg211 i la Lys215 de la ScAdh6p (Carugo i Argos, 1997).

En ADHs dependents de NADP(H) de bacteris, la unió de NADP(H) involucra els residus contigus: Ser, Arg i Tyr, aquesta Tyr fa un enllaç d'hidrogen amb el fosfat de la ribosa. Tots tres residus tenen funció equivalent a la Ser210, Arg211 i Lys215, que determinen la unió del NADP(H) a la ScAdh6p. A la ADH8 la preferència per NADP(H) està determinada per la disposició i les interaccions dels residus Gly223, Thr224 i His225 tal com recullen els treballs exposats en el capítol 3 d'aquesta tesis que tracta sobre les mutacions específiques per identificar els residus responsables de l'especificitat per NADP(H) a l'ADH8.

Per tant, l'estratègia d'unió del fosfat terminal per la ScAdh6p és diferent, encara que els canvis de seqüència necessaris són molt pocs, en particular degut al reclutament de la Lys215 conservada amb un nou paper en la unió del NADP(H). Aquests resultats estan d'acord amb els estudis bioquímics i de modelat de la CAD2 d'*Eucalyptus gunnii*, en els quals es va concloure que la Ser212 i l'Arg217 (equivalents a la Ser210 i la Lys 215) han de participar en la unió del grup fosfat terminal de NADP(H) (McKie i col., 1993; Lauvergeat i col., 1995).

És interessant comprovar com, segons els alineaments de seqüència que mostrem a la figura 6 recollida en el manuscrit d'aquest capítol, totes les CADs unarien el fosfat terminal del cofactor amb el mateix patró que la ScAdh6p, amb l'excepció de la MTD d'*Apium graveolens* (Williamson i col., 1995), amb activitat manitol

deshidrogenasa dependent de NAD i en la qual un aspàrtic ocupa la posició equivalent a la Ser210 en ScAdh6p. El residu Asp, carregat negativament interferiria amb el fosfat extra del NADP⁺ si la molècula utilitzés aquesta molècula com efector.

4.3 El centre catalític

El centre actiu de la ScAdh6p està situat en el solc que queda entre els dominis catalític i el domini d'unió a coenzim, centrat al voltant del ió de zinc. Aquest zinc apareix coordinat de manera tetraèdrica amb els residus Cys46, His68, Cys163 i una molècula de solvent, tant en la forma *apo* com en la forma *holo*, estructuralment es tracta d'un zinc del mateix tipus que s'ha descrit per altres ADHs.

Per tal de tenir una imatge gràfica del mecanisme d'acció de l'enzim vam generar un model del complex ternari, de l'holoenzim amb cinamaldehyd, un dels aldehids aromàtics en vers el qual l'enzim ha mostrat experimentalment tenir elevada efectivitat de reacció (Larroy i col., 2002). Per fer el model vam utilitzar les coordenades de la molècula refinada a partir de les dades del cristall trigonal format amb NADP⁺ afegit i vam fer un mapa de superfície a partir de la densitat electrònica del mateix utilitzant el programa *VOLUMS* (R.M. Esnouf, unpublished program). Vam col·locar el substrat seguint el model que està descrit per la ADH1 de cavall (Eklund i col., 1985), l'oxigen carbanil del substrat coordinat amb el zinc i proper al cofactor, de manera que sigui possible la transferència hídrida. La figura 8 del manuscrit del capítol mostra una secció de l'esmentat modelat. Es poden veure els residus que en contacte amb el cinamaldehyd, corresponents a les zones interna, intermèdia i externa del lloc d'unió a substrat.

Vam fer el mateix tipus de modelat amb l'estructura coneguda d'ADH1 de cavall per poder analitzar comparativament els mapes de superfície i la disposició tridimensional dels tres elements dels complexos (Figura 10). Alguns dels residus que estan en contacte amb el substrat a la ScAdh6p eren anàlegs al centre actiu de l'ADH1 de cavall (sobretot els més interns), d'altres no tenien correspondència.

La diferència més evident està en el *loop* 116-138 de l'ADH1 de cavall, que no està present a la ScAdh6p, part d'aquest *loop* a l'ADH1 de cavall estaria restringint l'entrada del centre actiu. Comparant els mapes de superfície d'ambdues proteïnes s'aprecia clarament que la capacitat del canal d'entrada del centre actiu de ScAdh6p és

major que la d'ADH1 de cavall. Aquesta amplitud del centre actiu està d'acord amb l'especificitat de substrat que mostra l'enzim ScAdh6p, que té activitat amb compostos aromàtics voluminosos.

