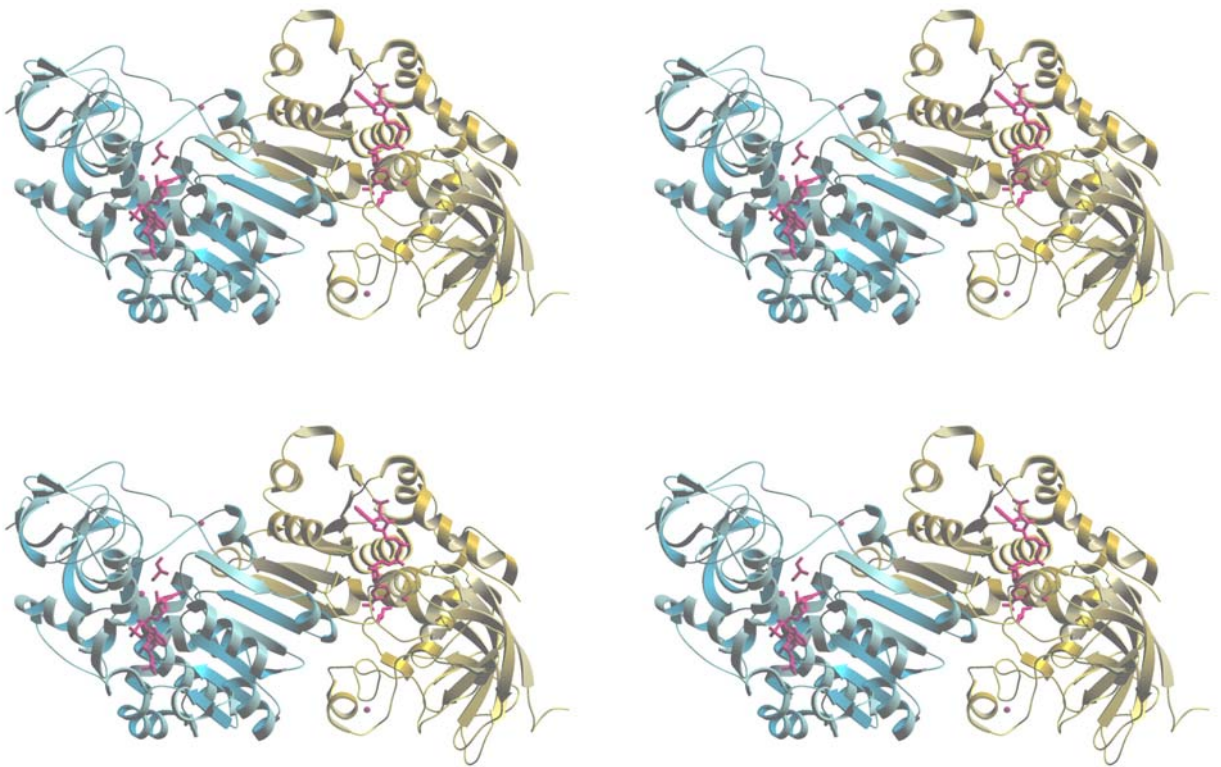




Universitat Autònoma de Barcelona

ESTUDI ESTRUCTURAL I CINÈTIC DE L'ESPECIFICITAT DE COENZIM D'UNA ALCOHOL DESHIDROGENASA D'AMFIBI DEPENDENT DE NADP(H)



Albert Rosell i Febres



Universitat Autònoma de Barcelona.
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Ciències

ESTUDI ESTRUCTURAL I CINÈTIC DE L'ESPECIFICITAT DE COENZIM D'UNA ALCOHOL DESHIDROGENASA D'AMFIBI DEPENDENT DE NADP(H)

Memòria presentada per **Albert Rosell i Febres** per a adquirir el grau de Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular.

Treball realitzat en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció dels Doctors Jaume Farrés i Vicén i Xavier Parés i Casasampera.

Jaume Farrés i Vicén

Xavier Parés i Casasampera

Albert Rosell i Febres

Bellaterra, 29 de març de 2004

AGRAÏMENTS

Han passat ja uns quants anys des de que un un bon dia de l'any 1996, crec, vaig entrar al despatx del Dr. Jaume Farrés per interessar-me sobre la possibilitat de realitzar les *Pràctiques en Indústries, Laboratoris o Centres de Recerca* en el Grup de Recerca que ell mateix codirigeix amb el Dr. Xavier Parés. Doncs bé, el que havia d'haver estat una curta estada en un laboratori s'ha convertit en una no-curta Tesi Doctoral. Durant aquests anys moltes han estat les persones que relacionades o no amb el món de la ciència m'han ajudat de mil i una formes per arribar al final.

En primer lloc agrair als Doctors Jaume Farrés i Xavier Parés el fet d'acceptar-me en el seu Grup de Recerca amb l'únic aval de la meua il.lusió. Gràcies també per les seves orientacions, i per confiar en mi en moments delicats.

Els resultats estructurals de la present Tesi Doctoral han estat fruit de la col.laboració amb el grup de cristal.lografia dirigit pel Dr Ignacio Fita. Tant a l'Ignacio com als seus col.laboradors, Wendy i Eva, els hi agraeixo la seva amabilitat i l'ajut rebut en tot moment.

En qualsevol feina els inicis són difícils, i els consells i la companyia del veterans importants, és precisament aquest fet el que vull agrair als il.lustres veterans dels meu grup: Alberto, Abdellah, Bernat, Susana, amb una menció especial al gran Josep Maria Peralba, t'estaré eternament agraït que un dia provessis l'activitat de l'ADH8 amb NADP. Per altra banda, agrair el suport i les bones estones compartides a companys que durant més o menys temps varen passar pel laboratori: Dámaso, Julia i Luis.

Sílvia-Emma-Ana María, aquest ha estat el trio amb el que he compartit alegries i penes durant més temps en el laboratori. A les tres els hi he d'agrair la seva amistat. Em mullaré una mica més: a la Sílvia agrair-li simplement ser com és, tot un caràcter amb un gran cor; a l'Emma el fet de poder parlar amb ella de pràcticament tot i el ser la persona del món mundial amb més capacitat de sorprendre'm; a l'Ana María el seu bon humor etern i una capacitat de sacrifici envejable.

Què dir de les noves generacions del laboratori. Varen començar sent tres companys nous, *y sólo con tres mutaciones*, han acabat sent tres nous amics (que maco m'ha quedat...). En Sergi, agrair-li l'energia encomanadissa que desprèn i el ser un tertulià incansable (el Jiménez Losantos català...); l'Oriol, el *trotamundos* aventurer del

grup, agrair-li la seva habilitat per transmetre il·lusió per pràcticament tot; i en Xavi, un gran Sant Andreuenc i millor persona, agrair-li la predisposició per ajudar, en especial en la multitud de problemes informàtics que jo solet sóc capaç de generar...Per últim, el darrer fitxatge, l'Esther, gràcies per la teva paciència durant les constants invasions de la teva taula. Voldria estendre el meu agraïment a la resta de companys de la Unitat, en especial a les integrants del laboratori llevats-plantas, que a part de ser el laboratori més femení de la Unitat són la cara amable de la ciència, sempre disposades a donar un cop de mà en el que fagi falta: Chari, Carol, Eva, Hakima, Maykelis, Trini, Núria. Agrair també l'eficiència i la "tendresa" en el tracte d'en Salva, i l'amabilitat i bon rotllo de l'Elena.

Molts han estat els dinars que durant aquest anys he compartit amb els *bitxòlegs*, Silvina i Cesc. A ells el hi he d'agrair la seva amicitat i unes "curtes" sobretaulas, on crec que hem parlat de pràcticament tot. Estic agraït també als amics de tota la vida, que sense entendre res del que feia, sempre m'han brindat el seu suport: Xevi, Mònica, Montse, Miquel, Albert i Òscar.

Durant tot aquest temps no tot ha estat fàcil, però he tingut la sort de tenir al meu costat a la Marienza, que amb els seus consells i el seu amor ha fet que tot plegat fós menys difícil.

Per últim, agrair als meus pares, a la meva àvia i al meu germà, la confiança i l'estima que m'han brindat durant tot aquest temps, condicions indispensables per a l'èxit.

ÍNDEX

Agraïments	i
Índex	iii
Índex de taules i figures	vii
Abreviatures	xi
PRESENTACIÓ	xiii
INTRODUCCIÓ GENERAL	1
1. EL SISTEMA ALCOHOL DESHIDROGENASA DE VERTEBRATS	3
1.1 Les deshidrogenases/reductases de cadena mitjana	3
1.2 La família alcohol deshidrogenasa	4
1.3 El sistema alcohol deshidrogenasa en vertebrats	4
1.3.1 ADH1	5
1.3.2 ADH2	6
1.3.3 ADH3	7
1.3.4 ADH4	8
1.3.5 ADH5 i ADH7	10
1.3.6 ADH8	12
2. L'ADH I EL METABOLISME DE RETINOIDES	14
2.1 Propietats dels retinoides	14
2.2 Incorporació del retinol a l'organisme	15
2.3 Emmagatzemament i mobilització del retinol	15
2.4 Activació del retinol. Síntesi de l'àcid retinoic	16
2.4.1 Enzims implicats en l'etapa d'oxidació del retinol	16
2.4.1.1 Alcohol deshidrogenasa	16
2.4.1.2 Deshidrogenases/reductases de cadena curta (SDR)	18
2.4.2 Enzims implicats en l'etapa d'oxidació del retinal	18
2.5 Mecanisme d'acció de l'àcid retinoic	18
3. ESTRUCTURA DE L'ADH. MECANISME CINÈTIC I CATÀLISI	20
3.1 Arquitectura general de l'alcohol deshidrogenasa	20
3.2 Canvi conformacional i mecanisme cinètic	22
3.3 Butxaca d'unió del substrat	25
3.4 Catàlisi	26
4. ESPECIFICITAT DE COENZIM EN L'ALCOHOL DESHIDROGENASA	27
4.1 Residus involucrats en la interacció amb el pirofosfat	29
4.2 Residus involucrats en la unió de l'adenosina	30

OBJECTIUS	35
------------------------	-----------

CAPÍTOL I

RESOLUCIÓ DE L'ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE L'ADH8

INTRODUCCIÓ	41
--------------------------	-----------

MATERIALS I MÈTODES	45
----------------------------------	-----------

1. CLONATGE DEL cDNA D'ADH8 EN EL VECTOR D'EXPRESSIONI pGEX 4T-2	47
---	-----------

1.1 Obtenció del plasmidi pBluescript-ADH8	47
---	-----------

1.2 Amplificació del cDNA de l'ADH8	47
--	-----------

1.3 Preparació de cèl.lules BL21 competents. Transformació amb el plasmidi pGEX-ADH8	48
--	-----------

1.4 Anàlisi dels transformants i selecció dels clons	49
---	-----------

2. EXPRESSIONI HETERÒLOGA I PURIFICACIÓ DE L'ADH8	49
--	-----------

2.1 Preparació del medi de cultiu	50
--	-----------

2.2 Expressió	50
----------------------------	-----------

2.3 Resuspensió i lisi cel.lular	51
---	-----------

2.4 Purificació de l'ADH8	51
--	-----------

3. ASSAJOS ENZIMÀTICS	53
------------------------------------	-----------

3.1 Mesura de l'activitat ADH	53
--	-----------

3.2 Determinació de les constants cinètiques per al glicerol	53
---	-----------

3.3 Inhibició de l'activitat etanol deshidrogenasa amb glicerol	54
--	-----------

RESULTATS I DISCUSSIÓ	55
------------------------------------	-----------

1. EXPRESSIONI I PURIFICACIÓ DE L'ADH8	57
---	-----------

2. ESTRUCTURA GENERAL DE L'ADH8	58
--	-----------

3. CANVI CONFORMACIONAL	62
--------------------------------------	-----------

4. SISTEMA DE TRANSMISSIÓ DEL PROTÓ	64
--	-----------

5. BUTXACA D'UNIÓ DEL SUBSTRAT	66
---	-----------

6. BUTXACA D'UNIÓ DEL COENZIM	69
--	-----------

6.1 Implicacions estructurals en els valors de kcat de l'ADH8.....	70
---	-----------

6.2 Determinants estructurals de l'especificitat de coenzim de l'ADH8	71
--	-----------

CAPÍTOL II: REVERSIÓ DE L'ESPECIFICITAT DE COENZIM DE L'ADH8

INTRODUCCIÓ	79
MATERIALS I MÈTODES	83
1. MUTAGÈNESI DIRIGIDA PER PCR	85
1.1 Generació de les mutacions G223D, T224I, H225N i T224I/H225N	85
1.1.2 Obtenció de DNA del plasmidi pGEX-ADH8	85
1.1.3 Incorporació de les mutacions	85
1.1.4 Clonatge dels cDNAs mutants	88
1.2 Generació de les mutacions G223D/T224I i G223D/T224I/H225N	88
1.2.1 Obtenció de DNA dels plasmidis pGEX-G223D i pGEX- T224I/H225N	88
1.2.2 Incorporació de les mutacions	89
1.3 Verificació de les mutacions	89
2. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES MUTANTS	90
3. ASSAJOS ENZIMÀTICS	91
3.1 Mesura de l'activitat estàndard dels enzims mutants	91
3.2 Determinació de les constants cinètiques per als coenzims, de l'ADH8 recombinant i enzims mutants	92
3.3 Determinació de la constant de dissociació del coenzim. Cinètiques bisubstrat	92
3.4 Efecte isotòpic	92
4. MODELATGE MOLECULAR	93
RESULTATS	95
1. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE LES ADH8 MUTANTS	97
2. CARACTERITZACIÓ CINÈTICA DE L'ENZIM SILVESTRE I DELS MUTANTS	99
2.1 Caracterització cinètica de l'ADH8 silvestre recombinant	99
2.2 Caracterització cinètica dels enzims mutants	100
2.2.1 Mutants G223D, T224I i H225N	100
2.2.2 Mutants T224I/H225N i G223D/T224I	101
2.2.3 Mutant G223D/T224I/H225N	101
3. CINÈTIQUES BISUBSTRAT	106
4. EFECTE ISOTÒPIC	106

