

**Estudis Estructurals i Funcionals
d'Oxidoreductases Actives
amb Retinoides i Etanol**

Estudis estructurals i funcionals d'oxidoreductases actives amb retinoides i etanol

Tesi presentada per adquirir el grau de Doctor en Ciències Biològiques per en

Bernat Crosas i Navarro

Llicenciat en Ciències Biològiques, Especialitat Fonamental

Treball Realitzat al

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Unitat de Ciències,

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

Bernat Crosas i Navarro

Bellaterra, 27 de juny del 2001

A la meva família

Lliris, penseu que
aquell qui us mira
està viatjant

Sôgui

Agraïments,

El pas del temps ha convertit la meua llista d'agraïments en un petit testimoni autobiogràfic. Permeteu-me, doncs, que els presenti en ordre quasi-cronològic.

Als meus pares, que ho han fet possible tot. A la mare, la seva lluita i generositat, l'ajuda constant. Al pare, la seva energia i suport. Als meus germans, el camí fet junts; Al Josep, el què m'ha ensenyat, l'estímul per aprendre i les excursions terapèutiques. També li agraeixo que hagi tingut la Mònica i la Inés. A la Imma, tot el que hem pogut compartir, la seva magnífica presència i la seva proximitat. Al Joan, la seva força positiva, la seva constància i ser el pare del Pol. A el Xavi, la seva vida exòtica i imprevisible, i el seu sentit de l'humor. A la Mercè, haver estat sempre la meua germaneta, el seu saber estimar en la distància i ser la mare de l'Eli. A més, acollir-me, com ja ho fa ara, a casa seva. A la Mònica, la Inés, l'Eli i el Pol, per la seva esplèndida manera de recordar-me el significat de la paraula vida.

A la Sonsoles, li agraeixo especialment haver-me ajudat a convertir aquesta Tesi en un document presentable, fins i tot bonic.

Als amics de tota la vida, i quan dic tota la vida vull dir tota la vida, els grans moments viscuts. Especialment, David Serra, Jordi Carrasco i Martin. I, evidentment, els que van aparèixer després, com la Roser i La Lola.

Per als amics de Biologia faig un apartat especial. A la Neus, pràcticament li ho puc agrair tot, però el més important, l'amor compartit. Al David Comas, Jordi Marron i la Laura Sánchez, ser un trio de gran amistat. Al David Comas, a més, li agraeixo la seva mà en els arbres filogenètics. A l'Anna Ruiz, Marià, Bea, Laura Llorens, Julió, Sergio i Anna Estrada haver passat tants moments de la carrera junts.

A l'Autònoma, els agraïments es multipliquen.

Al Jaume Farrés i Xavier Parés, haver-me acceptat en el seu grup i donar-me l'oportunitat de posar un peu al món de la ciència. A més, el gran suport donat durant tots aquests anys. Al Jaume, a més, li agraeixo que s'hagi ocupat dels últims detalls de la Tesi. A l'Alberto, la seva singular amistat. També, haver compartit acudits, "poiata" i projecte, i tot el que vaig aprendre amb ell de l'ADH. Al "Giuseppe-Maria" li agraeixo la seva diferència i haver rigut junts tants cops.

A la Susana li agraeixo que sigui una persona única i tot el que m'ha donat. A més, que hagi fet un camí paral·lel al meu, en aquesta Tesi.

A la Chari, les seves pacients explicacions i la disposició per ajudar.

A l'Abdellah li agraeixo tanta i tanta feina feta junts.

A la Sílvia, Albert, Emma, Dámaso, Júlia, Ana María, Oriol i Sergio, ser uns bons companys de laboratori i de fatigues.

Al Salva, haver imprès pacientment totes les còpies de la Tesi, i la seva energia matutina.

Al Joan, Franqui, Ignasi i David, haver fet un grup d'amics durant els primers anys: excursions, colesterol, etc.

A la resta dels membres del Departament, l'ajuda i bona relació que m'han ofert.

Al Bengt Persson, Ella Cederlund i Hans Jörnvall l'esplèndida feina feta conjuntament.

A tots, moltes gràcies.

Presentació

Quan es va iniciar aquesta Tesi Doctoral, en el nostre grup, començaven a confluïr la recerca enzimològica clàssica i la biologia molecular. Els estudis que van precedir l'inici d'aquest treball s'havien enfocat cap a la caracterització d'una forma d'alcohol deshidrogenasa present en la mucosa del tracte digestiu d'home i de rata. La demostració de que aquesta forma divergia cinèticament de l'alcohol deshidrogenasa hepàtica (classe I o ADH1), en un principi, i la constatació posterior de que es tractava d'una classe estructuralment diferenciada (l'anomenada classe IV o ADH4), va configurar el punt de partida d'aquest treball. Així, en un sentit més ampli, els projectes de recerca del grup referits a l'ADH4 es van encaminar a explicar la base estructural que la diferenciava de l'ADH1 i que conferia a les formes humana i de rata propietats cinètiques molt diferents enfront de l'etanol. A més, una altra qüestió oberta era si l'ADH4 era exclusiva de mamífer o bé si estava també present en altres vertebrats. Tots dos enfocats buscaven respostes a la pregunta de quina era la funció biològica d'aquesta nova classe d'alcohol deshidrogenasa.

El primer que es va abordar va ser la determinació de l'estructura primària completa de l'ADH4 humana, de la qual només se'n coneixien alguns fragments parcials obtinguts per anàlisi de pèptids, en col·laboració amb el grup del Prof. Hans Jörnvall, del Karolinska Institutet d'Estocolm. Es va optar, doncs, per la clonació del seu cDNA mitjançant el triatge d'una biblioteca de cDNA d'estómac humà, utilitzant com a sonda l'únic DNA del qual es disposava: un fragment del cDNA de l'ADH4 de rata (Moreno, 1994). Per homologia, la sonda heteròloga va permetre la identificació de clons que contenien el cDNA buscat, i la seva seqüenciació.

Posteriorment, amb l'objectiu d'aprofundir en la relació estructura/funció de l'ADH4 humana i de rata, es va procedir a l'estudi de la rellevància funcional de la posició 294, que presenta una valina en la forma humana i una alanina en la de rata. Aquesta posició està situada en la regió intermèdia de la cavitat d'unió del substrat, i la substitució esmentada és el canvi més significatiu entre l'enzim humà i el de rata. Així, es va fer un treball paral·lel de mutagènesi dirigida d'aquest aminoàcid, realitzant substitucions recíproques en els dos enzims. Una part d'aquest estudi (l'expressió en *E. coli* de l'ADH4 humana, la seva mutagènesi i exhaustiva caracterització) va ser realitzada pel Dr. Allali-Hassani (Allali-Hassani, 1997). Per a dur a terme l'altra part de l'estudi es va clonar el cDNA de l'ADH4 de rata a partir d'una biblioteca de cDNA, es va expressar en *E. coli* i es va obtenir el mutant Ala294Val. Es van caracteritzar l'enzim recombinant i el mutant amb etanol i retinoides. També es va desenvolupar un model molecular de l'estructura tridimensional de l'enzim ADH4 de rata i es va comparar amb la de l'enzim humà, resolta cristal·logràficament. A més, es van fer

simulacions de la interacció de retinoides amb els dos enzims, mitjançant estudis de docking.

D'altra banda, el treball de caracterització de les possibles formes ADH4 en altres espècies va portar al nostre grup a la identificació d'una forma present en la mucosa digestiva de l'amfibi *Rana perezi*, que mostrava analogies estructurals i funcionals amb els enzims ADH4 de mamífer. La determinació parcial de la seva seqüència d'aminoàcids va suggerir que aquesta forma d'alcohol deshidrogenasa era dependent de NADP(H) en lloc de NAD(H), degut a la substitució de l'aspàrtic 223 per glicina. Els estudis cinètics subsegüents van confirmar una especificitat de coenzim fins aleshores inèdita entre les alcohol deshidrogenases de vertebrat (Peralba, 1997). Per a obtenir l'estructura primària completa d'aquest enzim es va procedir a la clonació del seu cDNA, utilitzant la PCR i estratègies d'amplificació dels extrems de cDNA.

Prosseguint amb la determinació de la presència en altres espècies de formes anàlogues a l'ADH4, ja fossin dependents de NAD(H), com les de mamífer, o dependents de NADP(H), com la trobada en amfibi, es va estudiar el pollastre, com a espècie model de les aus. Es va identificar un enzim amb activitat alcohol deshidrogenasa i amb preferència per NADP(H), que s'expressava en el tracte digestiu superior i en ull. La impossibilitat d'obtenir el seu cDNA per PCR utilitzant oligonucleòtids basats en regions consens de les alcohol deshidrogenases ja conegudes, va forçar a la purificació de la proteïna i a la seva seqüenciació parcial. Els fragments seqüenciats van donar un resultat sorprenent, ja que corresponien a una oxidoreductasa d'una família molt allunyada de les alcohol deshidrogenases estudiades en el nostre grup. Es tractava d'una aldo-ceto reductasa, que presentava la peculiaritat de ser activa amb etanol i amb retinoides, un fet fins aquell moment mai observat en aquesta família. Es va clonar el cDNA de l'aldo-ceto reductasa i es va obtenir la seva seqüència completa. Es va estudiar el patró d'expressió del gen per transferència Northern. Es van obtenir les constants cinètiques de l'enzim amb diversos substrats, incloent retinoides. Per a estudiar la base estructural de les propietats de l'enzim, es va desenvolupar un model molecular i es van realitzar simulacions de docking.

Aquests treballs constitueixen el nucli de la present Tesi Doctoral, la qual és presentada com a compendi d'articles científics.

Llistat d'articles

El material de la present Tesi Doctoral ha estat publicat en els següents articles:

- I. Farrés, J., Moreno, A., Crosas, B., Peralba, J.M., Allali-Hassani, A., Hjelmqvist, L., Jörnvall, H., Parés, X. (1994). Alcohol dehydrogenase of class IV (**ss**-ADH) from human stomach. cDNA sequence and structure/function relationships. *Eur. J. Biochem.* **224**, 549-557.
- II. Allali-Hassani, A., Crosas, B., Parés, X. i Farrés, J. (2001) Kinetic effects of a single-amino acid mutation in a highly variable loop (residues 114 to 120) of class IV ADH. *Chem. Biol. Interact.* **130-132**, 435-444.
- III. Crosas, B., Allali-Hassani, A., Martínez, S.E., Martras, S., Persson, B., Jörnvall, H., Parés, X., Farrés, J. (2000) Molecular basis for differential substrate specificity in class IV alcohol dehydrogenase: A conserved function in retinoid metabolism but not in ethanol oxidation. *J. Biol. Chem.* **275**, 25180-25187.
- IV. Peralba, J.M., Cederlund, E., Crosas, B., Moreno, A., Julià, P., Martínez, S.E., Hjelmqvist, L., Persson, B., Farrés, J., Parés, X., Jörnvall, H. (1999) Structural and enzymatic properties of a gastric NADP(H)-dependent and retinal-active alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **274**, 26021-26026.
- V. Crosas, B., Cederlund, E., Torres, D., Jörnvall, Farrés, J., H., Parés, X. (2001) A vertebrate aldo-keto reductase active with retinoids and ethanol. *J. Biol. Chem.* **276**, 19132-19140.