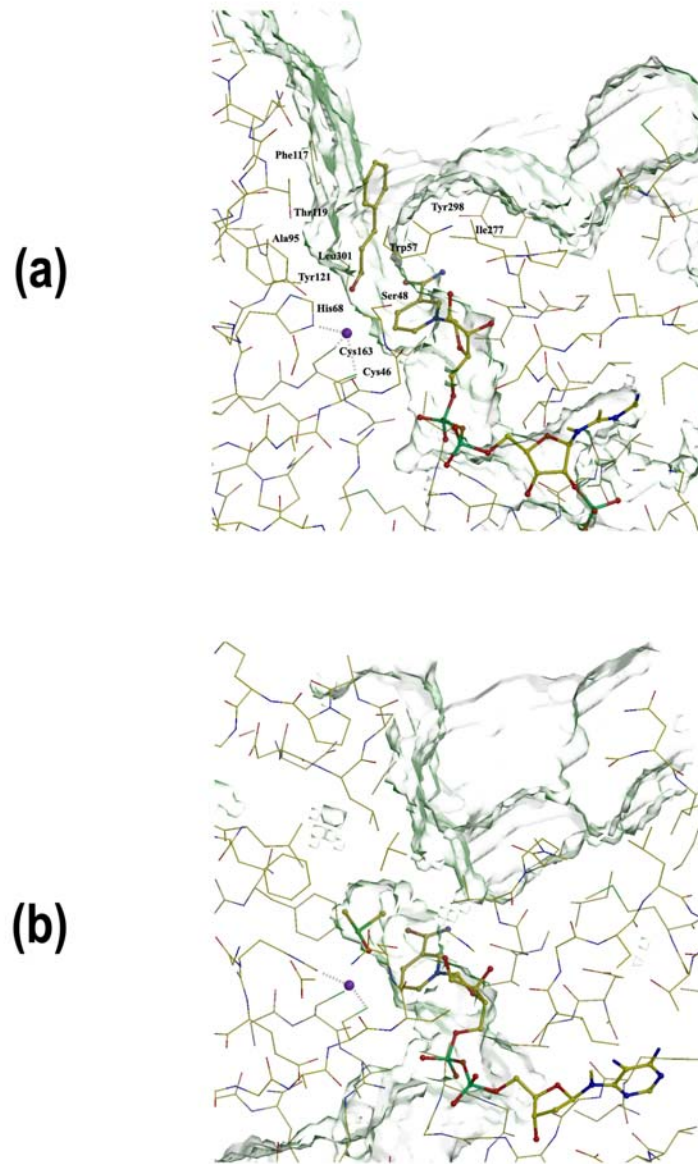


Figura 10. Docking de substrat en el centre catalític a la molècula unida a cofactor. Es pot apreciar com el solc catalític a la ScAdh6p (a) és més ample que a ADH de cavall (b).

Els enzims ADH1 de cavall i de ScAdh6p tenen en comú, en quant als seus centres actius, que tots dos prefereixen cadenes hidrofòbiques, els grups polars coordinen amb el Zn catalític juntament amb una part de la nicotinamida del coenzim i la cadena lateral de la Ser48. En general, els residus involucrats en la unió dels zincs catalític i estructural a ScAdh6p es corresponen amb la informació que aportava l'estudi de McMie (McMie JH., 1993) que consisteix en un modelat de la CAD2 d'*Eucapliptus gunnii*, suggerint que es tracta d'un patró comú a les CADs.

CONCLUSIONS

1. Es van obtenir els espectres de difracció a alta resolució de diferents cristalls per dues alcohol deshidrogenases dependents de NADP(H): ADH8 de *R. Pirezi* i ScAdh6p de *S. Cerevesiae*.
 - a) ADH8 és l'única ADH dependent de NADP(H) de vertebrats caracteritzada fins al moment. Amb les dades obtingudes es va aconseguir solucinar la fase per reemplaçament molecular.
 - b) ScAdh6p és membre dels enzims CAD (Larroy i col., 2002), amb només un 26% d'identitat de seqüència respecte a d'altres ADHs d'estructura coneguda, es va poder resoldre per reemplaçament molecular.

2. La determinació estructural a alta resolució de totes dues proteïnes clarificarà les peculiaritats de les ADHs dependents de NADP(H), particularment la seva preferència per cofactor. A més l'estructura de la ScAdh6p aportarà la primera aproximació tridimensional per explicar les relacions entre estructura i funció a la família de les cinamil alcohol deshidrogenases.

3. Quan es va caracteritzar la ADH8 es va classificar com a classe *IV-like* per la seva especificitat de substrat i la localització gàstrica similar a la de classe IV de mamífers. Posteriorment es va considerar classificar-la dintre d'una nova classe (classe VIII o ADH8) donat la seva diferent especificitat per cofactor i la seva estructura primària. Diverses propietats estructurals, determinades arrel d'aquests, semblen consistents amb que es consideri com una classe separada, en particular:
 - a) La grandària del centre actiu.
 - b) El diferent patró de *proton relay*.
 - c) La reordenació molt específica en el lloc d'unió al fosfat del cofactor.
 - d) Les interaccions dèbils de la meitat de l'adenina.

Tot i així, la nomenclatura de ADH8 ha de ser validada per investigació addicional a les línies d'ADHs d'altres vertebrats.