5. MODELATGE MOLECULAR	109
DISCUSSIÓ	113
1. ESTUDI DEL PAS LIMITANT DE LES REACCIONS CATALITZADES PER ADH8	115
1.1 Efecte de les diferents mutacions en el pas limitant.....	116
2. IMPORTÀNCIA DE GLY223, THR224 I HIS225 EN L'ESPECIFICITAT DE COENZIM DE L'ADH8	117
2.1 El residu 223 no és l'únic residu determinant en l'especificitat de coenzim	117
2.2 La reversió completa de l'especificitat de coenzim només es produeix en el triple mutant.....	118
2.3 Efectes sinèrgics entre residus adjacents determinen l'especificitat de coenzim	120
2.4 Consideracions evolutives	121
CONCLUSIONS GENERALS	123
BIBLIOGRAFIA	127
ANNEX.	
ARTICLES PUBLICATS COM A RESULTAT D'AQUESTA TESI.....	143
ARTICLE I	
Valencia, E., Rosell, A., Larroy, C., Farrés, J., Biosca, J.A., Fita, I., Parés, X. i Ochoa, W.F. (2003) Crystallization and preliminary X-ray analysis of NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenases from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Rana perezi</i> . <i>Acta Crystallogr Sect. D</i> , 59 , 334-337.	
ARTICLE II	
Rosell, A., Valencia, E., Parés, X., Fita, I., Farrés, J. i Ochoa, W.F. (2003) Crystal structure of the vertebrate NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADH8). <i>J. Mol. Biol.</i> 330 , 75-85.	
ARTICLE III	
Rosell, A., Valencia, E., Ochoa, W.F., Fita, I., Parés, X. i Farrés, J. (2003) Complete reversal of coenzyme specificity by concerted mutation of three consecutive residues in alcohol dehydrogenase. <i>J. Biol. Chem.</i> 278 , 40573-4080.	

ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

TAULES

1. Les famíles enzimàtiques de les MDR	3
2. El sistema ADH en vertebrats	5
3. Substrats fisiològics de l'alcohol deshidrogenasa	9
4. Distribució de les subfamílies ADH d'animals (ADH1-ADH8) i FADH (ADH3).....	11
5. Constants cinètiques de l'ADH8 a pH 7,5.....	13
6. Eficiències catalítiques de diferents ADHs amb retinoides.....	17
7. Algunes estructures resoltes d'alcohols deshidrogenases de vertebrats.....	21
8. Especificitat de coenzim en les MDR. Seqüència de les zones implicades	31
9. Ponts d'hidrogen realitzats pel coenzim en ADHs dependents de NAD(H).....	32
10. Purificació de l'ADH8 recombinant.....	57
11. Residus implicats en la via de transmissió del protó en diferents MDR.....	65
12. Ponts d'hidrogen realitzats pel coenzim en ADH8 en comparació amb ADHs dependents de NAD(H)	73
13. Purificació dels diferents enzims mutants recombinants.....	98
14. Constants cinètiques de l'ADH8 silvestre i dels enzims mutants amb NADP ⁺ i NAD ⁺ a pH 10.....	102
15. Constants cinètiques de l'ADH8 silvestre i dels enzims mutants amb NADP ⁺ i NAD ⁺ a pH 7,5.....	103
16. Constants cinètiques de l'ADH8 silvestre i dels enzims mutants amb NADPH i NADH a pH 7,5	104
17. Cinètiques bisubstrat de l'ADH8 silvestre i dels enzims mutants amb NADP ⁺ i NAD ⁺ a pH 10.....	107

18. Efecte isotòpic en l'ADH8 silvestre i en els enzims mutants amb NADP ⁺ i NAD ⁺ a pH 10	108
19. Constants cinètiques d'ADHs per al NAD ⁺ a pH 7,5.....	119

FIGURES

1. Estructura dels principals isòmers de retinoides	14
2. Esquema de la via metabòlica dels retinoides	19
3. Estructura tridimensional de l'ADH1 humana	22
4. Representació del canvi conformacional de l'alcohol deshidrogenasa	23
5. Mecanisme cinètic seqüencial ordenat bi bi de les alcohol deshidrogenases.....	24
6. Estructures del NADP(H) i del NAD(H).....	27
7. Esquema de les estructures secundàries del domini d'unió al coenzim de l'ADH1 de cavall.....	28
8. Estructura del vector pGEX-4T-2.....	50
9. Anàlisi de les fraccions obtingudes durant la purificació de l'ADH8 recombinant	57
10. Fotografia dels cristalls de l'ADH8.....	58
11. Estructura general de l'ADH8	59
12. Estereodiagrames del centre actiu de l'apoenzima d'ADH8 i del complex ADH8-NADP ⁺	61
13. Butxaca d'unió del coenzim en l'apoenzima	63
14. Estereodiagrames dels models resultants de la simulació de la interacció del tot- <i>trans</i> -retinol, 9- <i>cis</i> -retinol i 13- <i>cis</i> -retinol amb la butxaca d'unió del substrat	68
15. Representació estereoscòpica de la butxaca d'unió del NADP(H)	69
16. Superposició de les molècules de NADP ⁺ i NAD ⁺ , tal i com es troben en les estructures dels complexos ADH8-NADP ⁺ i ADH1B1-NAD ⁺	70
17. Representació amb el programa LIGPLOT de les interaccions del NADP ⁺ amb la butxaca d'unió del coenzim, observades en el complex ADH8-NADP ⁺	72

18. Diferents estratègies d'unió del NADP(H) en enzims MDR	76
19. Primera etapa de mutagènesi mitjançant PCR.....	86
20. Etapa final de mutagènesi mitjançant PCR	87
21. Anàlisi de les fraccions obtingudes durant la purificació de les ADH8 mutants	97
22. Eficiències catalítiques de l'enzim silvestre i dels mutants per a les reaccions de reducció , i oxidació a pH 10 i pH 7,5, utilitzant NADP(H) i NAD(H) com a coenzims	105
23. Representació del complex binari ADH8-NADP ⁺ i de les simulacions d'interacció del NADP ⁺ amb els mutants G223D, T224I, H225N, H225N/T224I i G223D/T224I/H225N.....	110
24. Representació estereoscòpica del complex binari ADH8-NAD ⁺ i del complex del mutant G223D/T224I/H225N amb NAD ⁺	111
25. Grau d'especificitat de coenzim de l'ADH8 silvestre i dels mutants.....	119

ABREVIATURES

ADH	Alcohol deshidrogenasa.
ALDH	Aldehid deshidrogenasa.
AR	Àcid retinoic.
BADH	Benzil alcohol deshidrogenasa.
BSA	Albúmina de sèrum boví.
CAD	Cinamil alcohol deshidrogenasa.
cDNA	Àcid desoxiribonucleic complementari.
CRBP-II	Proteïna cel.lular unidora de retinol del tipus II.
DNA	Àcid desoxiribonucleic.
DTT	Ditiotreitol.
EC	Comissió d'enzims.
ER	Enoil reductasa.
FALDH	Formaldehid deshidrogenasa dependent de glutatió.
GST	Glutatió S-transferasa.
HNL	Hidroxinitril liasa.
Ka	Constant de Michaelis-Menten per al coenzim.
Kb	Constant de Michaelis-Menten per al substrat.
kcat	Constant catalítica.
kcat/Km	Eficiència catalítica.
Ki	Constant d'inhibició.
Kia	Constant de dissociació del coenzim.
Km	Constant de Michaelis-Menten.
LDH	Leucotriè deshidrogenasa.
LRAT	Lecitina-retinol aciltransferasa.
MDR	Deshidrogenases/reductases de cadena mitjana.
NAD(H)	Dinucleòtid de nicotinamida-adenina (forma reduïda).
NADP(H)	Dinucleòtid fosfat de nicotinamida-adenina (forma reduïda).
P450	Citocrom P450.
pb	Parell de bases.
PBS	Tampó fosfat salí.
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa.
PDH	Poliol deshidrogenasa.
QOR	Quinona oxidoreductasa.
RAR	Receptor d'àcid retinoic.
RARE	Element de resposta a l'àcid retinoic.
RBP	Proteïna unidora de retinol.
REH	Hidrolasa d'èsters de retinol.
RMSD	<i>Root mean square deviation.</i>
RNA	Àcid ribonucleic.
RXR	Receptor X de retinoide.
SDR	Deshidrogenases/reductases de cadena curta.
SDS	Dodecil sulfat sòdic.
TDH	Treonina deshidrogenasa.
TTR	Transtiretina.
U	Unitat internacional d'activitat enzimàtica.
Y-ADH	Alcohol deshidrogenasa de llevat.

PRESENTACIÓ

La cerca i la caracterització de diferents formes d'alcohol deshidrogenasa (ADH) en vertebrats va dur el nostre grup de recerca a la identificació d'un enzim present en la mucosa digestiva de l'amfibi *Rana perezi*. Aquest enzim mostrava analogies estructurals i funcionals amb la classe ADH4 de mamífer, pel que se l'anomenà inicialment ADH4-like. La seva caracterització cinètica revelà un resultat sorprenent: es tractava d'una ADH dependent de NADP(H), una especificitat de coenzim fins aleshores inèdita entre les ADHs de vertebrat. Aquesta propietat suggeria que aquest enzim podria constituir una nova classe (ADH8) en vertebrats. La informació aportada per la present Tesi recolça aquesta classificació, pel que la nomenclatura d'ADH8 serà la utilitzada en aquesta memòria. Per altra banda, la caracterització de l'ADH8 mostrarà unes molt bones eficiències catalítiques per a diferents isòmers de retinoides, en especial pel tot-*trans*-retinal (Peralba i col., 1999a).

La present Tesi Doctoral es va iniciar amb la clonació del cDNA de l'ADH8, amb l'objectiu de dur a terme la seva expressió heteròloga. L'optimització dels processos d'expressió i purificació, van permetre obtenir quantitat suficient de proteïna altament purificada. En col.laboració amb el grup *Estructura tridimensional de proteïnes implicades en processos patològics* del CSIC, dirigit pel Dr. Ignacio Fita, es va resoldre l'estructura tridimensional de l'enzim. Aquest resultat aportà informació sobre les bases estructurals de l'especificitat de coenzim de l'ADH8. Per altra banda, es va utilitzar aquesta estructura per fer simulacions d'interacció amb diferents isòmers de retinoides.

La determinació de l'estructura primària de l'ADH8 (Peralba i col., 1999a) va permetre observar que aquest enzim presentava, en la zona d'unió de l'adenosina, la substitució de tres residus molt conservats en alcohol dehidrogenases dependents de NAD(H) (Asp223, Leu224 i Asn225) per Gly223, Thr224 i His225. Per abordar l'estudi de la importància, en ADH8, d'aquests residus en la discriminació entre el NADP(H) i el NAD(H), es van generar, mitjançant mutagènesi dirigida per PCR, els mutants G223D, T224I, H225N, T224I/H225N, G223D/T224I i G223D/T224I/H225N. Tots varen ser clonats en el mateix vector d'expressió que el cDNA silvestre, expressats i purificats. Es van determinar les constants cinètiques per a NADP(H) i NAD(H), tant per a l'enzim silvestre recombinant com per als diferents mutants.

Aprofitant l'estructura tridimensional resolta de l'ADH8, es van generar els models moleculars dels diferents mutants. Aquests van ser utilitzats per fer simulacions d'interacció amb NADP^+ i NAD^+ , complementant-se d'aquesta manera els resultats cinètics.