Índex

	PÀGINA
Introducció	1
Oxidoreductases d'alcohols i aldehids.....	3
Rellevància fisiològica de les superfamílies MDR, SDR i AKR.....	5
L'alcohol deshidrogenasa de la família MDR.....	7
ADH1.....	10
ADH2.....	14
ADH3.....	14
ADH4.....	16
Altres classes d'ADH.....	18
Propietats estructurals i Mecanisme de l'ADH.....	21
ADH de la família SDR.....	25
Retinol deshidrogenases i retinal reductases de la família SDR.....	25
Retinol deshidrogenases hepàtiques.....	26
Retinol deshidrogenases oculars.....	27
Característiques estructurals de les SDR.....	28
Les aldo-ceto reductases.....	29
Aldosa reductasa.....	29
Aldosa reductasa i diabetes.....	29
Enzims afins a l'aldosa reductasa (aldosa reductasa-like).....	31
Característiques estructurals de les AKR.....	32
Objectius	35
Article I	39
Article II	53
Article III	67
Article IV	79
Article V	89
Resum de resultats i discussió	103
Les funcions etanol i retinol deshidrogenasa en ADH4 humana i de rata.....	105
Una nova especificitat de coenzim en una ADH de vertebrat.....	109
Una aldo-keto reductasa activa amb etanol i retinoides.....	113
Conclusions	117
Bibliografia	123

Abreviatures

Å	Amstrong
aa	Aminoàcid
ADH	Alcohol deshidrogenasa
AKR	Aldo-ceto reductases
ALDH	Aldehid deshidrogenasa
AR	Aldosa reductasa
C	Carboni
°C	Grau centígrad
cDNA	Àcid desoxirribonucleic complementari
CHO	Ovari d'hàmsster xinès
CRABP	Proteïna cel.lular unidora d'àcid retinoic
CRAD	cis-Retinol/androgen deshidrogenasa
CRALBP	Proteïna cel.lular unidora de retinal
CRBP	Proteïna cel.lular unidora de retinol
DNA	Àcid desoxirribonucleic
FALDH	Formaldehid deshidrogenasa dependent de glutatió
FR-1	proteïna regulada pel factor de creixement de fibroblasts
IRBP	Proteïna d'inter-fotoreceptor unidora de retinoide
kcat	Constant catalítica
Km	Constant de Michelis & Menten
M	Molar
MDR	Deshidrogenases/reductases de cadena mitjana
mg	Mil.ligram
ml	Mil.lilitre
mM	Mil.limolar
mm	Mil.límetre
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
MVDP	Proteïna de vas deferent de ratolí
N	Nitrogen
NAD ⁺	Dinucleòtid de nicotinamida-adenina (forma oxidada)
NADP ⁺	Dinucleòtid fosfat de nicotinamida-adenina (forma oxidada)

NBT	Nitro blue tetrazoli
nM	Nanomolar
p.e.	Per exemple
P450	Citocrom P450
pb	Parell de bases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PMS	Metasulfat d'N-metilfenazoni
prRDH	Retinol deshidrogenasa de fotoreceptor
PVC	Clorur de polivinil
RACE	amplificació ràpida dels extrems de cDNA
RAR	Receptor d'àcid retinoic
RARE	Element de resposta a l'àcid retinoic
RBP	Proteïna unidora de retinol
RDH	Retinol deshidrogenasa
RT	Transcriptasa reversa
RXR	Receptor X d'àcid retinoic
SDR	Deshidrogenases/reductases de cadena curta
VEGF	Factor de creixement de l'endoteli vascular
Zn	Zinc
μl	Microlitres
3D	Tridimensional

Introducció

Introducció

Oxidoreductases d'alcohols i aldehids

La conversió reversible dels alcohols als respectius aldehids/cetones es realitza en la natura per l'acció de deshidrogenases/reductases de cadena mitjana (MDR), deshidrogenases/reductases de cadena curta (SDR) i aldo-ceto reductases (AKR) (Jörnvall et al., 1993; Persson et al., 1994; Persson et al., 1995; Jez et al., 1997a). Aquests tres grups aglutinen un gran nombre de proteïnes emparentades estructuralment. A principis dels anys 80 es va proposar una divisió de les alcohol oxidoreductases en funció de la longitud de la cadena polipeptídica. Així, es van posar de relleu les semblances entre l'alcohol deshidrogenasa (ADH) hepàtica i la sorbitol deshidrogenasa, amb estructures primàries d'uns 370 aminoàcids (MDR), i entre l'alcohol deshidrogenasa de *Drosophila* i la ribitol deshidrogenasa, amb estructures primàries d'uns 250 aminoàcids (SDR) (Jörnvall et al., 1981). Posteriorment, s'han identificat moltes estructures relacionades amb un o altre dels dos grups, i en l'actualitat MDR i SDR designen dues grans superfamílies enzimàtiques. El terme AKR va aparèixer els anys 70 quan es va descriure una daunorubicina reductasa de fetge de rata (Felsted et al., 1974), però no va ser fins a finals dels anys 80 quan es va utilitzar per definir la superfamília (Bohren et al., 1989).

Els enzims de la família MDR estan constituïts per membres amb subunitats d'aproximadament 350 aminoàcids, la majoria amb un o dos àtoms de zinc (Jörnvall et al., 1993), que contenen un domini característic format per hèlix α i fulles β , anomenat plegament de Rossmann (Rossmann et al., 1974). En aquest grup, s'hi troben famílies diverses com l'alcohol deshidrogenasa de fetge de vertebrat, la treonina deshidrogenasa, la quinona oxidoreductasa i la p -cristal·lí de l'ull. Actualment, es poden obtenir dels bancs de dades fins a l'entorn de 500 seqüències MDR.

Els enzims de la família SDR tenen subunitats d'aproximadament 250 aminoàcids, amb el seti actiu format pel patró TyrXXXLys (Persson et al., 1991). Aquesta superfamília està constituïda per grups enzimàtics distants, com les alcohol deshidrogenases de *Drosophila*, les ribitol deshidrogenases, les glucosa deshidrogenases, les hidroxiesteroide deshidrogenases, les prostaglandina deshidrogenases i les retinol deshidrogenases/retinal reductases. S'han identificat fins a prop de 1000 seqüències SDR, incloent-ne aproximadament dues centes de grups més distants, com epimerases, isomerases o deshidratases (Jörnvall et al., 1995). Les SDR mostren una arquitectura força conservada, presentant un sol domini proteic, constituït pel plegament de Rossmann, present també en les MDR.

Les AKR són enzims monomèrics d'aproximadament 320 aminoàcids que mostren un plegament de barril (α/β)₈. El seu seti actiu està format per una tètrada catalítica, constituïda per Tyr, Asp, Lys, His. Entre les AKR hi trobem les aldosa reductases, les aldehyd reductases, les hidroxisteroide deshidrogenases, les aflatoxina reductases i la p-cristal·lí d'amfibi (Jez et al., 1997b). Actualment hi ha caracteritzades fins a una cinquantena d'enzims d'aquesta superfamília i, a més, en els bancs de dades es poden identificar prop de 120 seqüències potencials d'AKR.

TAULA I. Característiques de les tres famílies d'oxidoreductases d'alcohols i aldehyds.

	MDR	SDR	AKR
Estructura 1 ^{ària}	370 aa	250 aa	320 aa
Estructura 3 ^{ària}	Rossmann	Rossmann	barril (α/β) ₈
Estructura 4 ^{ària}	dímer/tetràmer	Monòmer/dímer/ Tetràmer	monòmer
Seti actiu	Zn	TyrXXXLys, (Ser)	Tyr, Asp, Lys, His
Coenzim més utilitzat	NAD	NAD(P)	NADP

L'anàlisi de les seqüències ha permès deduir-ne les relacions filogenètiques. Les MDR i les SDR tenen un origen evolutiu comú. Les successives duplicacions d'un gen ancestral va generar la separació de les dues superfamílies (Jörnvall et al., 1981). Les AKR, per la seva banda, formen part de l'embranchament de les proteïnes barril (Rondeau et al., 1992; Wilson et al., 1992), també molt abundants en la natura, i per a les quals s'ha proposat un origen per duplicació i fusió d'un ancestre comú de mig-barril (Miles i Davies, 2000) que, al seu torn, hauria aparegut per la duplicació repetitiva d'una unitat estable més petita (Thornton et al., 1999).

Rellevància fisiològica de les superfamílies MDR, SDR i AKR

Una gran quantitat de molècules amb grups hidroxil o carbonil són substrats d'aquestes tres superfamílies, les quals presenten activitat amb compostos de característiques diverses pel que fa a la grandària, hidropaticitat o estructura. Molts d'aquests compostos, o bé es generen endògenament en els éssers vius o bé arriben a l'organisme d'una manera exògena, per la qual cosa aquestes oxidoreductases estan involucrades en un elevat nombre de vies metabòliques i processos d'interès biomèdic (Taules II i III).

TAULA II. Diversitat de substrats en les ADH de la família MDR.

Substrat	Via metabòlica o procés	Referències
Etanol i alcohols alifàtics	Metabolisme etanol i alcoholisme Destoxificació	Crabb et al., 1987 Boleda et al., 1989 Moreno et al., 1991
Esteroides	Metabolisme hormonal Metabolisme colesterol Metabolisme esterols cardíacs Epimerització àcids biliars	Björkhem et al., 1973 Cronholm et al., 1975 Frey and Vallee, 1980 Pietruszko, 1982 Okuda and Okuda, 1983 McEvily et al., 1988 Park and Plapp, 1991 Kedishvilli et al., 1997 Marschall et al., 2000
4-Hidroxinonenal, hexenal	Peroxidació lipídica i estrès oxidatiu	Sellin et al., 1991 Boleda et al., 1993 Allali-Hassani et al., 1998
ω -Hidroxiàcids grassos	Oxidació àcids grassos	Bjorkhem et al., 1973 Ditlow et al., 1984 Wagner et al., 1984 Allali-Hassani et al., 1998
Retinoides	Manteniment i proliferació cel.lular Regulació gènica Cicle visual Homeòstasi retinoides	Boleda et al., 1993 Yang et al., 1994 Kedishvili et al., 1997 Allali-Hassani et al., 1998
Amines biògenes	Metabolisme serotonina i catecolamines	Mårdh et al., 1985, 1986 Consalvi et al., 1986
S-Hidroximetilglutació	Eliminació formaldehid	Koivusalo et al., 1989

Els membres de les tres superfamílies exhibeixen eventualment activitat amb els mateixos substrats. En alguns casos, aquesta convergència implica que espècies diferents no utilitzin enzims homòlegs per a desenvolupar una mateixa funció, sinó membres de famílies diferents.

Un cas paradigmàtic d'aquest fenomen és la funció etanol deshidrogenasa, que en vertebrats, llevats i procariotes és duta a terme per ADHs-MDR i que en *Drosophila* la realitza una ADH-SDR. En altres casos, el que s'observa és que una mateixa espècie està dotada d'enzims de famílies diferents que mostren activitat amb els mateixos substrats. Per exemple, en home, rata i ratolí hi ha esteroide deshidrogenases de les MDR, SDR i AKR.

TAULA III. Diversitat de substrats en les famílies SDR i AKR.

	Substrat	Via metabòlica o procés	Referències
SDR	Etanol i alcohols alifàtics	Metabolisme alcohols en <i>Drosophila</i>	Deltombe et al., 1979 Winberg et al., 1982
	Retinoides	Manteniment i proliferació cel.lular Regulació gènica Cicle visual	Chai et al., 1995 Napoli, 1999 Napoli, 2001
	Esteroides	Metabolisme hormonal Activació andrògens i estrògens Desenvolupament càncer	Maser i Oppermann, 1997 Duax et al., 2000 Napoli, 2001
	Prostaglandines	Inactivació prostaglandines	Mak et al., 1982 Jörnvall et al., 1995
	Àcids biliars	Epimerització dels àcids biliars	Filling et al., 1999
AKR	Glucosa, trioses	Retinopatia, nefropatia, neuropatia i complicacions vasculars en diabetis	Gabbay, 1975 Wermuth et al., 1982 Kinoshita et al., 1988 Van der Jagt et al., 1992
	Esteroides Isocaproaldehid	Metabolisme hormonal Activació andrògens i estrògens Metabolisme colesterol	Penning et al., 1996 Matsuura et al., 1996
	4-Hidroxinonenal	Peroxidació lipídica i estrès oxidatiu	Vander Jagt et al., 1995 Muzio et al., 1999
	Amines biògenes	Metabolisme catecolamines	Turner et al., 1974 Kawamura et al., 1999
	Prostaglandines	Processos inflamatoris Metabolisme broncoconstrictors	Penning i Talalay, 1983 Wermuth, 1981
	Clordecona, aflatoxina	Destoxificació	Molowa et al., 1986 Hayes et al., 1993 McLeod et al., 1997

L'alcohol deshidrogenasa de la família MDR

L'ADH (EC 1.1.1.1) és un enzim citosòlic que presenta multiplicitat de formes, i es troba àmpliament distribuït a la natura en microorganismes, plantes i animals. En animals superiors es localitza principalment en fetge, epitelis i mucoses. Cada subunitat conté dos àtoms de zinc, un dels quals intervé en la catàlisi. Majoritàriament, el coenzim de la reacció és el NAD(H), malgrat que en alguns casos ho és el NADP(H).