4. Les dues estructures d'ADH8 que ara estan disponibles, a més d'explicar l'especificitat de cofactor, permeten racionalitzar els diferents patrons cinètics de l'enzim com ara l'elevada K_{cat} i K_m per l'etanol i l'elevada eficiència catalítica amb retinals que resulta en una de les més eficients reductases de retinal conegudes fins al moment.
5. Uns pocs canvis concertats, en una regió molt concreta de la seqüència primària de ADH8, permetrien la versatilitat en el cofactor usat per les ADHs.
6. A partir dels experiments cinètics i l'anàlisi dels models dels mutants dissenyats per estudiar l'especificitat per NAD(H) o NADP(H) hem pogut comprovar que el residu 223 no és l'únic que discrimina la preferència de coenzim.
 - a) En ADHs amb "Rossmann fold" dependents de NAD l'Asp223 està considerat determinant de la butxaca d'unió de NAD(H).
 - b) En canvi els enzims dependents de NADP tenen un residu petit i no carregat, que redueix les relacions estèriques i electrostàtiques que es donarien en unir el grup fosfat extra del NADP(H).
7. L'efecte de reversió en l'especificitat de NADP⁺ a NAD⁺ apareix en el triple mutant G223D, T224I i H225N.
 - a) En el doble i triple mutant l'efecte cinètic de l'isòtop es perd quan utilitza NADP⁺ com a cofactor. Aquest fet està relacionat amb un canvi en l'etapa limitant ja que deixa d'haver transferència hídrida.
 - b) La transferència hídrida és també l'etapa limitant a l'ADH3 (Lee i col., 2003) i al mutant I269S de la ADH1 de cavall (Fan i Plapp, 1995) a diferència d'altres ADHs com la de cavall i altres específiques d'etanol i alcohols alifàtics en què l'etapa limitant és la dissociació de NADH.
8. Es determina l'estructura cristal·lina de ScAdh6p. És la primera de la família de les CADs. Aquests resultats completen la informació estructural disponible per al menys un representant d'una de les quatre famílies dels enzims MDR que uneixen Zn.

9. La ScAdh6p comparteix les mateixes característiques amb les MDR dimèriques que contenen Zn però amb importants peculiaritats:
- a) La mida i la forma dels centre actiu sembla adaptar-se al volum i la hidrofobicitat dels substrats de les CADs.
 - b) L'especificitat envers NADP(H) es porta a terme a través d'interaccions de tipus "trípode" del fosfat terminal del cofactor amb les cadenes laterals de la Ser210, Arg211 i Lys215.
 - c) La interconversió entre les conformacions *apo* i *holo* no requereixen canvis en la disposició relativa dels dominis, sinó que dos *loops* Cys250-Asn260 i Ile277-Lys292 experimenten amplis moviment.
10. Les molècules ScAdh6p semblen presentar-se majoritàriament com a heterodímers estructurals. Aquests fet estaria lligat amb l'existència de dos tipus de llocs d'unió, a un dels quals les molècules de NADP⁺ s'unirien amb molta més afinitat.
11. Sota les condicions experimentals en què es formen els cristalls que hem analitzat, l'enzim hauria de funcionar d'acord amb el mecanisme de reactivitat en la meitat dels llocs ("half-site reactivity"), mecanisme al·lostèric resultant de l'asimetria inherent a l'enzim prèvia a la unió de cofactor. Aquest mecanisme hauria de contribuir a l'eficiència catalítica facilitant la dissociació de productes i, en particular, del cofactor transformat, dissociació que freqüentment és l'etapa limitant dels enzims dependents de NADP(H). Disposar de dades que ens poden aportar diversos estudis cinètics ens ajudaria a analitzar la viabilitat d'aquesta hipòtesis.