INTRODUCCIÓ GENERAL

1 EL SISTEMA ALCOHOL DESHIDROGENASA DE VERTEBRATS

1.1 LES DESHIDROGENASES/REDUCTASES DE CADENA MITJANA

L'activitat alcohol deshidrogenasa dependent de NAD(P) es troba àmpliament representada a la natura. La presenten enzims que pertanyen a tres superfamílies estructuralment diferents: les alcohol deshidrogenases dependents de Fe, les deshidrogenases/reductases de cadena curta (SDR), i les deshidrogenases/reductases de cadena mitjana (MDR). Les MDR conformen una superfamília enzimàtica, els integrants de la qual intervenen en la conversió reversible dels alcohols als respectius aldehids i cetones. Fins el moment, unes 1000 seqüències dels bancs de dades han estat identificades com a MDR (Jörnvall, 1999; Jörnvall i col., 1999; Jörnvall i col., 2001; Riveros-Rosas i col., 2003). Són proteïnes formades per subunitats d'uns 350 residus que presenten, en molts casos, un o dos àtoms de zinc per monòmer. L'especificitat de coenzim, NAD(H) i/o NADP(H), difereix entre les diferents famílies que conformen les MDR (Taula 1).

Taula 1. Les famílies enzimàtiques de les MDR.

Família	Nombre d'àtoms de Zn	Coenzim
Poliol deshidrogenases (PDH)	1 o 2	NAD(H)/NADP(H)
Alcohol deshidrogenases (ADH)	2	NAD(H)/NADP(H)
Cinamil alcohol deshidrogenases (CAD)	2	NAD(H)/ NADP(H)
Alcohol deshidrogenases de llevat (Y-ADH)	2	NAD(H)
Quinona oxidoreductases (QOR)	-	NAD(H)/ NADP(H)
Leucotriè deshidrogenases (LDH)	-	NAD(H)/ NADP(H)
Enoil reductases (ER)	-	NADP(H)

La informació d'aquesta taula ha estat extreta de Nordling i col., 2002. En negreta es mostra el coenzim majoritàriament utilitzat. – No presenten Zn.

1.2 LA FAMÍLIA ALCOHOL DESHIDROGENASA

La família alcohol deshidrogenasa (ADH) es troba representada en eucariotes per 4 subfamílies: ADH d'animals, ADH de plantes, formaldehid deshidrogenases dependents de glutatió (FADH), i hidroxinitril liases (HNL). Els integrants d'aquestes diferents subfamílies són homodímers, presenten localització citoplasmàtica, i utilitzen preferentment NAD(H) com a coenzim. Les subfamílies ADH d'animals (EC 1.1.1.1) i FADH (EC 1.2.1.1) són les úniques presents en vertebrats, i conformen les 6 classes en les que es troba organitzat el sistema ADH en aquests organismes (Taula 2).

1.3 EL SISTEMA ALCOHOL DESHIDROGENASA EN VERTEBRATS

El sistema ADH en vertebrats comprèn diferents classes enzimàtiques, originades al llarg de l'evolució per duplicacions gèniques a partir d'un gen ancestral comú (Jörnvall i col., 1993). La classificació de les diferents ADH en classes es basa en l'especificitat de substrat i propietats cinètiques, sensibilitat a l'inhibidor pirazole i als seus derivats, mobilitat electroforètica en gels de midó, patró d'expressió, i sobretot, identitat de seqüència i anàlisi filogenètica (Vallee i Bazzone, 1983; Jörnvall i Höög, 1995; Duester i col., 1999; Edenberg, 2000). Fins el moment, 6 classes d'ADHs dependents de NAD(H) (ADH1-ADH7), i una possible classe dependent de NADP(H) (ADH8) han estat identificades en vertebrats, de les que ADH1, ADH2, ADH3, ADH4 i ADH5 estan presents en humans. La identitat seqüencial entre les classes d'ADH presents en una mateixa espècie és del 50-70%, mentre que entre enzims d'una mateixa classe de diferents organismes, aniria del 70 al 90 % aproximadament. La complexitat del sistema ADH i la gran quantitat de substrats endògens i exògens que aquests enzims són capaços d'oxidar i de reduir, suggereix la seva implicació en nombrosos processos fisiològics, tals com el metabolisme de l'etanol, diferents vies de desintoxicació o el metabolisme de retinoides (Taula 3).

Taula 2. El sistema ADH en vertebrats.

Superfamília	Família	Subfamília	Classe	Coenzim
MDR	ADH	FADH	ADH3	NAD(H)
		ADH animals	ADH1	NAD(H)
			ADH2	NAD(H)
			ADH4	NAD(H)
			ADH5	NAD(H)
			ADH7	NAD(H)
			ADH8	NADP(H)

La informació d'aquesta taula ha estat extreta de Riveros-Rosas i col., 2003.

1.3.1 ADH1

Els enzims d'aquesta classe es caracteritzen per presentar una distribució marcadament hepàtica, arribant a representar l'1% de la fracció proteica citosòlica del fetge, tenir activitat etanol deshidrogenasa, i ser altament sensibles a la inhibició amb pirazole i derivats (Fries i col., 1979; Tolf i col., 1982). Presenten una àmplia especificitat de substrat, són actius amb alcohols alifàtics primaris i secundaris, i amb alcohols cíclics i aromàtics (von Wartburg i col., 1964; Blair i Vallee, 1966; Pietruszko i col., 1973; Pietruszko, 1979).

En humans, aquests enzims són importants en el metabolisme hepàtic de l'etanol (Crabb i col., 1987). Altres substrats amb rellevància fisiològica són els àcids biliars (Marschall i col., 2000), compostos intermediaris del metabolisme de la dopamina (Mårdh i Vallee, 1986), noradrenalina (Mårdh i col., 1985) i serotonina (Consalvi i col., 1986), ω -hidroxiàcids grassos (Wagner i col., 1983), esteroides (Frey i Valee, 1980; McEvily i col., 1988) i retinoides (Yang i col., 1994). L'ADH1 humana està codificada per tres gens (*ADH1A*, *ADH1B* i *ADH1C*) que expressen les subunitats α , β , i γ , respectivament. Tot i que aquestes subunitats mostren una identitat de seqüència molt elevada (93-94%), que fa possible la formació d'heterodímers, els homodímers exhibeixen característiques cinètiques diferenciades. A més, *ADH1B* i *ADH1C* presenten al·lèlomorfisme. Així, els al·lèls *ADH1B1*, *ADH1B2* i *ADH1B3* codifiquen les subunitats

$\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 3$, i els al·lels *ADH1C1* i *ADH1C2* les subunitats $\gamma 1$ i $\gamma 2$, respectivament. Tant *ADH1B2* com *ADH1B3* presenten una única substitució respecte *ADH1B1*, que

correspon a un residu involucrat en la unió del pirofosfat del coenzim: Arg47His i Arg369Cys, respectivament. Aquestes mutacions augmentarien la velocitat de dissociació del NAD(H), explicant els valors més alts de *k_{cat}* amb etanol pels isoenzims $\beta 2\beta 2$ i $\beta 3\beta 3$ respecte $\beta 1\beta 1$ (Bosron i col., 1985a). Aquestes diferències cinètiques podrien tenir conseqüències en el metabolisme de l'etanol, potser incidint en la velocitat amb què aquest és oxidat a acetaldehid. En poblacions europees, s'ha correlacionat la presència de l'al·lel *ADH1B2* amb una disminució en el risc a esdevenir alcohòlic (Borràs i col., 2000). Una major i més duradora concentració d'acetaldehid en els teixits, generada pels isoenzims més actius, resultaria en una simptomatologia d'aversiò al consum d'alcohol.

ADH1 ha estat detectada en mamífers, aus, rèptils, amfibis i peixos teleostis (Taula 4). L'ADH1 de peixos teleostis presenta característiques cinètiques pròpies d'aquesta classe, però estructuralment és més similar a l'ADH3 (Danielsson i col., 1992). És en aquests animals on s'hauria produït la duplicació gènica responsable de l'aparició d'ADH1, a partir d'ADH3, una forma més ancestral.

1.3.2 ADH2

Es localitza, com ADH1, fonamentalment en el fetge (Ditlow i col., 1984; Svensson i col., 1999). Oxida eficientment tant alcohols primaris alifàtics de cadena llarga com alcohols aromàtics (Ditlow i col., 1984). En humans, ADH2 té una contribució considerable en el metabolisme hepàtic de l'etanol quan aquest compost es troba a les concentracions que s'assoleixen durant una intoxicació alcohòlica greu (50-100 mM), arribant a representar fins al 40 % d'aquest metabolisme (Li i col., 1977). Per altra banda, ADH2 presenta activitat amb intermediaris del metabolisme de la noradrenalina i de la serotonina, suggerint-se la seva participació en la via de degradació d'aquest compost en el fetge (Consalvi i col., 1986; Mårdh i col., 1986), i amb retinoides (Yang i col., 1994; Han i col., 1998; Popescu i Napoli, 2000). A diferència d'ADH1, ADH2 és inactiva amb esteroides (McEvily i col., 1988).

ADH2 només ha estat detectada en mamífers i aus (Taula 4). L'ADH2 caracteritzada en aus presenta propietats cinètiques que s'ajusten a ADH1, però la seva estructura primària mostra una major identitat seqüencial amb l'ADH2 humana (Hjelmqvist i col., 1995a).

1.3.3 ADH3

ADH3 es caracteritza per presentar activitat formaldehid deshidrogenasa dependent de glutatió (FALDH), ser pràcticament insensible a la inhibició amb 4-metilpirazole, no saturar-se amb alcohols o aldehids primaris de cadena curta, i presentar una distribució tissular ubíqua. Aquest enzim metabolitza el S-hidroximetilglutatió, un adducte que es forma espontàniament entre el glutatió i el formaldehid (Koivusalo i col., 1989). El formaldehid és un compost d'elevada toxicitat produït endògenament en vies que inclouen desmetilació, com la degradació de l'adrenalina (Yu i col., 1997) o la peroxidació lipídica (Bagchi i col., 1993). Malgrat que ADH3 és un enzim fonamentalment citosòlic, estudis immunocitoquímics han demostrat la seva presència també en el nucli d'hepatòcits i astròcits de rata, on estaria associada a la cromatina (Iborra i col., 1992), i en el nucli de *Saccharomyces cerevisiae* (Fernández i col., 2003). Aquest fet reforçaria el seu paper en la protecció de les estructures cel·lulars enfront el formaldehid. Altres possibles substrats de rellevància fisiològica són els ω -hidroxiàcids grassos (Julià i col., 1987), 20-hidroxi-leucotrié B₄, un intermediari dels processos inflamatoris (Gotoh i col., 1990), retinoides (Molotkov i col., 2002), i S-nitrosoglutatió (Jensen i col., 1998), el que suggereix un paper en la protecció davant l'estrès nitrosatiu.

ADH3 és un enzim present a la majoria d'organismes, des de bacteris fins els humans, malgrat que sembla absent en bacteris gram positius i arqueobacteris (Taula 4). Aquesta classe presenta un elevat grau de conservació al llarg de l'evolució, mostrant només un 26 % de diferències entre les seqüències d'aminoàcids de l'enzim de pop (*Octopus vulgaris*) i humana (Kaiser i col., 1993), i un 30 % de diferències entre ADH3 de *Drosophila melanogaster* i humana (Danielsson i col., 1994). L'àmplia distribució d'ADH3, el seu elevat grau de conservació i la seva expressió tissular ubíqua, en suggereixen un origen molt antic (és considerada l'ancestre comú de les restants classes), així com un paper crucial en els éssers vius.

1.3.4 ADH4

ADH4, juntament amb la possible nova classe ADH8, és l'única que no s'expressa en el fetge. Es troba distribuïda majoritàriament en mucoses i epitelis, essent més abundant en la mucosa dels tractes gastrointestinal, respiratori i genitourinari, així com en teixits oculars, pell i glàndula adrenal (Julià i col., 1986; Deltour i col., 1997; Haselbeck i Duester, 1997; Haselbeck i col., 1997a, 1997b). Ha estat demostrada també la seva expressió durant el desenvolupament embrionari de ratolí, en l'etapa de gastrulació (Ang i col., 1996).

La caracterització cinètica d'ADH4 va revelar un enzim d'elevada constant catalítica (kcat) amb alcohols i aldehids primaris i aromàtics, essent molt actiu en l'oxidació de l'etanol (Moreno i Parés, 1991; Boleda i col., 1993; Stone i col., 1993). Les seves constants d'inhibició per al pirazole i 4-metilpirazole presenten valors intermedis entre els d'ADH1 i ADH2. En humans, la seva distribució en el tracte digestiu superior, i una Km per a l'etanol de 40 mM a pH 7,5, suggereixen que l'enzim pot ser, en part, responsable del metabolisme de primer pas de l'etanol o *first pass metabolism*, el qual representa una petita proporció respecte el metabolisme hepàtic de l'etanol. Altres substrats d'interès fisiològic són aldehids derivats de la peroxidació lipídica, ω -hidroxiàcids grassos i retinoides (Boleda i col., 1993; Allali-Hassani i col., 1998, Crosas i col., 2000). Aquest enzim, com ADH2, no presenta activitat amb esteroides (Kedishvili i col., 1998). Fins el moment, ADH4 només ha estat detectada en mamífers (Julià i col., 1983; Moreno i col., 1991; Algar i col., 1992; Taula 4).