El sistema ADH humà és el que presenta major complexitat de tots els que s'han estudiat. Actualment, hi ha identificats set gens, dos dels quals presenten al·lèlisme, que codifiquen fins a un total de nou subunitats (Duester et al., 1999). La primera divisió de les ADH humanes es va fer en tres classes (I-III), d'acord amb propietats cinètiques, fisico-químiques, de mobilitat en electroforesi en gel de midó (Quadre 1), i de sensibilitat davant de l'inhibidor 4-metilpirazole (Vallee i Bazzone, 1983). La determinació de l'especificitat de substrat suggeria una funció diferenciada per a cada una de les classes. A més, la determinació de llurs estructures primàries i seqüències gèniques va indicar que es tractaven realment de loci diferenciats (Hempel et al., 1984; Jörnvall et al., 1984; Duester et al., 1984; Bühler et al., 1984; Ikuta et al., 1985; Hempel et al., 1985; von Bahr-Lindstrom et al., 1986; Höög et al., 1986; Höög et al., 1987; Kaiser et al., 1988). Posteriorment, es van identificar les classes IV (Parés et al., 1992) i V (Yasunami et al., 1991), essent aquesta última detectada només a nivell de cDNA. Típicament, la identitat de seqüència entre membres de les diferents classes és aproximadament del 60%. La comparació de seqüències d'ADH en mamífers indica que la identitat entre membres d'una mateixa classe d'espècies diferents és superior al 80%.

La progressiva caracterització de les subunitats, així com l'elucidació de les seqüències, i els criteris divergents a l'hora de classificar-les han generat incoherències en la nomenclatura, obligant, recentment, a proposar-ne una d'unitària (Duester et al., 1999). Així, els gens humans que pertanyen a la classe I, que codifiquen les subunitats α , β i γ , s'anomenen ADH1A, ADH1B i ADH1C, i les especificacions al·lèliques s'indiquen ADH1B1, ADH1B2, ADH1B3, ADH1C1 i ADH1C2. La resta de gens invoquen la classe amb la seva numeració. Igualment, en la resta d'espècies, el nombre de la classe s'assigna al gen (en cursiva) i a l'enzim (Taula IV).

TAULA IV. Nomenclatura proposada per a les ADH d'alguns vertebrats (Duester et al., 1999).

Espècie	Classe						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
humana	ADH1A (α) ADH1B (β) ADH1C (γ)	ADH2(π)	ADH3(χ)	ADH4(σ)	ADH5	-	-
rata	ADH1	ADH2	ADH3	ADH4	-	ADH6	-
ratolí	ADH1	ADH2	ADH3	ADH4	-	-	-
cavall	ADH1E ADH1S	-	ADH3	-	-	-	-
pollastre	ADH1	-	ADH3	-	-	-	ADH 7
granota	ADH1	-	ADH3	-	-	-	-

En les ADH humanes, s'ha indicat entre parèntesi la nomenclatura clàssica de les subunitats enzimàtiques amb lletres gregues.

QUADRE 1. Electroforesi en gel de midó i detecció de l'enzim actiu

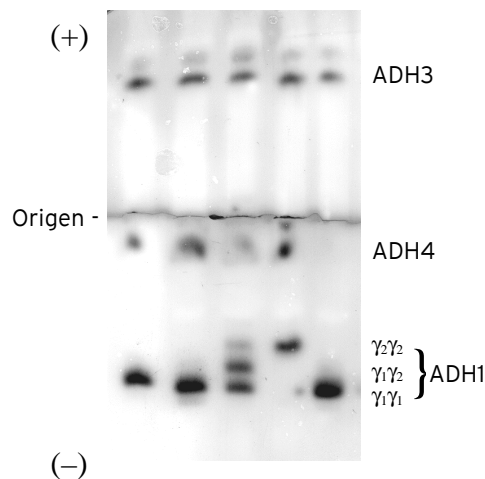
L'electroforesi en gel de midó és un mètode clàssic per a la detecció de formes enzimàtiques amb activitat ADH. Des de que va ser descrit (Wagner-Romero, 1964) i utilitzat en la determinació de l'heterogeneïtat de l'ADH de fetge (McKinley-McKee i Moss, 1965), ha estat emprat ininterrompudament en els treballs de caracterització d'enzims ADH. Abans de l'arribada de la biologia molecular, el gel de midó era utilitzat en la determinació del genotip ADH1B i ADH1C en humans. Actualment continua essent una tècnica poderosa en la detecció d'enzims encara no descrits. Tot i consistir en un sistema força simple, és molt informatiu en la caracterització preliminar dels enzims, ja que, a més d'indicar la presència de la forma activa, permet discriminar diferents enzims d'una mateixa família i assenyala propietats fisico-químiques, que poden ser utilitzades en la purificació de l'enzim actiu a partir del teixit.

El gel es prepara amb midó hidrolitzat (10-16%) especial per a electroforesi i amb coenzim (NAD⁺ o NADP⁺) a una concentració que garanteixi condicions de saturació (la presència del coenzim en el gel permet una migració més nítida de l'enzim i facilita la reacció de tinció). El midó es suspèn en tampó d'electroforesi (220 ml, Tris 20 mM) i s'ajusta al pH que es desitgi. La suspensió s'escalfa a la flama fins que adopta una coloració transparent i modifica la seva viscositat, moment en el qual es desgasifica amb una trompa de buit. Al damunt d'una placa de refrigeració s'hi munta, amb peces de tefló, un motllo (aproximadament, 100 x 200 x 3 mm) per al gel i s'hi aboca la preparació de midó fos. Després, es tapa el motllo amb un vidre gruixut i es deixa refredar a 4°C.

L'electroforesi es realitza en una cubeta (Multiphor II, Amersham Pharmacia Biotech) que contingui 2 l de tampó Tris/HCl 0,3 M al pH convingut, a 4°C, repartits entre el càtode i l'ànode. En el càtode s'hi afegeixen 200 mg de coenzim. El gel ja sòlid i refrigerat es situa al damunt de la cubeta i es connecta als electrodes mitjançant retalls de paper Whatman nº 1. Les mostres de teixit s'homogenitzen en tampó d'electroforesi i s'apliquen (10 µl) amb retalls petits (3 x 5 mm) de paper Whatman, que s'han de col·locar perforant l'equador del gel. Quan s'han carregat totes les mostres es tapa el gel amb plàstic PVC i s'hi col·loca al damunt una placa refrigerant de vidre (Multiphor II), la qual, juntament amb el suport refrigerant del gel, està connectada a un circuit de refrigeració. Els electrodes es connecten a una font d'alt voltatge (model 2197, Amersham Pharmacia Biotech) i es realitza l'electroforesi en condicions limitants de 720 V i 60 mA, durant 5 hores.

El mètode de tinció es basa en que el coenzim reduït, resultant de la reacció d'oxidació de l'alcohol, cedeix l'electró a una substància que dóna coloració en reduir-se. Així, un cop acabada l'electroforesi, el gel s'incuba en una solució de Tris/HCl 50 mM (500 ml) que conté 200 mg de coenzim, 100 mg de NBT i 10 mg de PMS. Aquesta solució s'ha de protegir de la llum. La solució amb el substrat s'aboca damunt del gel i la reacció comença. El gel s'ha de tapar i incubar aproximadament 1 h a 40 °C.

L'elecció del substrat pot permetre una tinció selectiva dels enzims. L'alcohol crofíllic (2-buten-1-ol, 100 mM) sol ser un substrat genèric per a les alcohol deshidrogenases i s'utilitza freqüentment en aquesta tècnica, així com l'etanol i alguns altres alcohols alifàtics.



Electroforesi en gel de midó, amb mostres de teixits gastrointestinals humans (cedida per S. Martínez).

ADH1

L'ADH1 és l'enzim característic de fetge de vertebrat, amb activitat etanol deshidrogenasa, encara que es pugui trobar en altres teixits i que presenti una especificitat de substrat molt àmplia. L'ADH1 humana, que ha estat exhaustivament estudiada, és activa amb alcohols alifàtics primaris i secundaris, alcohols cíclics i aromàtics (von Wartburg et al., 1964; Blair i Vallee, 1966; Pietruszko et al., 1973; Pietruszko, 1979).

Els alcohols alifàtics primaris presenten valors de K_m que decreixen en augmentar el nombre de carbonis del substrat, des de 150 mM amb metanol fins a 8 μ M amb octanol (Wagner et al., 1983; Deetz et al., 1984). No obstant, els valors de k_{cat} es mantenen constants. Així, el metanol és aquell que presenta una menor eficiència catalítica. Un comportament similar es pot observar en la reducció dels corresponents aldehids alifàtics primaris. Els millors substrats alcohols coneguts són l'octanol, l'àcid 16-hidroxihexadecanoic, el ciclohexanol i l'alcohol benzílic.

Altres substrats dels isoenzims de la classe I podrien tenir rellevància fisiològica. S'ha trobat activitat amb retinoides (Reynier, 1969; Kim et al., 1992; Boleda et al., 1993; Yang et al., 1994), hidroxiesteroides (McEvily et al., 1988), esteroides cardíacs (Frey i Vallee, 1979), ω -hidroxiaïdics grassos (Bjorkhem, 1973; Wagner et al., 1983) i compostos derivats de catecolamines (Mårdh et al., 1985; Mårdh et al., 1986). Entre diversos compostos inhibidors de l'ADH1 destaca l'inhibidor competitiu pirazole, i, especialment, els seus derivats en la posició 4 de la molècula, com el 4-metilpirazole.

L'ADH1 humana consta de tres gens (ADH1A, ADH1B i ADH1C) que codifiquen les subunitats α , β i γ , respectivament. Tot i que 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·lèlisme. Els al·lels ADH1B1, ADH1B2, ADH1B3 codifiquen les subunitats β_1 , β_2 i β_3 , i els al·lels ADH1C1 i ADH1C2 les subunitats γ_1 i γ_2 , respectivament. Les formes al·lèliques es generen per substitucions puntuals de nucleòtids que proporcionen variacions en la seqüència d'aminoàcids i alteren les seves propietats cinètiques.

La variant al·lèlica ADH1B2 presenta una histidina en la posició 47 en substitució de l'arginina que hi ha en l'ADH1B1 (Hurley et al., 1990; Hurley et al., 1994). La posició 47 forma part de la butxaca d'unió del coenzim, concretament en el lloc de fixació del pirofosfat. L'alteració en la càrrega positiva de la cadena lateral debilita l'unió del coenzim en ADH1B2, augmentant la seva velocitat de dissociació i donant lloc a una subunitat amb major k_{cat} i activitat específica. Així, l'homodímer $\beta_2\beta_2$ presenta una k_{cat} amb l'etanol de 400 min^{-1} , mentre que $\beta_1\beta_1$ en presenta una de 9,2 min^{-1} (Bosron et al., 1985a). Aquestes diferències

cinètiques tenen probablement conseqüències en el metabolisme de l'etanol, incidint en la velocitat en que aquest és oxidat a acetaldehid. Existeixen importants variacions en la prevalència de l'ADH1B2 entre les poblacions asiàtiques (60-80%) i caucàsiques (0-10%) (Goedde et al., 1992; Borràs et al., 2000).

La variant $\beta 3$ només s'ha detectat en poblacions afroamericanes. Presenta la mutació Arg369Cys. L'arginina 369 forma part del lloc d'unió del coenzim on hi desenvolupa una funció similar a l'arginina 47, proporcionant ponts d'hidrogen per a la fixació del pirofosfat. El canvi d'arginina per cisteïna debilita la unió del coenzim i augmenta la constant catalítica de la subunitat (Bosron et al., 1985a).