BIBLIOGRAFIA

- Baker, P.J., Britton, K.L., Engel, P.C., Farrants, G.W., Lilley, K.S., Rice, D.W. and Stillman, T.J. (1992) Subunit assembly and active site location in the structure of glutamate dehydrogenase. *Proteins*, **12**, 75-86.
- Banfield, M.J., Salvucci, M.E., Baker, E.N. and Smith, C.A. (2001) Crystal structure of the NADP(H)-dependent ketose reductase from *Bemisia argentifolii* at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol*, **306**, 239-250.
- Bannister, W.H. (1967) The oxidation-reduction state of pyridine nucleotide in isolated frog gastric mucosa. *Experientia*, **23**, 715-716.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Ewlinger, L., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Howe, K.L., Marshall, M. and Sonnhammer, E.L. (2002) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, **30**, 276-280.
- Bernhard, S.A., Dunn, M.F., Luisi, P.L. and Schack, P. (1970) Mechanistic studies on equine liver alcohol dehydrogenase. I. The stoichiometry relationship of the coenzyme binding sites to the catalytic sites active in the reduction of aromatic aldehydes in the transient state. *Biochemistry*, **9**, 185-192.
- Boerjan, W., Ralph, J. and Baucher, M. (2003) Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol*, **54**, 519-546.
- Boleda, M.D., Farres, J., Guerri, C. and Pares, X. (1992) Alcohol dehydrogenase isoenzymes in rat development. Effect of maternal ethanol consumption. *Biochem Pharmacol*, **43**, 1555-1561.
- Boleda, M.D., Saubi, N., Farres, J. and Pares, X. (1993) Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation, omega-hydroxyfatty acids, and retinoids. *Arch Biochem Biophys*, **307**, 85-90.
- Borras, T. and Rodokanaki, A. (1989) Primary structure of zeta-crystallin protein from guinea pig. Its similarity to the enzyme alcohol dehydrogenase. *Lens Eye Toxic Res*, **6**, 795-805.
- Bränden, C.I. (1965) Structure of horse liver alcohol dehydrogenase. I. Structural symmetry and conformational changes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **112**, 215.
- Bränden, C.I., Eklund, H., Nordstrom, B., Boiwe, T., Soderlund, G., Zeppezauer, E., Ohlsson, I. and Akeson, A. (1973) Structure of liver alcohol dehydrogenase at 2.9-angstrom resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **70**, 2439-2442.
- Bränden, R. and Reinhammar, B. (1975) EPR studies on the anaerobic reduction of fungal laccase. Evidence for participation of type 2 copper in the reduction mechanism. *Biochim Biophys Acta*, **405**, 236-242.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54 (Pt 5)**, 905-921.
- Burdette, D.S., Vieille, C. and Zeikus, J.G. (1996) Cloning and expression of the gene encoding the *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E secondary-alcohol dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *Biochem J*, **316 (Pt 1)**, 115-122.
- Carugo, O. and Argos, P. (1997) NADP-dependent enzymes. II: Evolution of the mono- and dinucleotide binding domains. *Proteins*, **28**, 29-40.
- Ciriacy, M. (1997) In Yeast sugar metabolism. *Ed FK Zimmermann y KD Entian. Technomic Publishing Group.*, 218-220.

- Colonna-Cesari, F., Perahia, D., Karplus, M., Eklund, H., Braden, C.I. and Tapia, O. (1986) Interdomain motion in liver alcohol dehydrogenase. Structural and energetic analysis of the hinge bending mode. *J Biol Chem*, **261**, 15273-15280.
- Conway, A. and Koshland, D.E., Jr. (1968) Negative cooperativity in enzyme action. The binding of diphosphopyridine nucleotide to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, **7**, 4011-4023.
- Copeland, B.E. and Bernhard, W.G. (1968) Laboratory data. *Jama*, **203**, 1074.
- Crosas, B., Cederlund, E., Torres, D., Jornvall, H., Farres, J. and Pares, X. (2001) A vertebrate aldo-keto reductase active with retinoids and ethanol. *J Biol Chem*, **276**, 19132-19140.
- Davis, G.J., Carr, L.G., Hurley, T.D., Li, T.K. and Bosron, W.F. (1994) Comparative roles of histidine 51 in human beta 1 beta 1 and threonine 51 in pi pi alcohol dehydrogenases. *Arch Biochem Biophys*, **311**, 307-312.
- Duester, G. (1999) Function of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase gene families in retinoid signaling. *Adv Exp Med Biol*, **463**, 311-319.
- Duester, G. (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem*, **267**, 4315-4324.
- Duester, G., Farres, J., Felder, M.R., Holmes, R.S., Hoog, J.O., Pares, X., Plapp, B.V., Yin, S.J. and Jornvall, H. (1999) Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Biochem Pharmacol*, **58**, 389-395.
- Edenberg, H.J. (2000) Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **64**, 295-341.
- Edenberg, H.J., Brown, C.J., Hur, M.W., Kotagiri, S., Li, M., Zhang, L. and Zhi, X. (1997) Regulation of the seven human alcohol dehydrogenase genes. *Adv Exp Med Biol*, **414**, 339-345.
- Edwards, K.J., Barton, J.D., Rossjohn, J., Thorn, J.M., Taylor, G.L. and Ollis, D.L. (1996) Structural and sequence comparisons of quinone oxidoreductase, zeta-crystallin, and glucose and alcohol dehydrogenases. *Arch Biochem Biophys*, **328**, 173-183.
- Eklund, H. and Branden, C.I. (1979) Structural differences between apo- and holoenzyme of horse liver alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem*, **254**, 3458-3461.
- Eklund, H., Branden, C.I. and Jornvall, H. (1976a) Structural comparisons of mammalian, yeast and bacillar alcohol dehydrogenases. *J Mol Biol*, **102**, 61-73.
- Eklund, H., Horjales, E., Jornvall, H., Branden, C.I. and Jeffery, J. (1985) Molecular aspects of functional differences between alcohol and sorbitol dehydrogenases. *Biochemistry*, **24**, 8005-8012.
- Eklund, H., Horjales, E., Vallee, B.L. and Jornvall, H. (1987) Computer-graphics interpretations of residue exchanges between the alpha, beta and gamma subunits of human-liver alcohol dehydrogenase class I isozymes. *Eur J Biochem*, **167**, 185-193.
- Eklund, H., Muller-Wille, P., Horjales, E., Futer, O., Holmquist, B., Vallee, B.L., Hoog, J.O., Kaiser, R. and Jornvall, H. (1990) Comparison of three classes of human liver alcohol dehydrogenase. Emphasis on different substrate binding pockets. *Eur J Biochem*, **193**, 303-310.
- Eklund, H., Nordstrom, B., Zeppezauer, E., Soderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T., Soderberg, B.O., Tapia, O., Branden, C.I. and Akesson, A. (1976b) Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2-4 A resolution. *J Mol Biol*, **102**, 27-59.