Taula 3. Substrats fisiològics de l'alcohol deshidrogenasa.

Substrat	ADH	Via metabòlica o procés
Etanol i alcohols alifàtics	ADH1, ADH2, ADH4	Metabolisme etanol ¹ Desintoxicació ^{2,3}
Retinoides	ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH7, ADH8	Metabolisme retinoides ^{4,5,6,7,8}
Aldehids derivats de la peroxidació lipídica	ADH1, ADH4, ADH8	Peroxidació lipídica ^{4,7,9}
Productes del metabolisme d'amines biògenes	ADH1, ADH2	Metabolisme catecolamines i serotonina ^{10,11,12,13}
ω -Hidroxiàcids	ADH1, ADH3, ADH4	Oxidació àcids grassos ^{7,14,15,16}
Esteroides	ADH1, ADH7	Metabolisme hormonal ¹⁴ Metabolisme colesterol ¹⁷ Metabolisme esterols cardíacs ¹⁸ Epimerització àcids biliars ^{6,19,20,21}
S-Hidroximetilglutació	ADH3	Eliminació formaldehid ²²

¹ Crabb i col., 1987; ² Boleda i col., 1989; ³ Moreno i Parés., 1991; ⁴ Boleda i col., 1993; ⁵ Yang i col., 1994; ⁶ Kedishvili i col., 1997; ⁷ Allali-Hassani i col., 1998; ⁸ Peralba i col., 1999a; ⁹ Sellin i col., 1991; ¹⁰ Mårdh i col., 1985; ¹¹ Mårdh i Vallee, 1986; ¹² Mårdh i col., 1986; ¹³ Consalvi i col., 1986; ¹⁴ Bjorkhem i col., 1973; ¹⁵ Ditlow i col., 1984; ¹⁶ Wagner i col., 1984; ¹⁷ Cronholm i col., 1975; ¹⁸ Frey i Vallee, 1980; ¹⁹ Pietruszko, 1982; ²⁰ McEvily i col., 1988; ²¹ Marschall i col., 2000; ²² Koivusalo i col., 1989.

1.3.5 ADH5 i ADH7

Són les classes de les que actualment es disposa de menys informació. ADH5 només ha estat detectada a nivell de mRNA en humans i rosegadors, localitzant-se fonamentalment en el fetge, estómac i intestí prim (Yasunami i col., 1991; Estonius i col., 1996; Stromberg i Hoog, 2000). La caracterització cinètica de l'enzim expressat heteròlogament mostrà que presenta activitat amb etanol, i sensibilitat a la inhibició amb 4-metilpirazole (Chen i Yoshida, 1991). Estudis de tinció per activitat han demostrat que ADH5 presentaria una àmplia especificitat de substrat (Zheng i col., 1993).

ADH7 únicament ha estat trobada, a nivell de mRNA, en aus, concretament en fetge fetal de pollastre (Kedishvili i col., 1997), sense que es coneixi fins ara cap enzim homòleg en mamífer ni en cap altre cordat. Aquest enzim és actiu amb hidroxisteroides i retinoides (Kedishvili i col., 1997).

Taula 4. Distribució de les subfamílies ADH d'animals (ADH1-ADH8) i FADH (ADH3).

ORGANISMES	CLASSE				
VERTEBRATS					
Mamífers	ADH1 ¹⁻⁴	ADH2 ^{2,4-6}	ADH3 ^{2,7,8}	ADH4 ⁹⁻¹¹	ADH5 ^{12,13}
Aus	ADH1 ¹⁴⁻¹⁷	ADH1/2 ¹⁸	ADH3 ^{18,19}		ADH7 ²⁰
Rèptils	ADH1 ²¹⁻²³		ADH3 ²⁴		
Amfibis	ADH1 ²⁵		ADH3 ²⁵		ADH8 ²⁶
Peixos teleostis	ADH3/1 ²⁷		ADH3 ²⁷		
Peixos condirectis			ADH3 ²⁸		
Ciclòstoms			ADH3 ²⁹		
INVERTEBRATS					
Cefalocordats			ADH3 ³⁰		
Urocordats			ADH3 ³¹		
Cefalòpodes			ADH3 ³²		
Nemàtodes			ADH3 ³³		
Artròpodes			ADH3 ³⁴		
PLANTES			ADH3 ^{35,36}		
FONGS			ADH3 ³⁷		
PROCARIOTES			ADH3 ³⁸		

ADH3/1 i ADH1/2 representen els enzims amb propietats mixtes descrits en peixos teleostis i aus, respectivament. Referències: ¹ Bosron i col., 1985b; ² Holmes i col., 1986; ³ Julià i col., 1987; ⁴ Keung i Yip, 1989; ⁵ Dafeldecker i col., 1981; ⁶ Seeley i Holmes, 1984; ⁷ Seeley i col., 1984; ⁸ Keung i col., 1995; ⁹ Julià i col., 1983; ¹⁰ Moreno i Parés., 1991; ¹¹ Algar i col., 1992; ¹² Chen i Yoshida, 1991; ¹³ Höög i Brandt, 1995; ¹⁴ Estonius i col., 1990; ¹⁵ Kaiser i col., 1990; ¹⁶ Estonius i col., 1994a; ¹⁷ Hjelmqvist i col., 1995b; ¹⁸ Hjelmqvist i col., 1995b; ¹⁹ Nussrallah i col., 1989; ²⁰ Kedishvili i col., 1997; ²¹ Persson i col., 1993; ²² Hjelmqvist i col., 1996; ²³ Shafqat i col., 1996a; ²⁴ Hjelmqvist i col., 1995c; ²⁵ Peralba i col., 1999b; ²⁶ Peralba i col., 1999a; ²⁷ Danielsson i col., 1992; ²⁸ Danielsson i Jörnvall, 1992; ²⁹ Danielsson i col., 1994; ³⁰ Cañestro i col., 2000; ³¹ Cañestro i col., 2001; ³² Fernández i col., 1993; ³³ Glassner i col., 1995; ³⁴ Luque i col., 1994; ³⁵ Martínez i col., 1996; ³⁶ Shafqat i col., 1996b; ³⁷ Fernández i col., 1995; ³⁸ Gutheil i col., 1992.

1.3.6 ADH8

El treball d'identificació de possibles enzims ADH4 en els diferents grups de vertebrats va portar el nostre grup a la detecció d'una forma present en la mucosa digestiva de l'amfibi *Rana perezi*, anomenada inicialment *ADH4-like* (Peralba i col., 1999a). La seva caracterització va revelar una propietat catalítica distintiva: és la única ADH de vertebrat que presenta una eficiència catalítica (kcat/Km) més elevada per al NADP(H) que per al NAD(H) (Taula 5). Aquest fet fou important per a considerar que *ADH4-like* podria representar una nova classe, ADH8, que fins el moment únicament ha estat localitzada en amfibis. A més, aquest enzim malgrat mostrar una distribució tissular semblant a ADH4, presentava una identitat seqüencial superior amb enzims ADH1 que amb enzims ADH4, 60 i 58 % respectivament. Altres propietats cinètiques d'aquest enzim foren els seus elevats valors de kcat, superiors en comparació a les d'altres ADHs, i la seva sensibilitat intermitja a la inhibició amb pirazole ($K_i = 1,3 \text{ mM}$), superior a la que presenta ADH1 de *Rana* ($K_i = 0,15 \text{ }\mu\text{M}$), i inferior a la d'ADH3 del mateix organisme ($K_i = 40 \text{ mM}$) (Peralba i col., 1999a).

La seva diferent especificitat de coenzim podria representar una variació en la seva funció respecte a altres ADHs. El NAD^+ i el NADPH són els coenzims que presenten nivells fisiològics més elevats en teixits de mamífer (Williamson i Brosnan, 1974), inclosa la mucosa gàstrica (Sarau i col., 1975). Valors obtinguts en la mucosa gàstrica d'amfibis són consistents amb aquest resultat (Bannister, 1967). Així, la reacció que catalitzaria ADH8 seria la reducció d'aldehids, contràriament a la resta d'ADHs dependents de NAD(H) caracteritzades fins ara en vertebrats, que en condicions fisiològiques intervenen preferentment en l'oxidació d'alcohols. Aquesta afirmació es veu reforçada per les millors eficiències catalítiques que presenta l'ADH8 per als aldehids que per als corresponents alcohols (Taula 5). La seva activitat reductasa, així com la bona eficiència amb substrats de cadena mitjana i llarga, com l'hexanal, el *trans*-2-hexenal i diferents isòmers del retinal, li conferirien un paper en la protecció dels teixits envers aldehids tòxics derivats de la peroxidació lipídica, i en el metabolisme dels retinoides (Taula 5).

Taula 5. Constants cinètiques de l'ADH8 a pH 7,5.

Substrat	Km (mM)	kcat (min ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ .min ⁻¹)
Etanol	600	1030	1,7
Butanol	8,2	640	70
Pentanol	1,1	510	460
Hexanol	0,35	480	1400
<i>trans</i> -2-hexenol	0,22	530	2300
Octanol	0,15	340	2000
Tot- <i>trans</i> -retinol	0,02	30	1500
9- <i>cis</i> -retinol	0,019	6	300
Acetaldehid	7	1260	1800
Butanal	0,11	15600	140000
Pentanal	0,07	14400	200000
Hexanal	0,04	14000	350000
<i>trans</i> -2-hexenal	0,06	2840	47000
Octanal	0,01	10700	1100000
<i>m</i> -Nitrobenzaldehid	0,002	5870	3000000
Tot- <i>trans</i> -retinal	0,008	270	34000
9- <i>cis</i> -retinal	0,009	70	7800
NADP ⁺	0,06	354	5900
NAD ⁺	0,8	158	200
NADPH	0,012	6620	550000
NADH	0,52	6058	11000

Tots els valors de la Taula han estat extrets de Peralba i col., 1999a

2 L'ALCOHOL DESHIDROGENASA I EL METABOLISME DE RETINOIDES

2.1 PROPIETATS DELS RETINOIDES

El terme retinoide fa referència a cadascuna de les formes naturals o sintètiques de la vitamina A o retinol i a tots els seus derivats, independentment de si presenten activitat biològica o no. Els retinoides estan formats per tres dominis estructurals: un anell de β -ionona, una cadena hidrocarbonada poliinsaturada i un grup polar. L'apolaritat de l'anell i de la cadena els hi confereixen un marcat caràcter hidrofòbic. El grup polar pot presentar tres estats d'oxidació: alcohol, aldehyd i àcid carboxílic. Per altra banda, els dobles enllaços de la cadena hidrocarbonada poden mostrar diversos estats d'isomerització, essent tot-*trans*, 9-*cis*, 11-*cis* i 13-*cis* els més freqüents (Fig. 1).

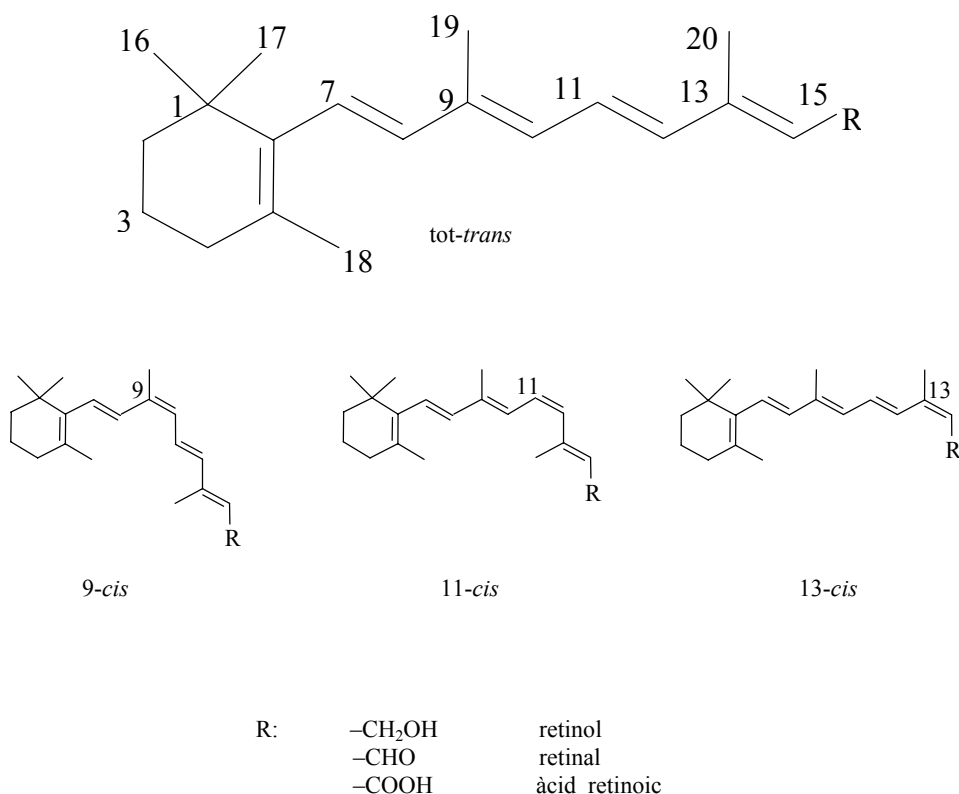


Figura 1. Estructura dels principals isòmers de retinoides.