Els al·lels $\gamma 1$ i $\gamma 2$ també presenten variacions en l'activitat específica, encara que la diferència entre els dos homodímers corresponents no és molt gran ($\gamma 1\gamma 1$, kcat = 87 min⁻¹; $\gamma 2\gamma 2$, kcat = 35 min⁻¹; Bosron i Li, 1986). Alguns estudis han detectat una menor prevalència d'ADH1C1 entre els alcohòlics asiàtics (Thomasson et al., 1991; Thomasson et al., 1993; Chao et al., 1997; Higuchi et al., 1996; Nakamura et al., 1996; Chen et al., 1996; Shen et al., 1997).

En poblacions asiàtiques, a més, hi ha descrit l'al·lel ALDH2.2, que codifica una varietat molt poc activa de l'aldehid deshidrogenasa (Impraim et al., 1982), l'enzim que elimina l'acetaldehid produït per l'ADH en l'oxidació de l'etanol. Una taxa d'eliminació d'acetaldehid disminuïda (per part de l'ALDH2.2) i, possiblement, la presència de formes de l'ADH més actives en la producció d'aquest compost (ADH1B2, ADH1C1), es poden correlacionar amb una simptomatologia d'aversion al consum d'alcohol, deguda a una major i més duradora concentració d'acetaldehid en els teixits. De fet, la prevalència d'ALDH2.2, ADH1B2 i ADH1C1 és més baixa en asiàtics alcohòlics que en no alcohòlics (Nakamura et al., 1996), patint els alcohòlics amb els al·lels ALDH2.2, ADH1B2 i ADH1C1 un major risc de desenvolupar patologies (Tanaka et al., 1996; Chao et al., 1997; Yamauchi, 1998). Igualment, s'ha trobat que l'al·lel ADH1B2 (Quadre 2) disminueix el risc d'alcoholisme en poblacions europees, on a més existeix associació al·lèlica entre ADH1B2 i ADH1C1 (Borràs et al., 2000).

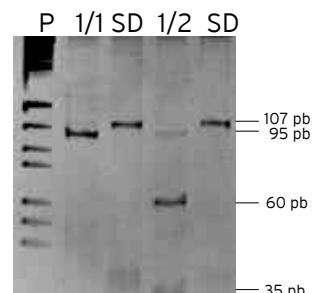
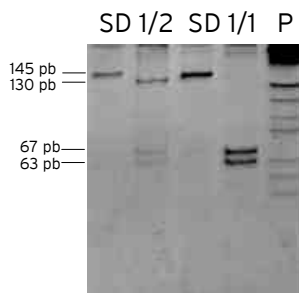
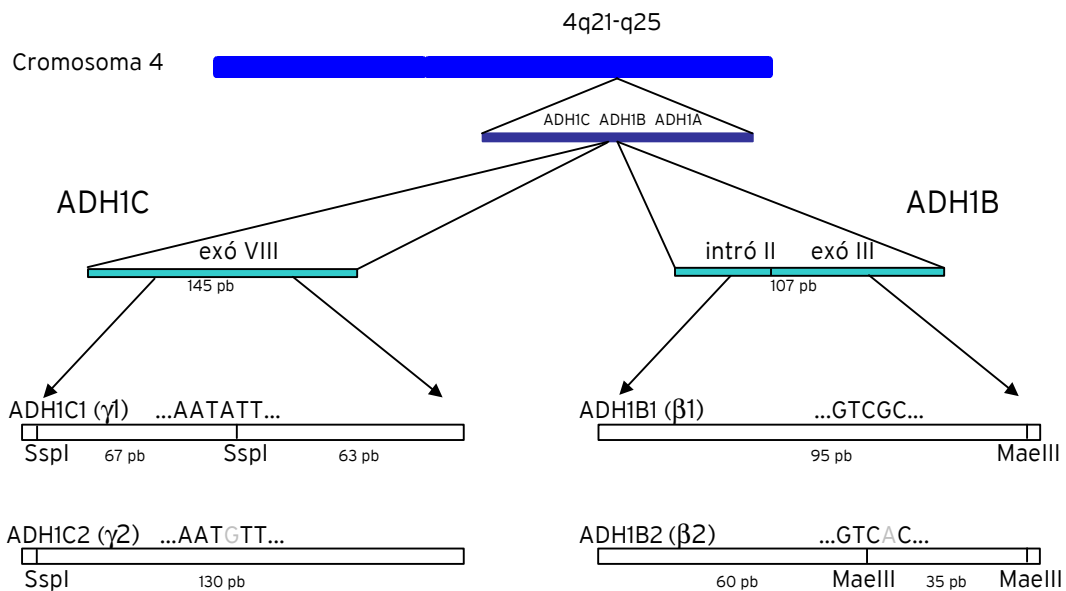
La presència d'ADH1 s'ha demostrat en totes les línies de vertebrats. A més de la seva aparent ubiqüitat en fetge de mamífer, àmpliament estudiada en home, rata, ratolí i cavall, s'ha trobat també en rèptils, amfibis, aus i peixos. La cobra (Shafqat et al., 1996a), el cocodril (Persson et al., 1993), el llangardaix (Hjelmqvist et al., 1996), la granota (Cederlund et al., 1991), el pollastre (Estonius et al., 1990), la guatlla (Nussrallah et al., 1989), l'estruç (Estonius et al., 1994b), el kiwi (Hjelmqvist et al., 1995) i el bacallà (Danielsson et al., 1992) tenen ADH1. El bacallà és el vertebrat més allunyat evolutivament dels mamífers que mostra les formes ADH1 i ADH3. L'ADH1 de bacallà ha estat estudiada per cristal·lografia de raigs X (Ramaswamy et al., 1996). És interessant que els peixos ciclòstoms mostren un enzim ADH1 amb característiques

mixtes d'ADH3 (Danielsson et al., 1994), i que *Amphioxus*, un cordat molt proper als vertebrats, no presenta ADH1 (Canestro et al., 2000).

QUADRE 2. Variació del genotip ADH1B i ADH1C en les poblacions humanes i la seva determinació mitjançant PCR.

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) s'ha convertit en un mètode poderós de recerca i diagnosi en biomedicina. Un dels nivells on aquesta tècnica ja s'utilitza rutinàriament és la determinació de la dotació genètica de la població humana, ja sigui en la diagnosi i consell mèdic, com en l'estudi de genètica de poblacions. L'anàlisi de l'al·lelisme de l'ADH1 és un exemple del gran avantatge que ha significat l'ús de metodologia del DNA, en la qual una gota de sang seca en paper de filtre és el material biològic de partida, suficient per a una completa determinació del genotip, en lloc de biòpsies de teixit humà.

L'estratègia per a determinar el genotip ADH1B1 (β 1)/ADH1B2 (β 2) i ADH1C1 (γ 1)/ADH1C2 (γ 2) per PCR es basa en la presència d'un polimorfisme en la grandària dels fragments de restricció (RFLP) en ambdós loci. La mutació puntual, que genera la diferència entre β 1 (amb Arg47) i β 2 (His47), provoca també l'aparició d'una diana de restricció per a l'enzim MaeIII. En el cas d'ADH1C, les diferències entre γ 1 i γ 2 són Arg271Gln i Ile349Val. En γ 2 desapareix una diana per a l'enzim de restricció SspI. Així, una amplificació del DNA genòmic, utilitzant com a encebadors oligonucleòtids complementaris a regions flanquejants de les mutacions, i la subsegüent digestió del producte de PCR amb els enzims de restricció assenyalats permet determinar, per anàlisi electroforètica, la presència de les variants al·lèliques (Groppi et al., 1991; Crosas, 1994; Borràs et al., 2000).



SD: producte de PCR sense digerir; P: patrons de pes molecular

Gel d'electroforesi en poliacrilamida (12%) i tinció amb bromur d'etidi.

ADH2

Aquesta classe ha estat menys estudiada que l'ADH1, i per ara no se li ha assignat una funció específica clara. La forma humana es va detectar per primer cop en fetge mitjançant electroforesi en gel de midó i es va determinar que era activa amb etanol (Li i Magnes, 1975), essent la seva possible contribució al metabolisme de l'etanol la primera qüestió a abordar. Les seves característiques cinètiques amb etanol a pH 7,5 ($K_m=34$ mM, $k_{cat}=40$ min⁻¹, Bosron et al., 1979) suggerien una contribució limitada a la seva eliminació, encara que en casos d'intoxicació alcohòlica greu, on s'assoleixen concentracions d'etanol en sang de 50-100 mM, podria arribar a ser significativa (Li et al., 1977). L'ADH2 presenta activitat amb intermediaris del metabolisme de l'adrenalina (3,4-dihidroxiandelaldehyd i 4-hidroxí-3-metoxíandelaldehyd), per la qual cosa s'ha proposat una participació en la via de degradació d'aquest compost (Mårdh et al., 1986). A més, l'ADH2 mostra activitat amb diversos alcohols i aldehids, alifàtics i aromàtics, per bé que amb una especificitat de substrat més restringida que ADH1 (Blakley et al., 1984; Ditlow et al., 1984). S'ha determinat la seva estructura primària, per anàlisi de la proteïna, del cDNA i del gen (Höög et al., 1987; von Bahr-Lindström, 1991).

L'ADH2 ha estat detectada en altres mamífers (Dafeldecker et al., 1981a i b; Seeley i Holmes, 1984; Bosron et al., 1985b; Dafeldecker et al., 1985; Höög i Svensson, 1997) i en estruç (Hjelmqvist et al., 1995). S'ha trobat activitat 9-cis-retinol deshidrogenasa en l'ADH2 de rata, i s'ha estimat la contribució d'aquest enzim en el metabolisme hepàtic d'aquest isòmer en un 2% (Popescu i Napoli, 2000). Recentment, ha estat resolta l'estructura tridimensional de l'ADH2 de ratolí (Svensson et al., 2000).

ADH3

L'ADH3 és una formaldehyd deshidrogenasa dependent de glutatió (FALDH) que constitueix una classe amb una funció específica i diferenciada de la resta de classes ADH. Es tracta d'un enzim que participa en l'eliminació del formaldehyd, un compost d'elevada toxicitat. La peroxidació lipídica (Shara et al., 1992; Bagchi et al., 1993; Moser et al., 1993), la degradació de l'adrenalina (Yu et al., 1997) i en general, les vies que inclouen desmetilació, tenen com a conseqüència la formació de formaldehyd. El formaldehyd lliure, que és molt reactiu, forma enllaços metilèn estables amb amides i amines, podent-se unir a proteïnes i DNA (Feldman, 1973). En la via de degradació del formaldehyd per part de la FALDH, el substrat real és l'S-hidroxi-metilglutatió, un compost que es genera en la reacció espontània entre el formaldehyd i el glutatió reduït. La FALDH, en presència de NAD⁺, converteix

l'S-hidroximetilglutació en S-formilglutació, el qual es dissocia en format i glutació oxidat, per acció de la S-formilglutació hidrolasa.

La importància de la funció d'eliminació del formaldehid es posa de manifest pel fet que l'ADH3 és un enzim present en tots els eucariotes i en molts procariotes, amb un nivell de conservació de seqüència entre aquests dos grups força alt (50-60%). A més, l'ADH3 és l'única classe d'ADH que s'expressa en tots els teixits. Aquesta especialització funcional l'ha fet diferenciar cinèticament i estructural de la resta d'ADH. La FALDH no es satura amb alcohols o aldehids primaris de cadena curta, pel que resulta un enzim molt ineficient en l'oxidació de l'etanol, i és pràcticament insensible a l'inhibició amb 4-metilpirazole. No obstant, sí que són bons substrats els alcohols primaris de cadena llarga (p. e., octanol) i àcid hidroxiàcids grassos (p. e., àcid 12-hidroxidodecanoic).