- Eklund, H., Ramaswamy, S., Plapp, B.V., el-Ahmad, M., Danielsson, O., Hoog, J.O. and Jornvall, H. (1994) Crystallographic investigations of alcohol dehydrogenases. *Exs*, **71**, 269-277.
- Eklund, H., Samama, J.P. and Jones, T.A. (1984) Crystallographic investigations of nicotinamide adenine dinucleotide binding to horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*, **23**, 5982-5996.
- Eklund, H., Samma, J.P., Wallen, L., Branden, C.I., Akeson, A. and Jones, T.A. (1981) Structure of a triclinic ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.9 Å resolution. *J Mol Biol*, **146**, 561-587.
- Everse, J. (1973) The specific binding of vitamin A acid to equine liver alcohol dehydrogenase. *Mol Pharmacol*, **9**, 199-208.
- Everse, J. and Kaplan, N.O. (1973) Lactate dehydrogenases: structure and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **37**, 61-133.
- Fan, F., Lorenzen, J.A. and Plapp, B.V. (1991) An aspartate residue in yeast alcohol dehydrogenase I determines the specificity for coenzyme. *Biochemistry*, **30**, 6397-6401.
- Fan, F. and Plapp, B.V. (1995) Substitutions of isoleucine residues at the adenine binding site activate horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*, **34**, 4709-4713.
- Fan, F. and Plapp, B.V. (1999) Probing the affinity and specificity of yeast alcohol dehydrogenase I for coenzymes. *Arch Biochem Biophys*, **367**, 240-249.
- Fersht, A. (1999) Structure and mechanism in protein science. 3rd Ed., *Freeman & Co, Ny*.
- Goffner, D., Van Doorselaere, J., Yahiaoui, N., Samaj, J., Grima-Pettenati, J. and Boudet, A.M. (1998) A novel aromatic alcohol dehydrogenase in higher plants: molecular cloning and expression. *Plant Mol Biol*, **36**, 755-765.
- Grima-Pettenati, J., Feuillet, C., Goffner, D., Borderies, G. and Boudet, A.M. (1993) Molecular cloning and expression of a Eucalyptus gunnii cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Mol Biol*, **21**, 1085-1095.
- Groves JT, B.L. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 5442-5448.
- Groves JT, O.J. (1985) *Inorg. Chem.*, **24**.
- Holbrook, J.J. (1972) Protein fluorescence of lactate dehydrogenase. *Biochem J*, **128**, 921-931.
- Holbrook, J.J. and Wolfe, R.G. (1972) Malate dehydrogenase. X. Fluorescence microtitration studies of D-malate, hydroxymalonate, nicotinamide dinucleotide, and dihydronicotinamide-adenine dinucleotide binding by mitochondrial and supernatant porcine heart enzymes. *Biochemistry*, **11**, 2499-2502.
- Holbrook, J.J., Yates, D.W., Reynolds, S.J., Evans, R.W., Greenwood, C. and Gore, M.G. (1972) Protein fluorescence of nicotinamide nucleotide-dependent dehydrogenases. *Biochem J*, **128**, 933-940.
- Holm, L. and Sander, C. (1996) Alignment of three-dimensional protein structures: network server for database searching. *Methods Enzymol*, **266**, 653-662.
- Hoog, J.O. and Brandt, M. (1995) Mammalian class VI alcohol dehydrogenase. Novel types of the rodent enzymes. *Adv Exp Med Biol*, **372**, 355-364.
- Hurley, T.D., Bosron, W.F., Stone, C.L. and Amzel, L.M. (1994) Structures of three human beta alcohol dehydrogenase variants. Correlations with their functional differences. *J Mol Biol*, **239**, 415-429.
- Ippolito, J.A., Alexander, R.S. and Christianson, D.W. (1990) Hydrogen bond stereochemistry in protein structure and function. *J Mol Biol*, **215**, 457-471.