2.2 INCORPORACIÓ DEL RETINOL A L'ORGANISME

La vitamina A s'incorpora a l'organisme per l'ingesta tant de productes d'origen animal, en forma de retinol i d'èsters de retinol, com vegetal, en forma de β -carotè. Els èsters de retinol són hidrolitzats en el lumen de l'intestí prim a retinol, que juntament amb el retinol lliure s'emulsiona amb sals biliars i àcids grassos lliures. És en aquest estat quan el retinol és captat pels enterocits. Per altra banda, el β -carotè entra per difusió passiva a l'interior de l'enterocit, on és convertit a dues molècules de retinal per la 15,15'dioxigenasa citosòlica. Aquest retinal és convertit a retinol per una reductasa microsomal de l'enterocit.

2.3 EMMAGATZEMAMENT I MOBILITZACIÓ DEL RETINOL

Independentment del seu origen, a l'interior de l'enterocit, el retinol s'uneix a la proteïna unidora de retinol cel.lular del tipus II (CRBP-II), i és esterificat amb àcids grassos de cadena llarga per la lecitina-retinol aciltransferasa (LRAT). Aquests èsters de retinol passen al sistema limfàtic empaquetats en els quilomicrons, arribant a la circulació general, d'on són captats per les cèl.lules parenquimàtiques del fetge a través de receptors específics. En els hepatòcits, els èsters de retinol són hidrolitzats a retinol, que s'uneix a la proteïna cel.lular unidora de retinol del tipus I (CRBP-I). Aquest complex és transferit a les cèl.lules estrellades del fetge, on el retinol s'emmagatzema en forma d'èsters de retinol. Quan el retinol és requerit per cèl.lules i teixits perifèrics, els èsters de retinol són hidrolitzats per l'enzim hidrolasa d'èsters de retinol (REH). El retinol generat és secretat a la circulació general unit a una proteïna plasmàtica transportadora de retinol (RBP), la qual està unida a la transtiretina (TTR). La captació del retinol per les cèl.lules diana es produiria a través de receptors de RBP de membrana. El retinol que entra a les cèl.lules diana pot patir diferents processos: ser reciclat cap al plasma, ser esterificat per l'emmagatzemament, o ser activat a àcid retinoic.

2.4 ACTIVACIÓ DEL RETINOL. SÍNTESI DE L'ÀCID RETINOIC

L'àcid retinoic és la forma activa de la vitamina A. La formació d'aquest compost, a partir de retinol, implica dues etapes d'oxidació. Una primera reversible, de retinol a retinal, que és el pas limitant de la via; i una segona reacció irreversible on el retinal és convertit a àcid retinoic (Fig. 2).

2.4.1 Enzims implicats en l'etapa d'oxidació del retinol

En aquest pas, estan implicats fonamentalment enzims del sistema ADH de vertebrats, i les deshidrogenases/reductases de cadena curta (SDR) citosòliques o microsomals.

2.4.1.1 Alcohol deshidrogenasa

ADH1 i ADH4 són les classes més estudiades en relació amb el metabolisme de retinoides, i les que presenten unes millors eficiències catalítiques, en especial ADH4. Aquestes dues classes presenten una diferent especificitat envers als diferents isòmers del retinol. ADH1 presenta eficiències catalítiques semblants per a tot-*trans* i 9-*cis*-retinol, malgrat que estudis de *docking* indiquen que l'isòmer tot-*trans* s'ajusta millor al seti actiu (Moreno i col., 1996; Foglio i Duester, 1999). ADH4 presenta unes millors eficiències catalítiques per al tot-*trans*-retinol que ADH1 (Boleda i col., 1993; Yang i col., 1994; Allali-Hassani i col., 1998; Han i col., 1998; Kedishvili i col., 1998), i mostra encara una millor eficiència per al 9-*cis*-retinol (Allali-Hassani i col., 1998). Estudis de *docking* han indicat que 9-*cis*-retinol, 11-*cis*-retinol i tot-*trans*-retinol poden unir-se millor al seti actiu d'ADH4 que d'ADH1 (Moreno i col., 1996; Foglio i Duester, 1999).

La contribució d'ADH2 a la producció del retinal necessari per a la síntesi d'àcid retinoic seria petita, representant només el 2 % de l'activitat retinol deshidrogenasa citosòlica en el fetge de rata (Popescu i Napoli, 2000). Recentment, ha estat descrita una petita activitat tot-*trans*-retinol deshidrogenasa de l'ADH3 de ratolí (Molotkov i col., 2002). La distribució tissular ubíqua d'aquest enzim facilitaria la síntesi d'àcid retinoic a qualsevol teixit.

ADH1, ADH2 i ADH4 també poden catalitzar la reducció de retinal a retinol (Boleda i col., 1993; Yang i col., 1994), però sota condicions fisiològiques la relació $[NAD^+]/[NADH]$ és propera a 1000. Per tant, aquests enzims contribuirien només a l'oxidació del retinol.

ADH8, a diferència d'ADH1, ADH2, ADH3 o ADH4, no funcionaria com una retinol deshidrogenasa, sinó com una retinal reductasa. Els isòmers *tot-trans*, *9-cis* i *13-cis*-retinal són bons substrats, mostrant el *tot-trans*-retinal la major eficiència catalítica (Taula 6). L'activitat retinal reductasa seria important en: **1)** la reducció del retinal generat en l'intestí per l'escissió del β -carotè aportat per la dieta (von Lintig i Vogt, 2000), **2)** en la regulació de la formació d'àcid retinoic a partir de retinal, **3)** en la regulació de l'emmagatzemament d'èsters de retinol formats a partir de retinol (Napoli, 1999; Duester, 2000; Fig. 2), **4)** en la regeneració de la rodopsina en el cicle visual. A més, l'activitat *tot-trans*-retinal reductasa pot ser important en la regulació del desenvolupament dels amfibis. Així, el *tot-trans*-retinal, és la forma majoritària d'emmagatzemament de retinoides en els ous i en les primeres fases del desenvolupament embrionari de *Xenopus* (Scadding i Maden, 1994).

Taula 6. Eficiències catalítiques de diferents ADHs amb retinoides.

Enzim	Eficiències catalítiques ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)		
	<i>tot-trans</i> -retinal	<i>9-cis</i> -retinal	<i>13-cis</i> -retinal
ADH1A ¹	0,22	0,13	0,089
ADH1B1 ¹	0,0068	0,0084	0,0041
ADH1C1 ¹	0,014	0,017	0,011
ADH2 ¹	0,50	0,54	0,040
ADH4 ³	3,3	8,98	0,44
ADH8⁴	33,7	7,8	4,2

¹ Yang i col., 1994; ² Allali-Hassani i col., 1997; ³ Martras i col., 2004; ⁴ Peralba i col., 1999a.

2.4.1.2 Deshidrogenases/reductases de cadena curta (SDR)

Les retinol deshidrogenases de la superfamília de les SDR són capaces d'oxidar el retinol o de reduir el retinal, utilitzant NAD(H) o NADP(H) com a coenzim. Presenten activitat amb el complex retinol-CRBP, a diferència de les ADHs, que només oxiden retinol lliure (Kedishvili i col., 1998; Napoli, 1999). Encara que aquest fet questionava el paper de les ADHs en el metabolisme de retinoides, treballs realitzats en ratolins deficients en CRBP han demostrat que la síntesi d'àcid retinoic a partir de retinol lliure també es produeix (Quadro i col., 1999).

2.4.2 Enzims implicats en l'etapa d'oxidació del retinal

L'oxidació irreversible dels isòmers de retinal als corresponents isòmers d'àcid retinoic la duriem a terme formes citosòliques de la família de les aldehyd deshidrogenases, en una reacció dependent de NAD⁺ (Labrecque i col., 1995; Napoli, 1999; Duester, 2000; Duester, 2001). Alguns membres de la família del citocrom P-450 també podrien intervenir en aquest pas, malgrat que els seus valors de Km per al retinal tenen poc significat fisiològic (Roberts i col., 1992; Raner i col., 1996). El catabolisme de l'àcid retinoic és realitzat per enzims de la família del citocrom P-450, que el converteixen en metabolits més polars com els àcids 4-oxo, 4-hidroxi- i 18-hidroxi-tot-*trans*-retinoic (Ray i col., 1997; White i col., 1997, 2000).

2.5 MECANISME D'ACCIÓ DE L'ÀCID RETINOIC

L'acció de l'àcid retinoic es produeix a través de receptors nuclears, integrants de la família dels receptors d'hormones esteroïdals, tiroïdals i de la vitamina D, que actuen com a factors de transcripció després de la unió amb el lligand (Napoli, 1996; Ross i col., 2000). S'han descrit dos tipus de receptors d'àcid retinoic, els RAR i els RXR. Aquests receptors actuen sobre la transcripció gènica, unint-se en forma d'homodímers o heterodímers a elements de resposta a retinoides (RARE; Chu i col., 1995a; 1995b;

Napoli, 1996). Els retinoides poden tant estimular com reprimir la transcripció gènica, dependent de la quantitat i tipus de receptors presents, així com de la concentració de lligand (Napoli, 1996). Els àcids tot-*trans*-retinoic i 9-*cis*-retinoic, produïts a partir dels corresponents aldehids, serien els responsables de la regulació gènica implicada en processos de creixement i desenvolupament en vertebrats (Maden, 1994; Gudas i col., 1994).

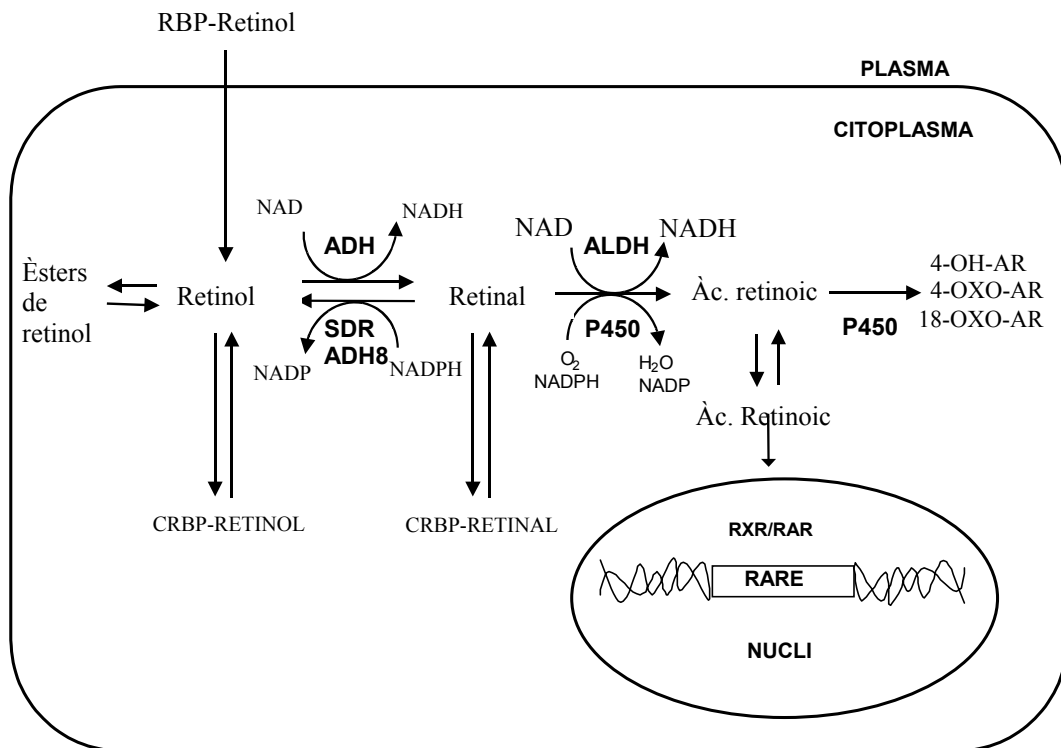


Figura 2. Esquema de la via metabòlica dels retinoides (modificat de Duester, 1996).

3 ESTRUCTURA DE L'ALCOHOL DESHIDROGENASA. MECANISME CINÈTIC I CATÀLISI.

L'ADH, i en especial ADH1, ha estat objecte d'un gran nombre d'estudis cristal·logràfics, per tal de relacionar les seves característiques estructurals i la seva funció biològica (Taula 7). La primera estructura resolta fou l'apoenzim de l'ADH1 de cavall (Eklund i col., 1976), que aportà informació sobre l'arquitectura general de la proteïna. Posteriorment, han estat resoltes les estructures tridimensionals de diferents isoenzims de l'ADH1 humana, l'ADH1 de bacallà, l'ADH2 de ratolí, i les ADH3 i ADH4 humanes (Taula 7), mostrant totes elles una arquitectura general força conservada.