L'elucidació de les estructures primàries de les FALDH humana (Kaiser et al., 1988; Giri et al., 1989), de diversos vertebrats (Julià et al., 1988; Kaiser et al., 1988; Hur et al., 1992; Danielsson et al., 1994; Hjelmqvist et al., 1995a; Hjelmqvist et al., 1995b), d'algunes espècies vegetals (Martínez et al., 1996; Shafqat et al., 1996b; Dolferus et al., 1997; Fliegmann i Sandermann, 1997; Wippermann et al., 1999), de *Saccharomyces cerevisiae* (Fernández et al., 1995), i la determinació de la seva estructura terciària (Yang et al., 1996), ha permès correlacionar les característiques funcionals amb les estructurals. En el complex binari, el domini catalític mostra una conformació semioberta (Yang et al., 1996), en definir una butxaca d'unió del substrat més hidrofílica i oberta que en la resta d'ADH (Julià et al., 1987; Eklund et al., 1990). A més, estudis de mutagènesi dirigida en l'enzim humà revelen que l'Asp57 (Estonius et al., 1994a) i l'Arg115 (Engeland et al., 1993) són crucials per a l'activitat amb S-hidroximetilglutació i àcid 12-hidroxidodecanoic. Recentment, les diferències cinètiques entre l'ADH3 de *Saccharomyces cerevisiae* i la humana, aquesta última amb valors menors de K_m i k_{cat} per a l'S-hidroximetilglutació, s'han atribuït a la doble substitució Asp267Glu i Thr269Ile (Fernández et al., 1999).

La seqüència del gen ADH3 humà revela un promotor ric en G+C, mancat de caixa TATA i amb regions reguladores pròpies de gens que s'expressen independentment de teixit, la qual cosa indica una regulació molt diferent a la de la resta de classes ADH (Hur i Edenberg, 1992). Efectivament, la FALDH es pot detectar ubícuament en eucariotes, encara que també s'han observat concentracions variables del seu mRNA en diferents teixits humans (Giri et al., 1989).

ADH4

Les primeres evidències de la presència d'una activitat ADH en teixits extrahepàtics, diferenciable de l'ADH clàssica de fetge, van aparèixer en la literatura entre els anys 60s i 70s, quan diversos estudis van iniciar la caracterització d'aquesta activitat en retina de mamífer, principalment en rata (Koen and Shaw, 1966; Reading i Sorsby, 1966; Mezey et al., 1971; Graymore et al., 1974; Cederbaum et al., 1975). El primer treball publicat d'aïllament de l'enzim de retina de rata només va assolir-ne una purificació parcial (de 7,4 cops) (Watkins i Tephly, 1971). Paral·lelament, estudis en hepatoma i estómac de rata revelaven la presència d'una activitat ADH, amb un comportament cinètic amb l'etanol i una mobilitat en gel de midó a pH 8,5 molt diferent de l'ADH1 (Cederbaum et al., 1975).

Durant els anys vuitanta, en el nostre grup, es va aconseguir la purificació fins a homogeneïtat de l'enzim (Julià et al., 1983) i la seva caracterització cinètica (Parés et al., 1985). Es va realitzar un estudi comparatiu complet de les diferents ADH de rata, que va determinar que les formes d'ull i d'estómac eren el mateix enzim (Julià et al., 1987). Un enzim de característiques similars al de rata es va caracteritzar en l'estómac humà (Moreno i Parés, 1991) i se li va assignar el nom σ -ADH. La determinació de l'estructura primària de l'enzim de rata (Parés et al., 1990) va resoldre que es tractava d'una classe nova d'ADH, que es va anomenar classe IV. La determinació parcial de la seqüència proteica de l'enzim humà σ -ADH, va revelar que formava part de la mateixa classe IV (Parés et al., 1992). A més, altres laboratoris van caracteritzar un enzim amb característiques ADH4 en babuí i ratolí (Algar et al., 1983; Holmes et al., 1986a i b; Algar et al., 1992) i van determinar la seqüència de l'últim (Zgombic-Knight et al., 1995).

L'ADH4 és una forma distribuïda majoritàriament en mucoses i epitelis, essent molt abundant en la mucosa bucal, esòfag, el tracte gastrointestinal, i en teixits oculars, principalment, en la còrnia (Holmes, 1978; Julià et al., 1987; Holmes, 1988; Boleda et al., 1989; Yin et al., 1993; Moreno et al., 1994; Allali-Hassani et al., 1997). També ha estat provada la seva expressió durant el desenvolupament embrionari de ratolí, en l'etapa de gastrulació (Ang et al., 1996a). És interessant la seva presència en hepatoma de rata (Cederbaum et al., 1975), ja que en fetge se n'és absent. Recentment, s'ha trobat expressió d'ADH4 en tipus cel·lulars específics de cervell de rata (Martínez et al., 2001).

La caracterització cinètica de l'ADH4 va revelar un enzim d'elevada constant catalítica amb alcohols i aldehids alifàtics primaris i aromàtics, essent molt actiu en l'oxidació de l'etanol (Moreno i Parés., 1991; Boleda et al., 1993; Stone et al., 1993a). La k_{cat} de l'ADH4 humana amb etanol, a pH 7,5, és de 1500 min^{-1} , el valor més alt entre les ADH humanes. A rel d'aquests resultats, es va proposar una participació de l'ADH4 humana en el metabolisme de l'etanol. La

seva distribució en el tracte digestiu superior, i una Km amb etanol de 40 mM (pH 7,5) suggerien que l'enzim podia ser responsable d'un primer pas metabòlic de l'etanol o first pass metabolism. Després d'una ingesta d'alcohol, les elevades concentracions en estómac (100-500 mM) i la seva difusió a la mucosa provocarien una plena activitat de l'enzim, que superaria amb escreix la proporcionada per l'ADH1C, present també en la mucosa de l'estómac, amb valors més baixos de Km (0,6 mM) i kcat (35-87 min⁻¹) (Bosron et al., 1983). Malgrat tot, degut a la petita quantitat de mucosa gàstrica en comparació a la massa del fetge, la contribució d'aquest metabolisme inicial de l'estómac respecte el metabolisme hepàtic de l'etanol representaria una petita proporció. L'activitat total de l'estómac adult, en les condicions esmentades, és de 20 μmols/min, la qual cosa representa aproximadament l'1 % de l'activitat hepàtica (Moreno i Parés., 1991).

La caracterització de l'ADH4 de rata va revelar un valor de Km amb l'etanol 100 vegades superior al mostrat per l'enzim humà, a pH 7,5 (5 M, Julià et al., 1987). Tot i exhibir una constant catalítica per a aquest substrat molt elevada (2400 min⁻¹), el valor de Km va fer qüestionar el paper d'aquest enzim en el metabolisme de l'etanol, ja que la possible ingesta alcohòlica del rosegador podria proporcionar concentracions del substrat en la mucosa gàstrica molt inferiors al valor de la Km.

D'altra banda, es va trobar activitat amb altres substrats de rellevància fisiològica, com retinoides, ω-hidroxiàcids grassos i aldehids de la peroxidació lipídica (Julià et al., 1986; Boleda et al., 1993; Peralba, 1997). Entre ells, els que han generat una línia de recerca més intensiva han estat els retinoides. Les formes isomèriques 9-cis i tot-trans són activament metabolitzades pels enzims ADH4, i també són substrats de les ADH1 i ADH2 humanes, però no de l'ADH3 (Yang et al., 1994; Allali-Hassani et al., 1997).

Les propietats de l'ADH4 amb retinoides l'han relacionada amb la generació de l'àcid retinoic (Duester et al., 1991; Shean i Duester., 1993; Haselbeck et al., 1997; Napoli, 1999; Duester, 2000). Els àcids tot-trans i 9-cis-retinoic s'uneixen a receptors nuclears i actuen com a factors de transcripció que regulen l'expressió gènica (Heyman et al., 1992; Rastinejad et al., 2000). L'acció reguladora de l'àcid retinoic s'ha demostrat en el desenvolupament de vertebrats, en el manteniment d'epitelis i mucoses, i en terapia del càncer (Nau and Blaner, 1999), i actualment és un camp actiu de recerca. A més, l'11-cis-retinal és important per a la visió, ja que unit a l'opsina forma la rodopsina, el fotorreceptor que inicia fenomen visual amb l'absorció d'un fotó (Baylor et al., 1996).

El retinol o vitamina A és el precursor natural del retinal i l'àcid retinoic, els quals es formen per l'oxidació del retinol a retinal i per la posterior oxidació del retinal a àcid retinoic. El retinol, que en la cèl.lula està majoritàriament unit a la proteïna unidora de retinol (Ong and

Chytil, 1975), s'emmagatzema en forma de retinil éster (Quadre 3). Els passos de transformació dels retinoides i l'equilibri de les formes lliure/unida són importants per a l'homeostasi de l'àcid retinoic (Kurlandski et al., 1996; Napoli et al., 1999; Duester et al., 2000; Ghyselink et al., 1999). L'ADH actuaria principalment sobre les formes lliures (Kedishvili et al., 1998). En aquest sentit, la incapacitat de l'isòmer 9-cis d'unir-se a la proteïna unidora de retinol i a la proteïna unidora d'àcid retinoic (MacDonald i Ong, 1987; Allenby et al., 1993) suggereixen una contribució important de l'ADH4, molt eficient amb 9-cis-retinol i 9-cis-retinal, en la regulació d'aquesta forma isomèrica.

A més, l'expressió de l'ADH4 durant el desenvolupament (Zgombic-Knight et al., 1994; Ang et al., 1996a i b; Haselbeck et al., 1997b; Duester, 1998), en epitelis i mucoses (Ang et al., 1996b; Allali-Hassani et al., 1997; Haselbeck et al., 1997a; Hoffmann et al., 1998), en retina (Julià et al., 1987; Boleda et al., 1989) i en diversos tipus cel·lulars de cervell de rata (Martínez et al., 2001), indiquen una expressió d'aquest enzim en les mateixes regions on el metabolisme de retinoides és actiu i reforcen la hipòtesi de que l'ADH4 pot actuar com a retinol deshidrogenasa.

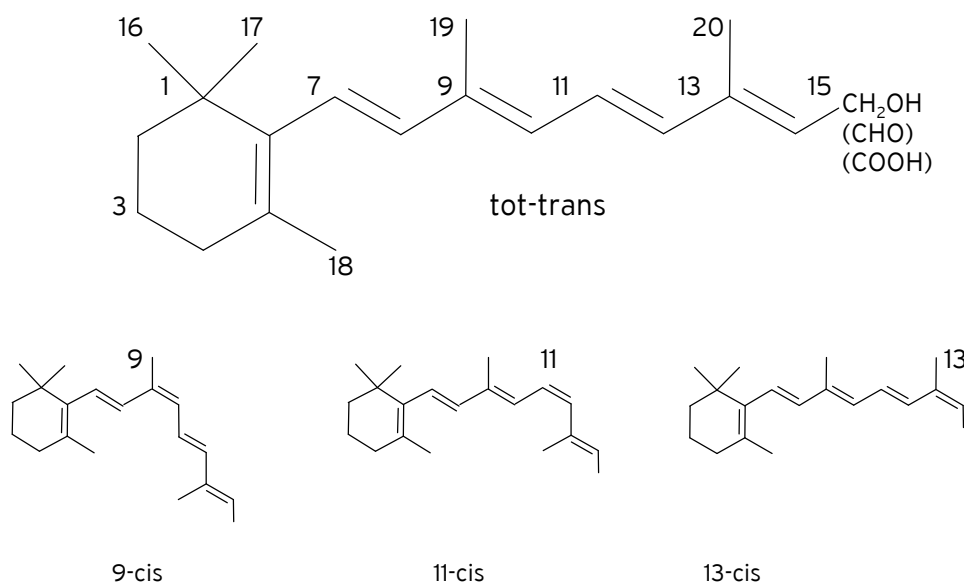
Altres classes d'ADH

S'han trobat altres classes d'ADH en vertebrats, la caracterització de les quals és encara en una etapa primerenca. En fetge i teixits fetals humans es va detectar un mRNA corresponent a una nova ADH, a la qual se li va assignar la classe V (Yasunami et al., 1991). Estudis posteriors han assenyalat possibles elements reguladors d'expressió específica de teixit del promotor del gen ADH5 (Zhi et al., 2000), i constaten l'existència de tres formes d'mRNA que exhibeixen un processament diferencial de la regió C-terminal (Strömberg and Höög, 2000). Una forma truncada detectada inicialment es produiria degut a la utilització d'un senyal de poliadenilació prematur present en l'intró 8, mentre que les dues altres formes inclourien l'exó 9, en emprar-se alternativament dos senyals de poliadenilació en la regió 3' (Strömberg and Höög, 2000).