- Jez, J.M., Flynn, T.G. and Penning, T.M. (1997) A nomenclature system for the aldo-keto reductase superfamily. *Adv Exp Med Biol*, **414**, 579-600.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, **47 (Pt 2)**, 110-119.
- Jornvall, H. (1999) Multiplicity and complexity of SDR and MDR enzymes. *Adv Exp Med Biol*, **463**, 359-364.
- Jornvall, H., Danielsson, O., Eklund, H., Hjelmqvist, L., Hoog, J.O., Pares, X. and Shafqat, J. (1993) Enzyme and isozyme developments within the medium-chain alcohol dehydrogenase family. *Adv Exp Med Biol*, **328**, 533-544.
- Jornvall, H., Danielsson, O., Hjelmqvist, L., Persson, B. and Shafqat, J. (1995a) The alcohol dehydrogenase system. *Adv Exp Med Biol*, **372**, 281-294.
- Jornvall, H. and Hoog, J.O. (1995) Nomenclature of alcohol dehydrogenases. *Alcohol Alcohol*, **30**, 153-161.
- Jornvall, H., Hoog, J.O. and Persson, B. (1999) SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett*, **445**, 261-264.
- Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J. and Ghosh, D. (1995b) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, **34**, 6003-6013.
- Jornvall, H., Shafqat, J. and Persson, B. (2001) Variations and constant patterns in eukaryotic MDR enzymes. Conclusions from novel structures and characterized genomes. *Chem Biol Interact*, **130-132**, 491-498.
- Kim, K.J. and Howard, A.J. (2002) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the trigonal crystal form of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase I: evidence for the existence of Zn ions in the crystal. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**, 1332-1334.
- Korkhin, Y., Kalb, A.J., Peretz, M., Bogin, O., Burstein, Y. and Frolow, F. (1998) NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*. *J Mol Biol*, **278**, 967-981.
- Koshland, D.E., Jr., Nemethy, G. and Filmer, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*, **5**, 365-385.
- Kumar, A., Shen, P.S., Descoteaux, S., Pohl, J., Bailey, G. and Samuelson, J. (1992) Cloning and expression of an NADP(+)-dependent alcohol dehydrogenase gene of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10188-10192.
- Larroy, C., Fernandez, M.R., Gonzalez, E., Pares, X. and Biosca, J.A. (2002a) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. *Biochem J*, **361**, 163-172.
- Larroy, C., Pares, X. and Biosca, J.A. (2002b) Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family. *Eur J Biochem*, **269**, 5738-5745.
- Larroy, C., Rosario Fernandez, M., Gonzalez, E., Pares, X. and Biosca, J.A. (2003) Properties and functional significance of *Saccharomyces cerevisiae* ADHVI. *Chem Biol Interact*, **143-144**, 229-238.
- Lauvergeat, V., Kennedy, K., Feuillet, C., McKie, J.H., Gorrichon, L., Baltas, M., Boudet, A.M., Grima-Pettenati, J. and Douglas, K.T. (1995) Site-directed mutagenesis of a serine residue in cinnamyl alcohol dehydrogenase, a plant

- NADPH-dependent dehydrogenase, affects the specificity for the coenzyme. *Biochemistry*, **34**, 12426-12434.
- Lee, S.L., Wang, M.F., Lee, A.I. and Yin, S.J. (2003) The metabolic role of human ADH3 functioning as ethanol dehydrogenase. *FEBS Lett*, **544**, 143-147.
- Luderitz, T. and Grisebach, H. (1981) Enzymic synthesis of lignin precursors. Comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol:NADP⁺ dehydrogenase from spruce (*Picea abies* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur J Biochem*, **119**, 115-124.
- Luisi, P.L. and Favilla, R. (1972) Mechanistic studies on horse liver alcohol dehydrogenase. The influence of the different premixings on the transient kinetics of aldehyde reductions. *Biochemistry*, **11**, 2303-2310.
- Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, **33**, 491-497.
- Matthews, B.W. and Bernhard, S.A. (1973a) Structure and symmetry of oligomeric enzymes. *Annu Rev Biophys Bioeng*, **2**, 257-317.
- Matthews, B.W. and Bernhard, S.A. (1973b) Structure and symmetry of oligomeric enzymes. *Annu Rev Biophys Bioeng*, **4**, 257-317.
- Mazza, C., Breton, R., Housset, D. and Fontecilla-Camps, J.C. (1998) Unusual charge stabilization of NADP⁺ in 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem*, **273**, 8145-8152.
- McFarland, J.T. and Bernhard, S.A. (1972) Catalytic steps during the single-turnover reduction of aldehydes by alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*, **11**, 1486-1493.
- McKie, J.H., Jaouhari, R., Douglas, K.T., Goffner, D., Feuillet, C., Grima-Pettenati, J., Boudet, A.M., Baltas, M. and Gorrichon, L. (1993) A molecular model for cinnamyl alcohol dehydrogenase, a plant aromatic alcohol dehydrogenase involved in lignification. *Biochim Biophys Acta*, **1202**, 61-69.
- Metzger, M.H. and Hollenberg, C.P. (1995) Amino acid substitutions in the yeast *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase coenzyme-binding domain affect the coenzyme specificity. *Eur J Biochem*, **228**, 50-54.
- Minor, W., Steczko, J., Bolin, J.T., Otwinowski, Z. and Axelrod, B. (1993) Crystallographic determination of the active site iron and its ligands in soybean lipoxygenase L-1. *Biochemistry*, **32**, 6320-6323.
- Monod, J., Wyman, J. and Changeux, J.P. (1965) On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol*, **12**, 88-118.
- Nakanishi, M., Kakumoto, M., Matsuura, K., Deyashiki, Y., Tanaka, N., Nonaka, T., Mitsui, Y. and Hara, A. (1996) Involvement of two basic residues (Lys-17 and Arg-39) of mouse lung carbonyl reductase in NADP(H)-binding and fatty acid activation: site-directed mutagenesis and kinetic analyses. *J Biochem (Tokyo)*, **120**, 257-263.
- Navaza, J. (1994) *Acta Crystallogr A*, **50**, 157-163.
- Niederhut, M.S., Gibbons, B.J., Perez-Miller, S. and Hurley, T.D. (2001) Three-dimensional structures of the three human class I alcohol dehydrogenases. *Protein Sci*, **10**, 697-706.
- Otwinowski, Z. (1993) Oscillation data reduction program. *In Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing.*, 56-62.
- Otwinowski, Z., Minor, W. (1996) *Methods Enzymol*, **276**, 307-326.
- Pares, X., Cederlund, E., Moreno, A., Saubi, N., Hoog, J.O. and Jornvall, H. (1992) Class IV alcohol dehydrogenase (the gastric enzyme). Structural analysis of human sigma sigma-ADH reveals class IV to be variable and confirms the presence of a fifth mammalian alcohol dehydrogenase class. *FEBS Lett*, **303**, 69-72.