3.1 ARQUITECTURA GENERAL DE L'ALCOHOL DESHIDROGENASA

L'ADH és un enzim dimèric amb unes dimensions moleculars de 40 x 55 x 100 Å. Cada monòmer presenta una Mr de 40 kDa i està format per uns 374 residus. Cadascuna de les subunitats mostra un domini catalític organitzat en dues regions, del residu 1 al 175, i del 319 al 374, i un domini d'unió al coenzim, del residu 176 al 318 (la numeració dels residus utilitzada en tota la memòria correspon a l'ADH1 de cavall). Els dos dominis d'una mateixa subunitat estan separats per una escletxa, en la que trobem el seti actiu. En el dímer, els dominis d'unió al coenzim de cada subunitat estan junts formant un nucli central, mentre que els dominis catalítics s'ubiquen en els extrems de la molècula (Fig. 3). L'ADH conté dos àtoms de zinc per monòmer, ambdós coordinats amb residus pertanyents al domini catalític. Un d'ells, amb un paper estructural, està lluny del seti catalític i es troba tetracoordinat amb els grups tiol de Cys97, Cys100, Cys103 i Cys111 (Eklund i Brändén, 1987). El segon zinc, localitzat en el seti actiu a uns 20 Å de la superfície, és essencial per a la catàlisi (Eklund i col., 1984). En l'apoenzim i en els complexos binaris, el zinc catalític es troba tetracoordinat amb els grups tiol dels residus Cys46 i Cys174, el grup imidazol de His67 i una molècula d'aigua (Eklund i col., 1976; Svensson i col., 2000; Niederhut i col., 2001). En els complexos ternaris, la molècula d'aigua és substituïda, com a quart lligand de coordinació, pel substrat (Ramaswamy i col., 1994a; Xie i col., 1997; Svensson i col., 2000).

Taula 7. Algunes estructures resoltes d'alcohol deshidrogenases de vertebrats.

Enzim	Complex	Lligands	Resolució (Å)	Referències
Apoenzims				
ADH1 ^a			2,4	Eklund i col., 1976
ADH3			2,1	Sanghani i col., 2002
Holoenzims				
ADH1 ^a	Ternari	NAD ⁺ /PFB	2,1	Ramaswamy i col., 1994a
ADH1 ^b	Ternari	NAD ⁺ /pirazole	2,8	Ramaswamy i col., 1996
ADH1A	Ternari	NAD(H)/4-iodopirazole	2,5	Niederhut i col., 2001
ADH1B1	Binari	NAD(H)	2,2	Niederhut i col., 2001
	Ternari	NAD ⁺ /4-iodopirazole	2,2	Davis i col., 1996
ADH1B2	Ternari	NAD ⁺ /4-iodopirazole	2,5	Hurley i col., 1994
ADH1B3	Ternari	NAD ⁺ /4-iodopirazole	2,4	Davis i col., 1996
ADH1C2	Binari	NAD(H)	2,0	Niederhut i col., 2001
	Binari	NADH	2,2	Svensson i col., 2000
ADH3	Ternari	NADH/CFX	2,1	Svensson i col., 2000
	Binari	12-HDDA	2,3	Sanghani i col., 2002
	Binari	NAD ⁺	2,7	Yang i col., 1997
	Ternari	NAD ⁺ /àcid dodecanoic	2,2	Shanghani i col., 2002
ADH3 ^b	Binari	NAD ⁺	2,8	Ramaswamy i col., 1994b
ADH4	Ternari	NAD ⁺ /acetat	3,0	Xie i col., 1997

Tots els enzims que apareixen en aquesta taula són humans a excepció de ADH1^a (cavall), ADH1^b i ADH3^b (bacallà), i ADH2^c (ratolí). PFB (alcohol 2,3,4,5,6-pentafluorobenzilic), CFX (*N*-ciclohexilformamida), 12-HDDA (àcid 12-hidroxidodecanoic). NAD(H), en el cristall no es podia apreciar si el coenzim estava oxidat o reduït.

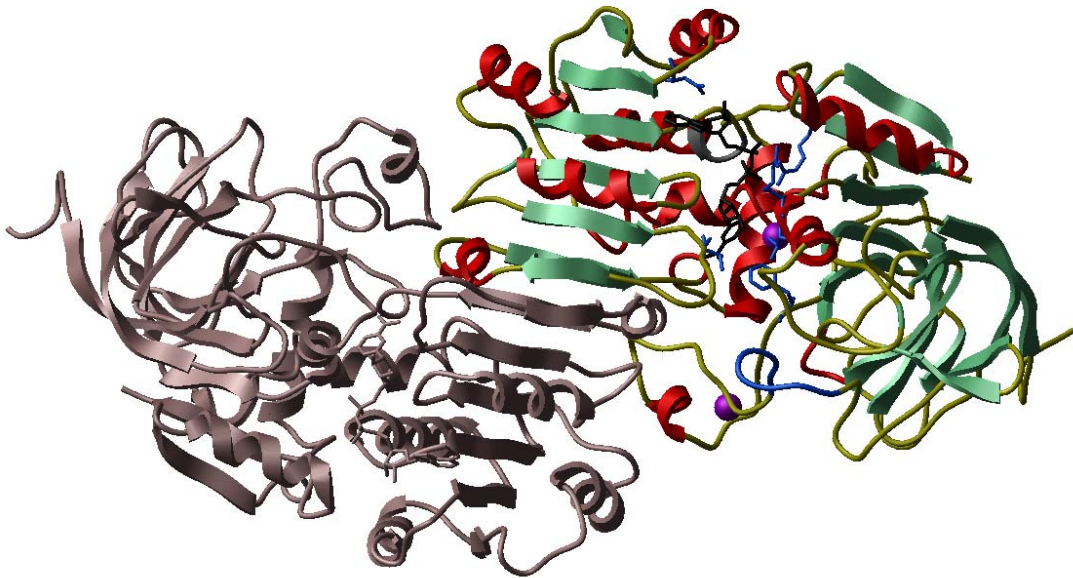


Figura 3. Estructura tridimensional de l'ADH1B humana. La subunitat de la dreta té representats diversos elements amb colors diferents: fulles β (verd), hèlix α (vermell), àtoms de zinc (esferes porpra), coenzim (negre), regions d'unió de substrat i el coenzim (blau). Els dominis de fixació de coenzim (plegament de Rossmann) constitueixen l'eix central del dímer. Els dominis catalítics són els més externs.

3.2 CANVI CONFORMACIONAL I MECANISME CINÈTIC

Un cop resoltes les estructures de l'apoenzím i de l'holoenzím de l'ADH1 de cavall, es va observar que ambdues presentaven conformacions diferents (Eklund i Brändén, 1979). L'apoenzím mostra una conformació oberta, que permet l'accés del coenzím a la seva butxaca d'unió sense que hi hagi impediments estèrics. En canvi, l'holoenzím presenta una conformació més tancada, fruit d'una rotació de 10° dels dominis catalítics respecte als dominis d'unió al coenzím (Fig. 4). Aquesta rotació és possible gràcies a un canvi conformacional local del llaç 294-297 del domini d'unió al coenzím, que es desplaça per fer lloc a les noves posicions dels residus 51-58 del domini catalític (Eklund i col., 1981). El gir dels dominis catalítics es produeix al voltant d'una regió frontissa formada per dues seqüències (residus 173-175 i 318-321), que uneixen

covalentment estructures dels dos dominis. Concretament, la primera d'elles uneix una hèlix 3_{10} (residus 166-172) del domini catalític amb una hèlix α (residus 175-188) del domini d'unió al coenzim, mentre que la segona uneix l'última fulla β (residus 312-318) del domini d'unió al coenzim amb una hèlix α (residus 324-338) del domini catalític. El moviment és més gran per a residus allunyats de l'eix de rotació. En canvi, els àtoms que es troben en el seti actiu, tant els lligands del zinc catalític com els residus de la butxaca d'unió al substrat, estan poc afectats per aquests canvis conformacionals, ja que es troben a prop de la regió frontissa. Durant el canvi conformacional, el domini d'unió al coenzim també gira, en aquest cas $1,5^\circ$ al voltant d'un eix definit per les fulles β del domini (Fig. 4). El NAD^+ rota amb el domini d'unió al coenzim, mantenint les mateixes interaccions. El resultat net és que el coenzim és empès més cap a l'interior de l'enzim.

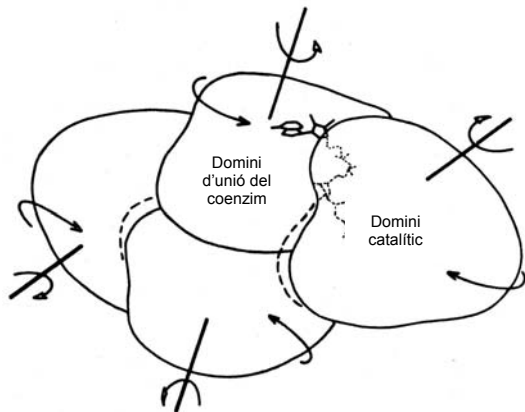


Figura 4. Representació del canvi conformacional de l'alcohol deshidrogenasa. Modificat de Eklund i Brändén, 1987.

La conformació tancada de l'holoenzim de l'ADH1 de cavall també s'observa en els holoenzims de les ADH1 humanes (Hurley i col., 1994; Davis i col., 1996; Niederhut i col., 2001) i de l'ADH4 (Xie i col., 1997). En canvi, els holoenzims de l'ADH1 de bacallà (Ramaswamy i col., 1996), de l'ADH2 de ratolí (Svensson i col., 2000), i de l'ADH3 humana (Yang i col., 1997), mostren estructures que han estat definides com a semiobertes.

El canvi conformacional influeix en el mecanisme cinètic d'aquests enzims (Eklund i col., 1981). ADH1 i ADH4, amb alcohols alifàtics primaris, presenten un mecanisme seqüencial ordenat bi bi (Theorell i Chance, 1951; Wratten i Cleland, 1963; Yin i col., 1997; Fig. 5), on primer s'uneix el coenzim, generant el canvi conformacional que converteix en accessible la butxaca d'unió al substrat (Plapp i col., 1986), i

seguidament el substrat. Un cop finalitzada la catàlisi, s'allibera l'aldehid, i per últim el coenzim (Brändén i Eklund, 1980). Després de la sortida del coenzim reduït, la proteïna torna a la conformació inicial. ADH3 en canvi, presenta un mecanisme a l'atzar, que podria estar relacionat amb la conformació inicial semioberta que presenta, podent interaccionar en primer lloc tant el substrat com el coenzim (Sanghani i col., 2002).

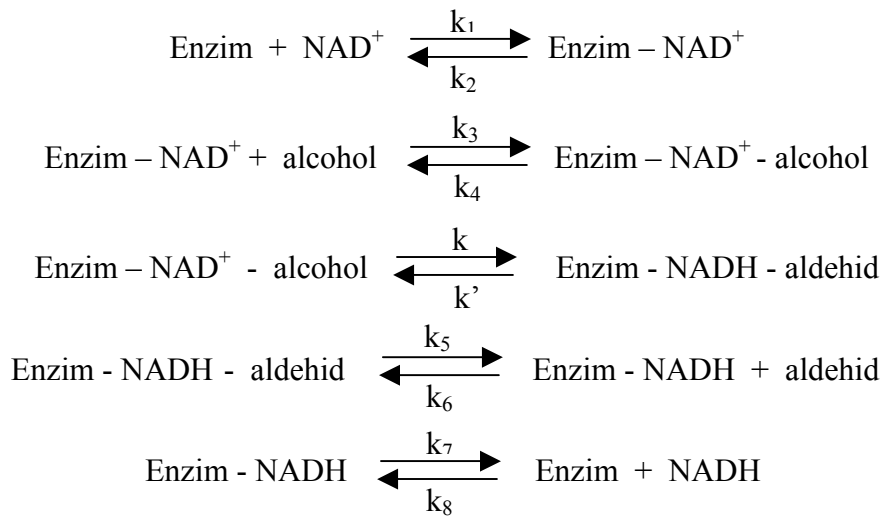


Figura 5. *Mecanisme cinètic seqüencial ordenat bibi de les alcohol deshidrogenases.*

En general, les ADHs presenten com a pas limitant, de la reacció d'oxidació de l'etanol i d'altres alcohols alifàtics, la sortida del coenzim reduït (Brändén i Eklund, 1980; Stone i col., 1993b). Així doncs, la constant de velocitat de dissociació del coenzim (k_7 , Fig. 5) determinaria la constant catalítica de la reacció (k_{cat}).