L'ADH6 s'ha detectat, a nivell d'mRNA, en fetge i ronyó de rata, i com a proteïna activa en fetge i pulmó del rosegador *Peromyscus* (Zheng et al., 1993; Höög and Brandt, 1995). L'ADH7 és una forma que s'expressa en embrió de pollastre, però que és absent en l'organisme adult. L'enzim és actiu amb esteroides i retinoides, així com amb etanol, trans-2-hexenol i ciclohexanol (Kedishvili et al., 1997).

QUADRE 3. Estructura i interacció dels retinoides.

Els retinoides estan compostos per tres dominis estructurals: un anell de β -ionona, una cadena carbonada poliinsaturada i un grup polar. L'anell i la cadena de carbonis tenen un caràcter apolar molt marcat, convertint els retinoides en molècules hidrofòbiques. El grup polar pot presentar tres estats d'oxidació: alcohol, aldehyd i àcid. A més, els dobles enllaços de la cadena carbonada poden mostrar diverses isomeritzacions, essent les més freqüents les tot-trans, 9-cis, 11-cis i 13-cis.



La hidrofobicitat dels retinoides els confereix una baixa solubilitat en medis aquosos. Malgrat tot, els valors de solubilitat observats en aigua (60-210 nM) són més elevats que els predits a partir de la seva estructura (0,01 nM) (Li et al., 1996), la qual cosa es correlaciona amb la capacitat d'aquests compostos d'autoassociar-se formant micelles. En l'interior cel·lular, la formació de micelles dona una estabilitat als retinoides lliures compatible amb la difusió d'aquests en distàncies curtes. A més, la naturalesa amfipàtica dels retinoides els fa propicius a unir-se a les membranes cel·lulars. D'altra banda, la formació d'èsters de retinol (retinil palmitat, retinil oleat, retinil esteareat) permet tant el seu transport en lipoproteïnes com el seu emmagatzemament, principalment en fetge. Una gran proporció de retinoides in vivo, però, està associada a proteïnes unidores específiques, que fan possible assolir concentracions en la fracció soluble, extra i intracel·lular, superiors a les esperades per les seves propietats. En mamífer, s'han caracteritzat diverses formes de proteïnes unidores de retinoides: a nivell extracel·lular, les proteïnes unidores de tot-trans-retinol (RBP i IRBP, present aquesta última a l'espai intercel·lular dels fotoreceptors); a l'interior de la cèl·lula, proteïnes unidores de tot-trans-retinol, retinal i àcid retinoic, i 11-cis-retinal (CRBPI, CRBPII, CRALBP, CRABPI i CRABPII). Finalment, l'àcid tot-trans i el 9-cis-retinoic poden unir-se als receptors nuclears RAR (α , β i γ) i RXR (α , β i γ), i desenvolupar així la seva acció reguladora de l'activitat gènica (p.e., Nau and Blaner, 1999).

Propietats estructurals i mecanisme de l'ADH

Des de la cristal·lització i resolució per raigs X de l'ADH de fetge de cavall (Bränden et al., 1973; Eklund et al., 1976), s'ha determinat l'estructura tridimensional de l'ADH1 (Hurley et al., 1991; Hurley et al., 1994; Davis et al., 1996), ADH3 (Yang et al., 1997), i ADH4 (Xie et al., 1997) humanes, així com d'altres espècies (Ramaswamy et al., 1996; Svensson et al., 2000), fent-se evident que els enzims d'aquesta família presenten una arquitectura molt conservada. Les ADH mostren el plegament de Rossmann, que facilita la unió del coenzim en la forma plegada (Carugo i Argos, 1997). Els dominis de fixació del coenzim de les dues subunitats formen conjuntament el nucli de la molècula. Més externament, separat per un solc profund, es situa el domini catalític (Figura 1). En la seqüència, el domini de fixació del coenzim comprèn des del residu 176 fins al 318, quedant flanquejat per dues parts del domini catalític (1-175 i 319-374) (Eklund et al., 1976). Un tret característic de les ADH és el canvi conformacional entre l'apoenzim i l'holoenzim, en el qual el domini catalític experimenta una rotació de 10° , deixant la butxaca d'unió del substrat productivament accessible (Bränden i Eklund, 1977; Eklund i Bränden, 1979; Plapp et al., 1986).

En l'ADH, la interacció amb el coenzim es pot dividir en les regions d'unió de la nicotinamida, del pirofosfat i de l'adenina, anant de la més interna a la més externa (Figures 1 i 2). La nicotinamida s'uneix a la zona més propera al zinc catalític, de manera que la cara-A de l'anell s'orienta cap a la butxaca d'unió del substrat, essent l'hidrogen H4R el transferit en l'oxidoreducció. Si l'anell fes un gir de 180° , mostrant la cara-B, el grup carboxamida de la nicotinamida s'aproparia massa als residus que coordinen la unió del zinc. Així, la transferència de l'hidrur és estereoespecífica.

El pirofosfat es situa en la zona intermitja del solc, entre els extrems amino de les hèlix α_B i α_1 . Els oxigens del pirofosfat formen ponts d'hidrogen amb els nitrogens de la cadena principal i amb els residus 47 i 369. Els canvis d'Arg 47 per His i Arg 369 per Cys provoquen les variacions en les propietats cinètiques entre els al·lels d'ADH1B (veure pàgs. 8 i 9). Les Gly 199, 202 i 203 permeten que el coenzim s'acosti a la cadena principal, i el moment dipolar de les hèlix i la presència de la Lys 228 fan que el lloc d'unió del pirofosfat tingui una densitat de càrrega positiva (Stone et al., 1993b; Hurley et al., 1994). Així, la unió del pirofosfat és una de les interaccions fortes entre l'enzim i el coenzim, i els residus implicats estan altament conservats.

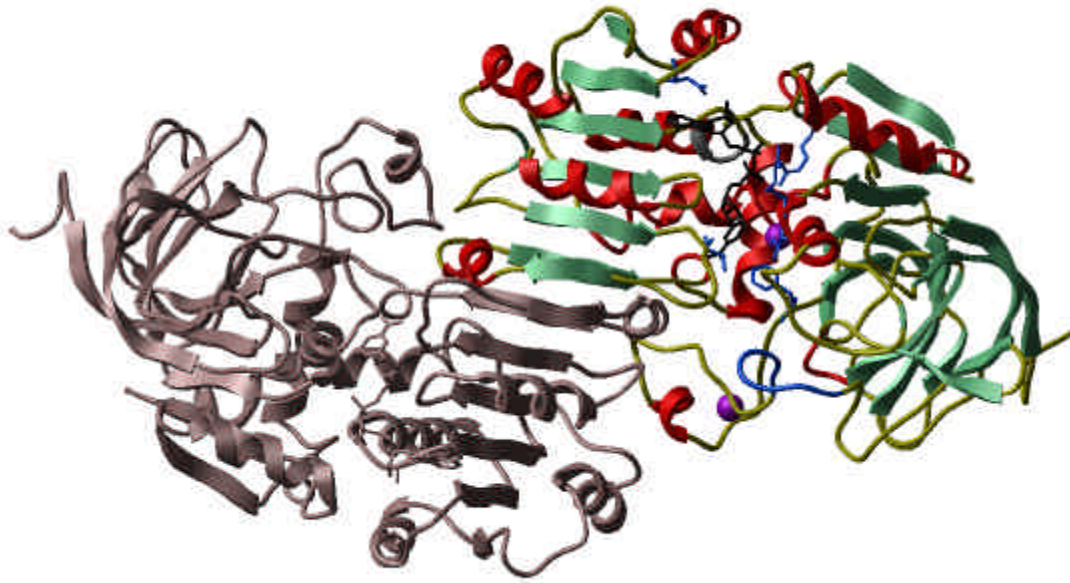


FIGURA 1. Estructura tridimensional de l'ADH1 humana. La subunitat de la dreta té representats diversos elements amb colors diferents: fulles **b** (verd), hèlix **a** (vermell), àtoms de zinc (esferes porpra), coenzim (negre), regions d'unió de substrat i el coenzim (blau). Els dominis de fixació de coenzim (plegament de Rossmann), constitueixen l'eix central del dímer. Els dominis catalítics són els més externs.

La ribosa de l'adenina del coenzim pot presentar en la posició 2' un fosfat, essent aquesta l'única diferència entre el NAD(H) i el NADP(H). Els residus propers a aquesta regió del coenzim unit són els que determinen l'especificitat d'unió de coenzim en les deshidrogenases. Les ADH de vertebrat presenten en la posició 223, enfrontada al 2' de la ribosa, un Asp, la càrrega negativa del qual interfereix la unió del NADP(H), mostrant així una marcada preferència pel NAD(H) (Eklund et al., 1984; Fan et al., 1999).

Els grups involucrats en la catàlisi són el zinc, la Ser 48 (o Thr 48), la nicotinamida del NAD(H) i el grup hidroxil o carbonil del substrat (Figura 3). El zinc està unit per enllaços coordinats als grups sulfhidril de les Cys 46 i Cys 174, i a l'imidazol de l'His 67. El quart lligand és una molècula d'aigua ionitzable, que forma un pont d'hidrogen amb l'hidroxil del residu 48 (Bränden i Eklund, 1980). La reacció d'oxidació d'alcohols és afavorida en un microentorn altament anhidre. Les característiques de la butxaca d'unió del substrat i les interaccions del mateix substrat

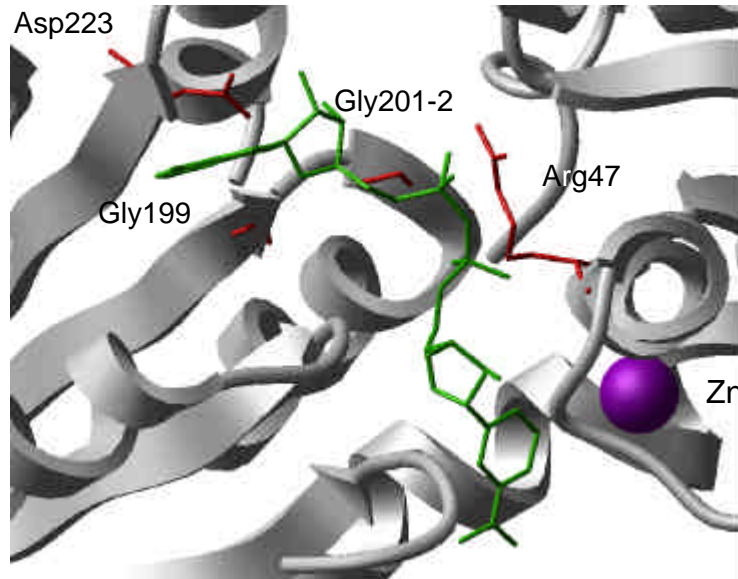


FIGURA 2. Detall de la unió del coenzim en l'ADH1 humana. En vermell, s'han representat les posicions 47, 199, 201, 202 i 223, importants en la unió del NAD⁺ (verd) i comentades en el text. El zinc catalític s'ha representat com una esfera de van der Waals.

amb el túnel hidrofòbic de l'enzim proporcionen aquestes condicions. El primer pas és la unió del NAD⁺ i la isomerització del complex binari E-NAD⁺. La molècula d'aigua unida al Zn es ionitza, quedant-hi l'hidroxil i alliberant-se un protó. La proximitat de l'His 51 al residu 48 proporciona un sistema de transmissió d'aquest protó des de l'interior a la superfície de l'enzim. El substrat s'apropa al Zn situant l'oxigen de l'alcohol a una distància inferior a 3 Å, el que desplaça l'hidroxil que anteriorment s'hi unia. Les propietats de l'ió de Zn i el microentorn hidrofòbic fan disminuir el valor de pKa de l'alcohol fins a valors compatibles amb la formació de l'alcoholat (Kvassman et al., 1981). En la ionització de l'alcohol, el protó és extret per l'hidroxil sortint del Zn, formant-se una molècula d'aigua. Posteriorment, el caràcter electròfil de Zn fa possible la transferència de l'hidrur al C4 del NAD⁺, produint-se la interconversió dels complexos ternaris, amb la formació de l'aldehid i la reducció del NAD⁺. Així, el substrat ha d'estar orientat dins del seti actiu de tal manera que en aproximar-se al Zn, ho faci també al C4 de la nicotinamida. Finalment, el NADH es dissocia de l'enzim (Bränden i Eklund, 1980).