- Pares, X., Farres, J., Moreno, A., Saubi, N., Boleda, M.D., Cederlund, E., Hoog, J.O. and Jornvall, H. (1993) Class IV alcohol dehydrogenase: structure and function. *Adv Exp Med Biol*, **328**, 475-480.
- Peralba, J.M., Cederlund, E., Crosas, B., Moreno, A., Julia, P., Martinez, S.E., Persson, B., Farr s, J., Pares, X. and Jornvall, H. (1999) Structural and enzymatic properties of a gastric NADP(H)- dependent and retinal-active alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem*, **274**, 26021-26026.
- Persson, B., Krook, M. and Jornvall, H. (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases. *Adv Exp Med Biol*, **372**, 383-395.
- Persson, B., Nordling, E., Kallberg, Y., Lundh, D., Oppermann, U.C., Marschall, H.U. and Jornvall, H. (1999) Bioinformatics in studies of SDR and MDR enzymes. *Adv Exp Med Biol*, **463**, 373-377.
- Persson, B., Zigler, J.S., Jr. and Jornvall, H. (1994) A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Sub-lines including zeta-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductase enoyl reductases, VAT-1 and other proteins. *Eur J Biochem*, **226**, 15-22.
- Pettersson, G. and Eklund, H. (1987) Electrostatic effects of bound NADH and NAD⁺ on ionizing groups in liver alcohol dehydrogenase. *Eur J Biochem*, **165**, 157-161.
- Pilate, G., Guiney, E., Holt, K., Petit-Conil, M., Lapierre, C., Leple, J.C., Pollet, B., Mila, I., Webster, E.A., Marstorp, H.G., Hopkins, D.W., Jouanin, L., Boerjan, W., Schuch, W., Cornu, D. and Halpin, C. (2002) Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nat Biotechnol*, **20**, 607-612.
- Ramaswamy, S., Eklund, H. and Plapp, B.V. (1994a) Structures of horse liver alcohol dehydrogenase complexed with NAD⁺ and substituted benzyl alcohols. *Biochemistry*, **33**, 5230-5237.
- Ramaswamy, S., el Ahmad, M., Danielsson, O., Jornvall, H. and Eklund, H. (1996) Crystal structure of cod liver class I alcohol dehydrogenase: substrate pocket and structurally variable segments. *Protein Sci*, **5**, 663-671.
- Ramaswamy, S., el-Ahmad, M., Danielsson, O., Jornvall, H. and Eklund, H. (1994b) Crystallisation and crystallographic investigations of cod alcohol dehydrogenase class I and class III enzymes. *FEBS Lett*, **350**, 122-124.
- Read, R.J. (2001) Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 1373-1382.
- Reid, M.F. and Fewson, C.A. (1994) Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microbiol*, **20**, 13-56.
- Reifenberger, E., Boles, E. and Ciriacy, M. (1997) Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur J Biochem*, **245**, 324-333.
- Rosell, A., Valencia, E., Ochoa, W.F., Fita, I., Pares, X. and Farres, J. (2003a) Complete reversal of coenzyme specificity by concerted mutation of three consecutive residues in alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem*, **278**, 40573-40580.
- Rosell, A., Valencia, E., Pares, X., Fita, I., Farres, J. and Ochoa, W.F. (2003b) Crystal structure of the vertebrate NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADH8). *J Mol Biol*, **330**, 75-85.
- Rossmann, M.G., Moras, D. and Olsen, K.W. (1974) Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, **250**, 194-199.