3.3 BUTXACA D'UNIÓ DEL SUBSTRAT

Les modificacions estructurals generades després de la unió del coenzim impliquen la formació d'un túnel hidrofòbic, que s'estén des del zinc catalític fins a la superfície de l'enzim. Presenta una longitud de 15-20 Å, equivalent a la d'una cadena alifàtica de 9-11 carbonis (Bühler i von Wartburg, 1984), i un diàmetre de 7-10 Å (Eklund i col., 1982). En funció de la proximitat al zinc catalític, a la butxaca d'unió al substrat s'hi distingeixen una regió interna, una central i una d'externa (Eklund i col., 1987).

A la regió interna, hi trobem dos residus força conservats (Ser/Thr48 i Phe93, Sun i Plapp, 1992) i l'anell de nicotinamida del coenzim, que delimiten l'espai al voltant de l'àtom de zinc. Les cadenes laterals d'aquests residus tenen un paper important en l'especificitat de substrat. La presència de Ser48 o Thr48 condiciona l'afinitat per alcohols secundaris. Així, el metil addicional de la cadena lateral de la Thr la limitaria (Höög i col., 1992). La substitució Thr48Ala genera un enzim sense activitat ADH, evidenciant la importància d'aquest residu en la catàlisi (Estonius i col., 1994b). Per altra banda, l'anell aromàtic de la Phe93 genera una forta restricció en la unió d'alcohols secundaris amb configuració R i d'alcohols cíclics (Stone i col., 1989). Aquests són bons substrats per a l'ADH1A, que presenta la substitució Phe93/Ala93 (Stone i col., 1989; Hurley i Bosron, 1992). Diferències en el volum d'aquesta zona són importants en l'especificitat envers substrats petits com l'etanol. L'espai entre el zinc catalític, els residus 48 i 93, i l'anell de nicotinamida, estaria condicionat tant per la posició de les cadenes laterals, com pel grau de rotació o torsió dels anells fenil i nicotinamida del residu Phe93 i del coenzim, respectivament. Aquest espai és més gran en enzims que tenen l'etanol com a un mal substrat, com ADH2, ADH3 o ADH4 (Svensson i col., 2000; Yang i col., 1997; Xie i col., 1997).

La regió central està formada pels residus 94, 140, 141, 294, 318, 319 i 309, aquest darrer formant part de la subunitat oposada del dímer. Aquesta zona central juga un paper important en les interaccions amb la cua alifàtica dels substrats. En la majoria d'ADHs, l'eficiència catalítica augmenta en incrementar-se la longitud de la cadena hidrocarbonada, degut a una disminució en els valors de K_m , indicant la importància de les interaccions hidrofòbiques en la fixació del substrat que es produeixen en aquesta

regió (Deetz i col., 1984). El consegüent increment en els valors de kcat/Km varia entre els diferents enzims, i estaria modulats per diferències en la seqüència d'aquesta zona.

En la regió externa hi trobem els residus 57, 58, 110, 297, 306 (subunitat oposada), així com els residus del llaç 114-120, localitzat prop de l'entrada de la butxaca d'unió al substrat (Hurley i col., 1991; Ramaswamy i col., 1996; Svensson i col., 2000; Xie i col., 1997; Yang i col., 1997). La longitud i seqüència del llaç són altament variables en ADHs de diferents classes i espècies, amb nombroses substitucions, insercions i delecions (Jörnvall i Höög, 1995), que condicionen l'especificitat envers substrats voluminosos, com esteroides (Park i Plapp, 1991), retinoides (Crosas i col., 2000), o S-hidroximetilglutatió (Yang i col., 1997).

3.4 CATÀLISI

El substrat accedeix al seti actiu a través del túnel hidrofòbic generat després del canvi conformacional. L'oxigen d'un grup hidroxil del substrat es situa a una distància inferior a 3Å del zinc catalític, desplaçant la molècula d'aigua que anteriorment hi interaccionava. Aquest darrer punt ha estat qüestionat per diferents treballs basats en tècniques de ressonància paramagnètica electrònica i ressonància magnètica nuclear, que postulen que durant la catàlisi la molècula d'aigua continuaria unida al zinc catalític, trobant-se aquest àtom pentacoordinat (Sloan i col., 1975; Maret, 1989).

La càrrega positiva del zinc catalític i de l'anell de nicotinamida del NAD⁺ influeix sobre el substrat, disminuint el seu pKa i facilitant la formació d'un ió alcoholat amb la corresponent pèrdua d'un protó. L'orientació de l'anell de nicotinamida a l'interior del seti actiu permet la transferència d'un ió hidrur del substrat a l'àtom C4 de l'anell de nicotinamida. Aquesta transferència es veu afavorida per l'hidrofobicitat de l'entorn, generada pel canvi conformacional, en el que es produeix la catàlisi.

Ha estat descrit un sistema de ponts d'hidrogen que permetria el pas del protó des de l'interior de l'enzim cap a la seva superfície (Eklund i col., 1982). El primer pont d'hidrogen implica els àtoms d'oxigen dels grups hidroxils de l'alcohol i de Ser/Thr48, respectivament. Aquest darrer oxigen s'uneix per pont d'hidrogen a l'oxigen 2' de la ribosa del coenzim, que al mateix temps interacciona amb el grup imidazol de His47 o His51, en funció de la classe, transferint-se finalment el protó al solvent.

4 ESPECIFICITAT DE COENZIM EN L'ALCOHOL DESHIDROGENASA

El NAD(H) i el NADP(H) són molècules implicades en moltes reaccions redox de tots els éssers vius. Estructuralment, són molt semblants, diferint només per la presència en el NADP(H) d'un grup fosfat esterificat en el grup hidroxil 2' de la ribosa del nucleòtid d'adenina (Fig. 6).

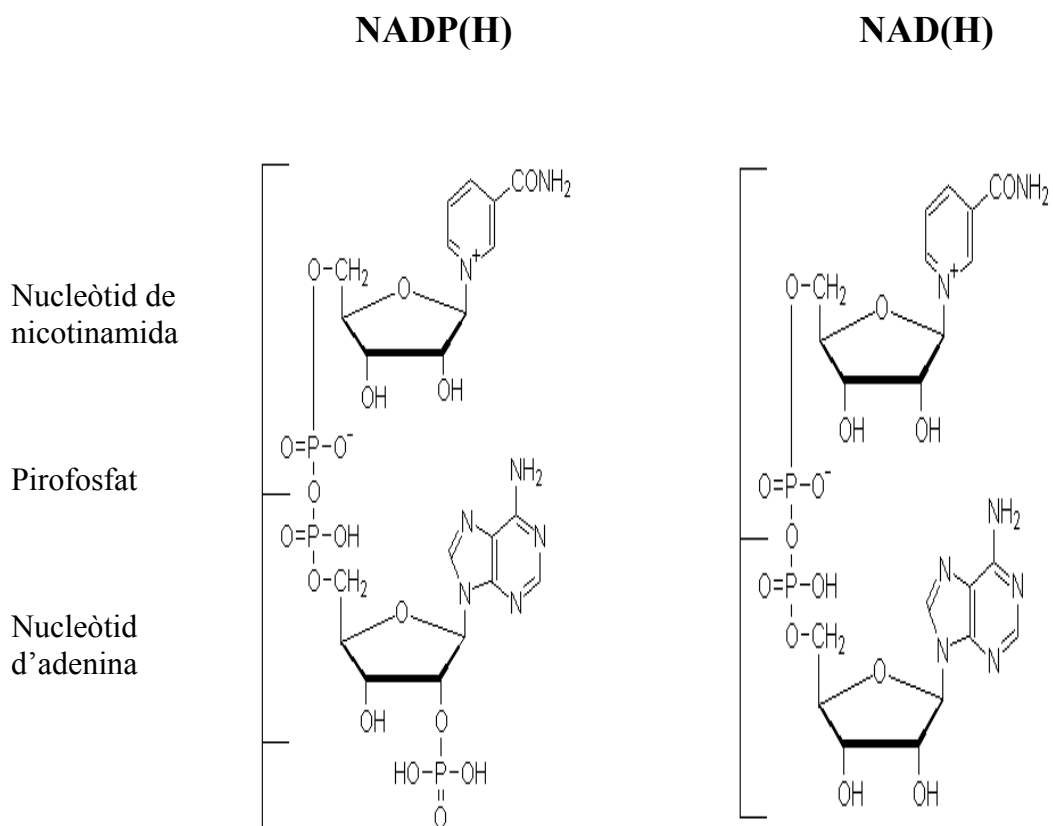


Figura 6. Estructures del NADP(H) i del NAD(H).

L'ADH uneix, en l'esclètxa situada entre els dominis catalític i d'unió al coenzim, una molècula de cofactor per subunitat. El coenzim interacciona amb residus dels dos dominis, a excepció de l'adenosina que únicament interacciona amb aminoàcids del domini d'unió al coenzim. L'element estructural bàsic en aquest domini, com en altres proteïnes fixadores de dinucleòtids de nicotinamida-adenina, és el plegament de Rossmann (Rossmann i col., 1974). Aquesta estructura està formada per hèlix α i fulles β alternades (Fig. 7), essent els residus localitzats en les fulles β_1 , β_2 i β_4 , en les hèlix α_2 i α_5 , i en els llaços que connecten β_1 amb α_2 i β_4 amb α_5 , els que estan involucrats en la unió del coenzim (Fig. 7).

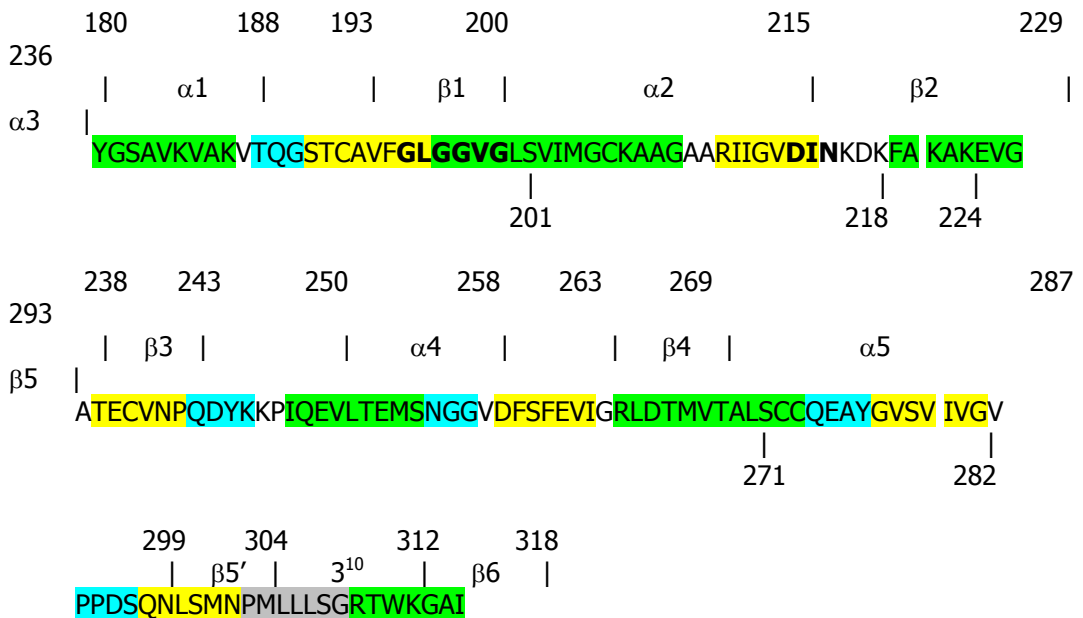


Figura 7. Esquema de les estructures secundàries del domini d'unió al coenzim de l'ADH1 de cavall. ■ Hèlix α ; ■ Fulles β ; ■ Hèlix 3^{10} ; ■ Girs (modificat d'Eklund i col., 1976).

La conformació del coenzim, quan s'uneix a l'ADH, és oberta, no tancada com la que presenta en solució, i és molt similar a la trobada en altres deshidrogenases (Rossmann i col., 1974). La distància entre el C6 de l'anell d'adenina i l'àtom C2 de l'anell de nicotinamida, una mesura de l'extensió del coenzim (Rossmann i col., 1974), és de 15 Å en l'ADH1 de cavall.

Els segments del domini d'unió al coenzim implicats en la interacció amb l'adenosina i amb el pirofosfat han estat relacionats amb la discriminació entre el NAD(H) i el NADP(H) i, per tant, en el conferiment de l'especificitat de coenzim.