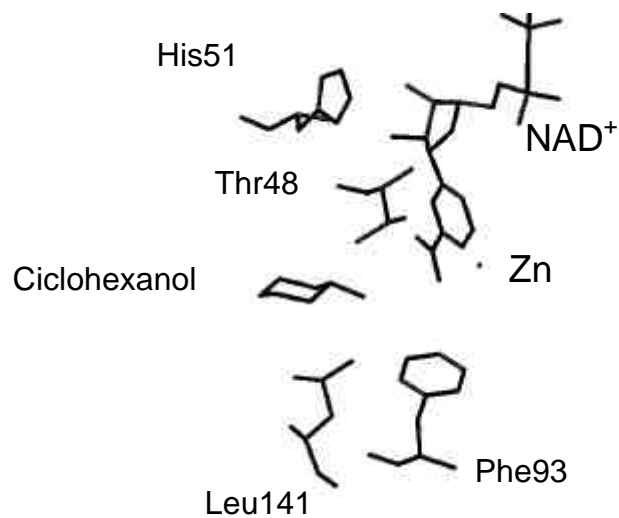


FIGURA 3. Seti actiu de les ADH, extret de l'estructura de l'ADH1 humana, complexada amb ciclohexanol (Hurley et al., 1994). S'han inclòs les posicions 93 i 141, que formen part de la regió interna de la butxaca d'unió del substrat.

Amb etanol com a substrat, l'ADH1 segueix un mecanisme seqüencial ordenat bi bi, en el qual primer s'uneix el coenzim i després el substrat. Un cop finalitzada la catàlisi, s'allibera l'acetaldehid, i en darrera instància, el coenzim (Theorell i Chance, 1951; Wratten i Cleland, 1963). El pas limitant de la reacció és majoritàriament la dissociació del coenzim (Bränden i Eklund, 1980), pel que la constant de velocitat k_{off} determina la constant catalítica de la reacció (k_{cat}).

ADH de la família SDR

La determinació primerenca de la presència d'isoenzims en l'ADH de *Drosophila* (Jacobson, 1968) va fer que s'utilitzés l'ADH de cadena curta com a model d'estudi de la variabilitat genètica, essent objecte d'una exhaustiva caracterització en les darreres dècades (Juan i González-Duarte, 1980; Marfany i González-Duarte, 1993; Albalat et al., 1994). Estudis cinètics (p. e., Unsprung et al., 1968; Winberg et al., 1982) i la determinació de l'estructura primària (Schwartz i Jörnvall, 1976; Thatcher, 1980) van revelar un enzim dependent de NAD(H) amb preferència per alcohols secundaris que no tenia relació estructural amb l'ADH de vertebrats. Malgrat la recerca activa i continuada en l'ADH de *Drosophila*, l'estructura tridimensional no ha estat resolta fins recentment (Benach et al., 1998).

Retinol deshidrogenases i retinal reductases de la família SDR

En la superfamília SDR, hi ha caracteritzats diversos enzims que mostren activitat amb retinoides: la retinol deshidrogenasa de fetge de rosegador (RoDH, Chai et al., 1995a; Chai et al., 1995b; Chai et al., 1996; Gough et al., 1998), la cis-retinol/androgen deshidrogenasa (CRAD, Chai et al., 1997; Su et al., 1998), la 11-cis-retinol deshidrogenasa (11cisRDH o RDH5, Simon et al., 1995), la SDR1 derivada de retina (retSDR1, Haeseleer et al., 1998) i la retinol deshidrogenasa de fotoreceptor (prRDH, Rattner et al., 2000).

Descrites principalment en espècies de mamífer i localitzades en fetge i en ull, aquestes retinoide oxidoreductases formen part de grups de SDR força distants. Així, llevat de les RoDH i les CRAD amb 85-90% d'identitat de seqüència, les proteïnes de grups diferents mostren valors d'identitat baixos (25-50%).

La seva especificitat de coenzim, que varia entre NAD(H) i NADP(H), s'utilitza sovint com a criteri per a considerar aquests enzims com a deshidrogenases o reductases, respectivament (Napoli, 1999; Duester, 2000). Un tret característic comú d'aquests enzims és que estan units a la membrana del reticle endoplasmàtic, i localitzats així en la fracció microsomal, la qual cosa els diferencia de les ADH (SDR i MDR). El fet que siguin enzims units a membrana dificulta la seva purificació i la determinació de constants cinètiques. És habitual, doncs, que les dades cinètiques publicades d'aquestes SDRs no siguin fàcilment comparables amb les de les ADHs-MDR.

La característica funcional més peculiar d'aquests enzims és la seva activitat i major eficiència catalítica utilitzant com a substrat el complex retinol-proteïna unidora de retinol (CRBP) que no pas retinol lliure, demostrada per a RoDH1 i 2, generant retinal com a producte (Napoli et al., 1992; Chai et al., 1995a i b). Aquesta diferència respecte les ADH-MDR, les quals no mostren activitat amb retinol-CRBP (Kedishvili et al., 1998), s'ha utilitzat com a criteri per a

posar en dubte la participació fisiològica de les ADH-MDR en el metabolisme de retinoides, en favor de les SDR (Napoli, 1999). No obstant, no s'ha descrit cap CRBP que uneixi els isòmers 9-cis. D'altra banda, els resultats obtinguts en ratolins deficients en CRBP no són consistents amb aquesta idea. Tot i que han provat una participació de la CRBP en l'homeostasi dels retinoides, en observar incapacitat en aquests ratolins d'acumular reserves en forma d'èsters de retinol, han mostrat també normalitat en la síntesi de RA amb una dieta no deficient en vitamina A (Quadro et al., 1999). Això significa que la formació de RA a partir de retinol es pot donar en absència de CRBP.

D'altra banda, tampoc ha quedat resolt com el complex retinol-CRBP pot ser substrat de les SDR sense l'alliberament del retinol de la proteïna unidora, ni s'ha proposat cap mecanisme catalític per a aquesta reacció. Tot aquests factors obliguen a ser prudent en interpretar la contribució al metabolisme de retinoides de les retinol deshidrogenases SDR que utilitzen CRBP-retinol, especialment les de fetge. A més, s'ha demostrat una major eficiència catalítica d'aquests enzims utilitzant esteroides (Duester, 2000).

Retinol deshidrogenases hepàtiques

Encara que aquests enzims estan presents en altres òrgans, la seva principal expressió en fetge és un denominador comú destacable, utilitzat aquí per agrupar-los. Dins d'aquest grup, que compta amb una forma caracteritzada en humans, s'hi inclouen els enzims RoDH i CRAD, descrits majoritàriament en rosegadors (Taula V).

TAULA V. Retinol deshidrogenases de fetge.

Enzim	Coenzim	Substrat	Espècie	Teixit	Ref
RoDH1	NADP(H)	Andrògens, tot-trans-ROL	Rata, ratolí	Fetge, embrió, pulmó, ronyó, testicle, cervell	a
RoDH2	NADP(H)	tot-trans-ROL	Rata, ratolí	Fetge, embrió, pulmó, ronyó, testicle, cervell	b
RoDH4	NAD(H)	Andrògens, tot-trans-ROL	Home	Fetge, epidermis	c
CRAD1	NAD(H)	Andrògens, 9-cis-ROL, 11-cis-ROL	Ratolí	Fetge, ronyó, cor, cervell, pulmó, testicle, ull	d
CRAD2	NAD(H)	Andrògens, 11-cis-ROL	Ratolí	Fetge, pulmó, ronyó, cervell, ull	e

a: Chai et al., 1995a; Chai et al., 1996. b: Chai et al., 1995b. c: Gough et al., 1998; Jurukovski et al., 1999. d: Chai et al., 1997. e: Su et al., 1998.

Retinol deshidrogenases oculars

En l'ull de mamífer hi ha retinol dehidrogenases i retinal reductases de la família SDR: RDH5, retSDR1 i prRDH, que poden estar relacionades amb el cicle visual (Taula VI). Estudis genètics han provat que mutacions en RDH5 causen la ceguesa nocturna congènita (fundus albipunctatus), demostrant la participació directa d'aquest enzim en la visió (González-Fernández et al., 1999; Yamamoto et al., 1999; Cideciyan et al., 2000).

TAULA VI. Retinol deshidrogenases d'ull.

Enzim	Coenzim	Substrat	Espècie	Teixit	Ref
RDH5	NAD(H)	11-cis-ROL, 9-cis-ROL	Home, ratolí, vaca	Ull (epiteli pigmentat de la retina)	a
RetSDR1	NADP(H)	tot-trans-ROL	Home, ratolí, vaca	Retina, pàncrees, fetge, ronyó, cor	b
prRDH	NADP(H)	tot-trans-ROL	vaca	Retina	c

a, Simon et al., 1995, Driessen et al., 1995; b, Haeseleer et al., 1998; c, Rattner et al., 2000.

Característiques estructurals de les SDR

S'ha determinat l'estructura tridimensional de diversos membres de la família SDR. A més de l'ADH de *Drosophila* (Benach et al., 1998), s'han resolt les de diverses hidroxisteroide deshidrogenases (Ghosh et al., 1994; Ghosh et al., 1995; Breton et al., 1996; Sawicki et al., 1996; Tanaka et al., 1996a), la carbonil reductasa (Tanaka et al., 1996b), la dihidropteridina reductasa (Varughese et al., 1992; Su et al., 1993) i la hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (Barycki et al., 1999). Aquests enzims, tot i que mostren nivells d'identitat seqüencial que no superen el 30%, presenten un plegament comú (Rossmann) i conservació del centre actiu. Així, el motiu TyrXXXLys està present en totes les SDR i conforma, juntament amb una Ser altament conservada, la tríada catalítica. Dels tres residus, la Tyr és molt probablement el que actua com àcid/base general, degut al descens del seu valor de pKa i a l'adopció de la forma ionitzada durant la catàlisi (Benach et al., 1999). S'ha proposat un mecanisme catalític ordenat bi bi per a l'ADH de *Drosophila*, similar a l'establert en les ADH-MDR (Benach et al., 1999).

Les aldo-ceto reductases

Les aldo-ceto reductases (AKR) són oxidoreductases presents en vertebrats, plantes, llevats, protozous i bacteris. Són enzims majoritàriament dependents de NADP(H), especialitzats en la conversió d'aldehids alifàtics i aromàtics, esteroides, prostaglandines i compostos hidrocarbonats policíclics (Jez et al., 1997a). Les diverses AKR han estat agrupades en famílies seguint criteris filogenètics (Jez et al., 1997b). Entre les formes caracteritzades en vertebrats, les famílies aldosa reductasa, aldehyd reductasa i hidroxiesteroide deshidrogenasa són les més ben estudiades. No obstant, la superfamília AKR està representada per una gran varietat de proteïnes. Així, la ρ -cristal·lí de *Rana catesbiana*, Δ^4 -3-cetoesteroide-5 β reductasa humana i de rata, la sorbitol-6-fosfat deshidrogenasa, la xilosa reductasa, la calcona reductasa, morfina deshidrogenasa, l'aflatoxina reductasa, són enzims que formen part de la superfamília.

Aldosa reductasa

La família aldosa reductasa (AR) ha estat descrita en diverses espècies de mamífer (home, rata, ratolí, vaca, conill i porc). Els seus substrats fisiològics més rellevants són hexoses i pentoses, glucosones procedents de la glicació no enzimàtica de la glucosa, isocorticoesteroides, el derivat del colesterol isocaproaldehyd i aldehids formats en la peroxidació lipídica (Wermuth et al., 1982; Vander Jagt et al., 1992; Kawamura et al., 1999). Les AR mostren un patró d'expressió ampli, essent presents en ronyó, múscul, placenta, i en l'epiteli pigmentat de la retina (Sato et al., 1993), encara que estudis més recents detecten un cert nivell d'expressió de mRNA en gairebé tots els teixits humans (Cao et al., 1998; Hyndman i Flynn, 1998).