- Sanghani, P.C., Bosron, W.F. and Hurley, T.D. (2002a) Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structural changes associated with ternary complex formation. *Biochemistry*, **41**, 15189-15194.
- Sanghani, P.C., Robinson, H., Bosron, W.F. and Hurley, T.D. (2002b) Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of apo, binary, and inhibitory ternary complexes. *Biochemistry*, **41**, 10778-10786.
- Seydoux, F., Bernhard, S., Pfenninger, O., Payne, M. and Malhotra, O.P. (1973) Preparation and active-site specific properties of sturgeon muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, **12**, 4290-4300.
- Seydoux, F., Malhotra, O.P. and Bernhard, S.A. (1974) Half-site reactivity. *CRC Crit Rev Biochem*, **2**, 227-257.
- Shore, J.D. and Brooks, R.L. (1971) Kinetic evidence for a binary complex isomerization in the liver alcohol dehydrogenase reaction mechanism. *Arch Biochem Biophys*, **147**, 825-827.
- Somssich, I.E., Wernert, P., Kiedrowski, S. and Hahlbrock, K. (1996) Arabidopsis thaliana defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol:NADP(+) oxidoreductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14199-14203.
- Sun, H.W. and Plapp, B.V. (1992) Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family. *J Mol Evol*, **34**, 522-535.
- Svensson, S., Hedberg, J.J. and Hoog, J.O. (1998) Structural and functional divergence of class II alcohol dehydrogenase--cloning and characterisation of rabbit liver isoforms of the enzyme. *Eur J Biochem*, **251**, 236-243.
- Svensson, S., Hoog, J.O., Schneider, G. and Sandalova, T. (2000) Crystal structures of mouse class II alcohol dehydrogenase reveal determinants of substrate specificity and catalytic efficiency. *J Mol Biol*, **302**, 441-453.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Nakanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A. and Mitsui, Y. (1996) Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 Å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family. *Structure*, **4**, 33-45.
- Terwilliger, T.C. (2000) Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56 (Pt 8)**, 965-972.
- Terwilliger, T.C. (2003) SOLVE and RESOLVE: automated structure solution and density modification. *Methods Enzymol*, **374**, 22-37.
- Terwilliger, T.C. and Berendzen, J. (1999a) Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55 (Pt 4)**, 849-861.
- Terwilliger, T.C. and Berendzen, J. (1999b) Discrimination of solvent from protein regions in native Fouriers as a means of evaluating heavy-atom solutions in the MIR and MAD methods. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55 (Pt 2)**, 501-505.
- Theorell, H., Chance, B. and Yonetani, T. (1966) Effect of crystallization upon the reactivity of horse liver alcohol dehydrogenase. *J Mol Biol*, **17**, 513-524.
- Theorell, H., Chance, B. (1951) Studies on liver alcohol dehydrogenase. The kinetics of the compound of horse liver alcohol dehydrogenase and reduced diphosphopyridine nucleotide. *Acta Chem. Scand.*, **5**, 1227.
- Thomazeau, K., Dumas, R., Halgand, F., Forest, E., Douce, R. and Biou, V. (2000) Structure of spinach acetohydroxyacid isomeroreductase complexed with its reaction product dihydroxymethylvalerate, manganese and (phospho)-ADP-ribose. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56 (Pt 4)**, 389-397.

- Tsigelny, I. and Baker, M.E. (1996) Structures important in NAD(P)(H) specificity for mammalian retinol and 11-Cis-retinol dehydrogenases. *Biochem Biophys Res Commun*, **226**, 118-127.
- Valencia, E., Rosell, A., Larroy, C., Farres, J., Biosca, J.A., Fita, I., Pares, X. and Ochoa, W.F. (2003) Crystallization and preliminary X-ray analysis of NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Rana perezi*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **59**, 334-337.
- Vallee, B.L. and Bazzone, T.J. (1983) Isozymes of human liver alcohol dehydrogenase. *Isozymes Curr Top Biol Med Res*, **8**, 219-244.
- Williamson, J.D., Stoop, J.M., Massel, M.O., Conkling, M.A. and Pharr, D.M. (1995) Sequence analysis of a mannitol dehydrogenase cDNA from plants reveals a function for the pathogenesis-related protein ELI3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7148-7152.
- Wratten, C.C. and Cleland, W.W. (1963) Product Inhibition Studies on Yeast and Liver Alcohol Dehydrogenases. *Biochemistry*, **338**, 935-941.
- Wratten, C.C., Cleland, W. W. (1965) Kinetic studies with liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*, **4**, 2442.
- Xie, P., Parsons, S.H., Speckhard, D.C., Bosron, W.F. and Hurley, T.D. (1997) X-ray structure of human class IV sigmasigma alcohol dehydrogenase. Structural basis for substrate specificity. *J Biol Chem*, **272**, 18558-18563.
- Yang, Z.N., Bosron, W.F. and Hurley, T.D. (1997) Structure of human chi chi alcohol dehydrogenase: a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *J Mol Biol*, **265**, 330-343.
- Yang, Z.N., Davis, G.J., Hurley, T.D., Stone, C.L., Li, T.K. and Bosron, W.F. (1994) Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction. *Alcohol Clin Exp Res*, **18**, 587-591.
- Yasunami, M., Chen, C.S. and Yoshida, A. (1991) A human alcohol dehydrogenase gene (ADH6) encoding an additional class of isozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7610-7614.