4.1 RESIDUS INVOLUCRATS EN LA INTERACCIÓ AMB EL PIROFOSFAT

La zona d'unió al pirofosfat ha estat força estudiada per la seva importància en la unió del coenzim, i pel seu possible paper en la discriminació entre el NAD(H) i el NADP(H). Situada al final de la fulla $\beta 1$ i marcant l'inici de l'hèlix $\alpha 2$ (Fig. 7), trobem una seqüència consens (GXGXXG; on X pot ser qualsevol residu) que constitueix un estret gir entre les dues estructures anteriors (Wierenga i col., 1985), i que permet la interacció entre la proteïna i el pirofosfat del coenzim. Aquestes tres Gly es troben molt conservades en les ADHs i en enzims homòlegs (Sun i Plapp, 1992; Bellamacina, 1996; Taula 8), malgrat que no interaccionen directament amb el coenzim en el cas de les ADHs (Eklund i col., 1984; Hurley i col., 1991; Xie i col., 1997; Svensson i col., 2000). La primera Gly és essencial per conferir la tensió adient al gir. La segona facilita la unió del coenzim, degut a l'absència d'una cadena lateral voluminosa. I la tercera permet una estreta interacció entre la fulla $\beta 1$ i l'hèlix $\alpha 2$. La importància d'aquestes tres Gly en la unió del coenzim ha estat demostrada en estudis de mutagènesi dirigida, on la seva substitució ha implicat pèrdua d'afinitat per al coenzim i disminució de l'activitat enzimàtica (Thatcher, 1980; Gomi i col., 1989; Chen i col., 1990; Hoop i col., 1991). El seu paper en l'especificitat de coenzim és més controvertit (Scrutton i col., 1990; Bellamacina, 1996). Enzims dependents de NADP(H) presenten la tercera Gly substituïda per una Ala (Wierenga i col., 1985; Hanokoglu i Gutfinger, 1989), conferint aquest canvi un major espai entre la fulla $\beta 1$ i l'hèlix $\alpha 2$, que afavoriria la inserció del NADP(H) (Rao i Rossmann, 1973). Diferents treballs han intentat revertir l'especificitat de coenzim substituïnt aquesta posició, tant en enzims dependents de NAD(H) com de

NADP(H), sense aconseguir-ho (Scrutton i col., 1990; Bocanegra i col., 1993; Fan i Plapp, 1999).

Les ADHs de vertebrats presenten de manera força conservada la seqüència 199-GLGGVG-204 (Taula 8), on únicament els residus en les posicions 202 i 203 interaccionen amb el pirofosfat (Taula 9). ADH8 mostra la mateixa seqüència consens que les ADHs dependents de NAD(H), no presentant substituïda la tercera Gly per una Ala. Aquesta posició, doncs, no seria important en la discriminació entre el NADP(H) i el NAD(H) en aquest enzim. Afirmació que es podria fer extensible a la superfamília MDR, on els seus integrants presenten aquesta Gly conservada, independentment de l'especificitat de coenzim (Taula 8).

Malgrat que no estan implicats en l'especificitat de coenzim, els residus en les posicions 47 (His o Arg majoritàriament) i 369 (Arg) també poden interaccionar amb el pirofosfat (Taula 9). La presència de dos residus bàsics en aquestes posicions ha estat relacionada amb una forta unió del coenzim. Les variants al·lèliques humanes ADH1B2 i ADH1B3 presenten les substitucions Arg47His i Arg369Cys, respectivament, comportant l'alteració en la càrrega positiva de la cadena lateral, i debilitant la unió del coenzim amb el corresponent increment de la seva velocitat de dissociació, el que resulta finalment en un augment de la *k_{cat}* (Bosron i col., 1985a). ADH8 manté Arg369, però presenta Gly47. Aquest fet podria estar relacionat amb els elevats valors de *k_{cat}* que mostra aquest enzim (Peralba i col., 1999a).

4.2 RESIDUS INVOLUCRATS EN LA UNIÓ DE L'ADENOSINA

La regió d'unió de la ribosa de l'adenosina juga un important paper com a punt de reconeixement, ja que es troba en la superfície del seti d'unió al coenzim en la conformació oberta de la proteïna. A més, és en aquesta zona del coenzim on trobem l'única diferència entre el NAD(H) i el NADP(H) (Fig. 6). Aquest seti és dominat en enzims dependents de NAD(H) per un residu carregat negativament (Asp o Glu), localitzat a l'extrem C-terminal de la fulla β 2 del plegament de Rossmann (Perham i col., 1991; Bellamacina, 1996; Fig. 7). Aquesta posició correspon a la 223 en la família ADH de vertebrat, on trobem un Asp en les ADHs dependents de NAD(H) i una Gly en ADH8 (Taula 8).

Taula 8. Especificitat de coenzim en les MDR. Seqüència de les zones implicades.

<i>Espècie/ enzim</i>	Unió del pirofosfat (residus 199-204) ^a	Unió de l'adenosina (residus 223-225 i 228) ^a
Dependents de NAD(H)		
<i>Rpe</i> /ADH1 ¹	GL – GGVG	DLN K
<i>Gca</i> /ADH1 ¹	GL – GAVG	DLN K
<i>Eca</i> /ADH1 ¹	GL – GGVG	DIN K
<i>Hsa</i> /ADH1B ¹	GL – GGVG	DIN K
<i>Sca</i> /ADH2 ¹	GL – GGVG	DIN K
<i>Hsa</i> /ADH2 ¹	GL – GGVG	DIN K
<i>Dme</i> /ADH3 ¹	GL – GAVG	DIN K
<i>Hsa</i> /ADH3 ¹	GL – GGVG	DIN K
<i>Rno</i> /ADH4 ¹	GL – GGVG	DIN K
<i>Pma</i> /ADH5 ¹	GL – GGVG	DIN K
<i>Hsa</i> /ADH6 ¹	GL – GGVG	DVN K
<i>Gdo</i> /ADH7 ¹	GL – GGVG	DIN K
<i>Sce</i> /ADH1 ²	GAAGG LG	DGG K
Dependents de NADP(H)		
<i>Rpe</i> /ADH8 ¹	GL – GGVG	GTH K
<i>Tbr</i> /PDH ³	GI – GAVG	GSR C
<i>Cbe</i> /PDH ³	GI – GAVG	GSR C
<i>Cpo</i> /ξ-cristal.lina ⁴	GA SGGVG	AGT G
<i>Eco</i> /QOR ⁴	AAA GGVG	VGT K
<i>Sso</i> /GlcDH ³	GS – GSE A	NRR T
<i>Atha</i> /CAD ⁵	GL – GGVG	SSS K
<i>Msa</i> /MTD ⁵	GL – GGLG	STS K
<i>Xfas</i> /CAD ⁵	GL – GPVG	TRS K
<i>Sce</i> /ADHVI ⁵	GL – GGI G	SRS K

Rpe: *Rana perezi*; *Gca*: *Gadus callarius*; *Eca*: *Equus caballus*; *Hsa*: *Homo sapiens*; *Sca*: *Struthio camelus*; *Dme*: *Drosophila melanogaster*; *Blan*: *Branchiostoma lanceolatum*; *Rno*: *Rattus norvegicus*; *Pma*: *Peromyscus maniculatus*; *Gdo*: *Gallus domesticus*; *Sce*: *Saccharomyces cerevisiae*; *Tbr*: *Thermoanaerobacter brockii*; *Cbe*: *Clostridium beijerinckii*; *Cpo*: *Cavia porcellus*; *Eco*: *Escherichia coli*; *Sso*: *Sulfolobus solfataricus*; *Atha*: *Arabidopsis thaliana*; *Msa*: *Malva sativa*; *Xfas*: *Xilella fastidiosa*. Families: ¹ADH; ²Y-ADH; ³PDH; ⁴QOR; ⁵CAD. Enzims: GlcDH (Glucosa deshidrogenasa); MTD (Manitol deshidrogenasa). ^a La numeració dels residus correspon a l'ADH1 de cavall.

Taula 9. Ponts d'hidrogen realitzats pel coenzim en ADHs dependents de NAD(H).

	ADH1 Cavall	ADH1B1 Humana	ADH2 Ratolí	ADH4 Humana
Adenina				
N1	H ₂ O	---	H ₂ O	H ₂ O
N6	H ₂ O	---	H ₂ O	---
N7	H ₂ O	---	H ₂ O	---
Ribosa				
O2'	Asp223/H ₂ O	Asp223/H ₂ O	Asp223/H ₂ O	Asp223
O3'	Asp223/Lys228	Asp223/Lys228	Asp223/Lys228	Asp223/Lys228
Pirofosfat				
OP1A	Arg47	Arg47/Arg47	2 H ₂ O	Arg47/Arg47
OP1B	H ₂ O	2 H ₂ O	H ₂ O	
OP2A	Arg369/Arg47	Arg369/Arg47	Arg369/H ₂ O	Arg369/Arg47
OP2B	Val203/H ₂ O	Gly202/Val203/H ₂ O	Cys202/Val203	Gly202/Val203
Ribosa				
O2'	Ser48/His51	Thr48	Thr48	Thr48
O3'	Ile269/His51	Ile269/His51	H ₂ O	Ile269/Val294
Nicotinamida				
O7	Phe319	Phe319/Thr178	Phe319	Phe319/Thr178
N7	Val292/Ala317	Val292/Ala317	Val292/Thr317	Ser292/Cys317

Les dades d'aquesta Taula han estat extretes de Eklund i col., 1984; Hurley i col., 1991; Xie i col., 1997; Svensson i col., 2000. (--) No s'observa interacció amb cap molècula d'aigua.

L'anàlisi de l'estructura tridimensional de diferents ADHs dependents de NAD(H) suggereix que el residu Asp223 és essencial per donar especificitat a l'enzim envers al NAD(H) per sobre del NADP(H). Aquest residu forma ponts d'hidrogen amb els grups 2' i 3'-hidroxil de la ribosa de l'adenosina del NAD(H) (Eklund i col., 1984; Hurley i col., 1991; Xie i col., 1997; Svensson i col., 2000; Taula 9). En ADH8, la substitució D223G podria relacionar-se amb la seva major afinitat pel NADP(H). La presència d'Asp223 a ADH8 generaria impediments estèrics i electroestàtics que dificultarien la correcta inserció del grup 2'-fosfat del NADP(H) dins del centre de fixació del coenzim. Aquest efecte seria evitat amb la presència d'un residu petit i neutre com la Gly223.

ADH8 presenta, a les posicions veïnals 224 i 225, una Thr i una His, respectivament, el que representa un canvi significatiu respecte a les ADHs dependents de NAD(H), on hi trobem de manera molt conservada Ile/Leu224 i Asn225 (Taula 8). Aquestes substitucions conformarien un entorn més polar, afavorint-se la inserció del grup 2'-fosfat del NADP(H). Per altra banda, residus hidrofòbics en les posicions 224 i 269 són importants per a la unió de l'anell de l'adenina (Eklund i col., 1987). ADH8 presenta en aquestes dues posicions Thr224 i Ala269. Aquests canvis podrien implicar l'afebliment de la interacció amb el coenzim i l'augment dels valors de la k_{cat} per part d'ADH8. En aquest mateix sentit, la mutació I224G, realitzada experimentalment a l'ADH1 de cavall, ocasionà una forta disminució de l'afinitat de l'enzim respecte pel NAD(H) (Fan i Plapp, 1995).

Altres MDR dependents de NADP(H), com les poliol deshidrogenases (PDH) dels microorganismes *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Burdette i col., 1996), *Thermoanaerobacter brockii*, *Clostridium beijerinckii* (Korkhin i col., 1998) i *Entamoeba histolytica* (Kumar i col., 1992), presenten també una Gly i dos residus més polars a les posicions equivalents a la 223, 224 i 225, respectivament (Taula 8). Per altra banda, les cinamil alcohol deshidrogenases (CAD), enzims dependents de NADP(H), tampoc presenten Asp223, però en aquest cas trobem en la posició equivalent una Ser i residus més polars en les posicions veïnals (Taula 8). Diferents treballs han intentat revertir l'especificitat de coenzim, tant de MDR dependents de NAD(H) com de NADP(H), mutant la posició 223. Malgrat que s'aconseguia una disminució de

l'eficiència catalítica envers el coenzim silvestre, no s'invertia l'especificitat de coenzim (Fan i col., 1991; Lauvergeat i col., 1995). El mateix comportament s'observà per a altres oxidoreductases (Feeney i col., 1990; Chen i col., 1991). Aquests resultats suggereixen que l'especificitat de coenzim en les ADHs no depèn de la substitució d'un únic residu.

En enzims dependents de NADP(H), és necessària la presència d'una o més càrregues positives en el seti d'unió a l'adenosina per estabilitzar la càrrega negativa addicional del grup 2'-fosfat del coenzim (Carugo i Argos, 1997). Tant les CAD com les PDH dependents de NADP(H) de microorganismes hi presenten un residu bàsic (Arg o Lys) (Taula 8). ADH8 presenta Lys228, que es troba força conservada en ADHs dependents de NAD(H), on es troba interaccionant amb l'oxigen 3' de la ribosa (Eklund i col., 1984; Hurley i col., 1991; Xie i col., 1997; Svensson i col., 2000; Taula 9), però que en ADH8 podria afavorir la seva especificitat per al NADP(H).

La particular especificitat de coenzim de l'ADH8, en comparació amb les restants ADHs de vertebrat, fan que la resolució de l'estructura tridimensional d'aquesta proteïna, així com l'estudi de la implicació dels residus Gly223, Thr224 i His225, siguin particularment interessants. Per altra banda, la informació estructural obtinguda serà clau per determinar si ADH8 es pot considerar realment una nova classe del sistema ADH de vertebrats.