Aldosa reductasa i diabetes

Les AR són objecte d'estudi intensiu en la recerca de la diabetes. La capacitat d'aquests enzims de reduir la glucosa a sorbitol (Wermuth et al., 1982) i la sobreexpressió del gen AR en malalts diabètics ha generat la hipòtesi que correlaciona l'increment d'AR amb el desenvolupament de complicacions secundàries, com retinopatia, nefropatia, neuropatia i, en general, disfuncions vasculars, en aquesta malaltia.

En condicions de normoglicèmia, la via principal de metabolització de la glucosa és la glucòlisi, essent el seu primer pas la fosforilació per acció de l'hexoquinasa. En aquestes condicions la reducció de la glucosa per l'AR, el primer pas de la via dels poliols, és poc significativa, representant només el 3% del seu metabolisme (Jeffery i Jörnvall, 1981; González et al., 1984). En casos d'hiperglicèmia, la major concentració de glucosa produeix

una saturació de la via glucolítica, potenciant-se així la via de l'AR, la qual pot arribar a representar el 30% del metabolisme total d'eliminació de la glucosa (González et al., 1984). En aquestes condicions, es dona un augment de la concentració de sorbitol i fructosa, que es comporten com osmolits, l'acumulació dels quals genera hipertonicitat cel·lular. El promotor de gen AR conté seqüències consens de resposta a la pressió osmòtica i s'ha demostrat la seva inducció dependent d'osmolaritat (Ko et al., 1997). Per tant, per un efecte de feedback positiu, la hiperglicèmia provoca un increment de l'expressió AR. Aquest fet s'ha demostrat en animals diabètics, en els teixits on està provada la presència AR en condicions de normoglicèmia, com l'epiteli pigmentat de la retina i el ronyó. Aquests dos teixits, precisament, pateixen efectes secundaris derivats de la diabetes, per aquest motiu es treballa amb la hipòtesi que correlaciona l'AR amb la patologia diabètica.

És d'especial interès la retinopatia degut a la seva elevada incidència entre pacients diabètics, figurant entre les quatre primeres causes de ceguesa en països del primer món (Klein i Klein, 1997). Aquesta es pot presentar en dos quadres: no proliferativa i proliferativa (Ferris et al., 1999). La retinopatia no proliferativa implica la formació d'agregats proteics en la retina deguts a les lesions cel·lulars derivades de l'estrés osmòtic. La retinopatia proliferativa es descriu per la presència de microaneurismes per proliferació de capilars sanguinis en la mateixa retina. Ha estat demostrada l'aparició de cataractes com a conseqüència de l'acumulació de poliols en ratolins que sobreexpressen l'AR (Lee et al., 1995). D'entre els factors angiogènics implicats en la proliferació de capilars, el que té una funció determinant és el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF) (Feener et al., 1997; Tilton et al., 1997; Detmar, 2000; Yourey et al., 2000), una glicoproteïna de 40-45 kDa que s'uneix amb elevada afinitat als receptors tirosina quinasa de les cèl·lules endotelials (De Vries et al., 1992; Terman et al., 1992), per a la qual s'han descrit variants degudes a splicing alternatiu (Tischer et al., 1991). S'ha trobat sobreexpressió del VEGF en l'epiteli pigmentat en els casos de retinopatia proliferativa (Aiello et al., 1994; Spilisbury et al., 2000), i a l'inrevés, s'ha vist que quan no hi ha increment en l'expressió de VEGF aleshores tampoc no es dona proliferació (Marsh et al., 2000). És encara objecte de recerca com s'enllacen la hiperglicèmia i la inducció de l'AR amb la sobreexpressió del VEGF en aquesta patologia ocular. En aquest sentit, és molt interessant la funció inhibidora de l'àcid retinoic en la regulació del gen VEGF (Díaz et al., 2000; Pal et al., 2000).

La susceptibilitat a desenvolupar retinopatia varia entre els diabètics. S'ha demostrat que polimorfismes en la regió promotora del gen AR estan associats a l'aparició d'aquesta patologia (Kao et al., 1999). A més, el polimorfisme en la regió promotora també mostra associació amb la nefropatia diabètica (Heesom et al., 1997). Amb coherència amb la hipòtesi

inicial, els diabètics dotats de promotors de l'AR que responen més intensament a la inducció, són més susceptibles a desenvolupar complicacions secundàries (Kao et al., 1999).

Un fet que passa sempre inadvertit, en les publicacions mèdiques de recerca en AR i diabetes, és el perfil cinètic de l'enzim AR. En realitat, l'AR és poc eficient en la reducció de glucosa, en presentar un valor de Km de 50-100 mM i de kcat de 100 min⁻¹. Els valors d'hiperglicèmia en diabetes oscil·len aproximadament entre 5 i 30 mM, la qual cosa significa que l'AR difícilment assolirà la seva màxima eficiència catalítica en aquesta reacció. En canvi, hi ha descrits altres substrats de rellevància fisiològica metabolitzats molt eficientment per aquest enzim, p. e. isocorticoesteroides, metilglicoxal i isocaproaldehyd. Aquest fet hauria de ser considerat en l'intent d'explicar les alteracions cel·lulars per efecte de la inducció de l'AR en diabetes.

Enzims afins a l'aldosa reductasa (aldosa reductasa-like)

Aquest grup d'enzims ha estat caracteritzat durant la dècada dels anys 90, i definit com a una família diferenciada. L'interès suscitat per aquesta família emergent d'AKR es basa en que, tot i ser propera a la família aldosa reductasa, té característiques diferents, en mostrar poca o nul·la eficiència catalítica amb glucosa, i en que hi ha més d'un representant per espècie. Així, en ratolí, s'han caracteritzat la mouse vas deferens protein (MVDP) i la fibroblast-growth-factor-1-regulated protein (FR-1) (Pailhoux et al., 1990; Donohue et al., 1994). Aquest fet planteja una possible multiplicitat de formes, moltes d'elles encara per descobrir en altres espècies de mamífer. Altres membres, posteriorment caracteritzats dins aquest subgrup, són l'aldosa reductasa-like humana (Cao et al., 1998; Hyndman i Flynn, 1998) i la reductasa de cèl·lules CHO (Hyndman et al., 1997).

Característiques estructurals de les AKR

Les AKR són enzims monomèrics, amb cadenes polipeptídiques d'aproximadament 320 aminoàcids. La identitat de seqüència entre les famílies de mamífer és aproximadament del 50%. Aquest valor cau fins al 25-30% entre les famílies més distants. Les seqüències AKR contenen 11 residus estrictament conservats, dels quals Asp43, Asn160, Gln183, Ser264 i Arg269 participen en la unió del coenzim, i Asp43 i Lys77 formen part del seti actiu. La resta dels residus conservats (Gly18, Gly38, Asp105, Pro112, Gly157 i Pro179) poden tenir un paper estructural en la formació del nucli del barril, ja que formen part de les seves fulles β , hèlix α i petits loops (Jez et al., 1997a).

Les AKR mostren una estructura terciària en forma de barril $(\alpha/\beta)_8$ (Rondeau et al., 1992; Wilson et al., 1992, Figura 4). Es tracta d'una conformació molt versàtil, on el barril $(\alpha/\beta)_8$ constitueix un nucli conservat que és la base per a la unió del coenzim. Els loops externs, en canvi, són variables i adaptables a un gran nombre de lligands i substrats. Aquesta arquitectura exhibida per les proteïnes en barril $(\alpha/\beta)_8$ els confereix una gran capacitat per a desenvolupar noves funcions (Altamirano et al., 2000).

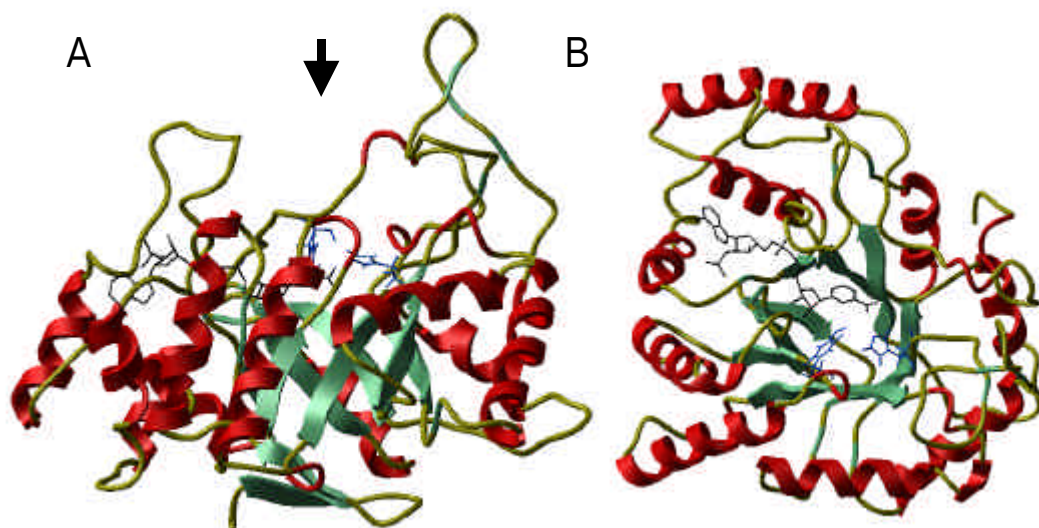


FIGURA 4. Estructura tridimensional de l'aldosa reductasa humana. La mateixa representació es mostra des de dos angles diferents. En el panell A, s'observen els tres loops d'unio del substrat, que sobresurten per la part superior del barril. La fletxa senyala la cara mostrada en el panell B, en el qual es pot veure la disposició de les fulles *b* i les hèlix *a* en el barril (extret de Wilson et al., 1992).

La determinació dels residus catalíticament actius que actuen com a àcid/base en l'oxidoreducció, ha estat una qüestió oberta en la bibliografia de les AKR. El seti actiu mostra una tètrada d'Asp43, Tyr48, Lys77 i His110 altament conservada (Figura 5). En l'holoenzim cristal·litzat, als residus Tyr48 i His110 s'hi uneix, enfrontada al C4 de la nicotinamida del NADP, una molècula d'aigua col·locada mimèticament respecte el carbonil del substrat (Wilson et al., 1992). D'acord amb això, les distàncies d'aquests residus respecte la nicotinamida i el substrat, els fan tots dos compatibles per actuar com a residus catalítics. No obstant, l'efecte de disminució del pK_a de la Tyr48 provocat pel microentorn del seti actiu convertirien aquest residu en un bon candidat, millor que l'His110, per actuar com a donador de protons (Grimshaw et al., 1992; Wilson et al., 1992). Estudis de mutagènesi dirigida i de modelització de la reacció arriben a conclusions similars (Bohren et al., 1992; DeWinter et al., 1995; Várnai et al., 1999).

Un dels trets interessants dels enzims AKR és la varietat de compostos amb estructures diferents que poden actuar de substrats, indicant la gran plasticitat d'aquests enzims. La butxaca d'unió del substrat en les AKR (Jez et al., 1996; Höög et al., 1994, Bennett et al., 1996) està definida per tres regions diferents: A) Els components del seti actiu (Tyr48, His110 i la nicotinamida del cofactor). B) Els residus propers al seti actiu, essent importants el Trp79 i la posició 111 (Trp o Phe). C) Els residus dels tres loops que formen les cares de la butxaca. Les posicions 113, 121 i 122, en el loop A, 200 en el loop B i 299, 301 i 303, en el loop C, són les que defineixen el perfil de la butxaca.

Els residus que es troben en les posicions 47 i 111 tenen una funció important en la discriminació dels substrats, i són específics en cada família d'AKR. La posició 111 és Trp en les aldosa reductases i Phe en les hidroxisteroide deshidrogenases. La presència de Trp111 ha estat relacionada amb la capacitat d'utilitzar monosacàrids com a substrats, ja que estableix un pont d'hidrogen amb l'hidroxil 2' d'aquests compostos (DeWinter et al., 1995). D'altra banda, la posició 47, que està confrontada amb la 111 i és molt propera al seti actiu (Tyr48), és Val en les aldosa reductases i Leu o Ile en les hidroxisteroide deshidrogenases. Aquestes diferències poden estar relacionades amb restriccions topològiques per a la unió de determinats substrats (Jez et al., 1997a).

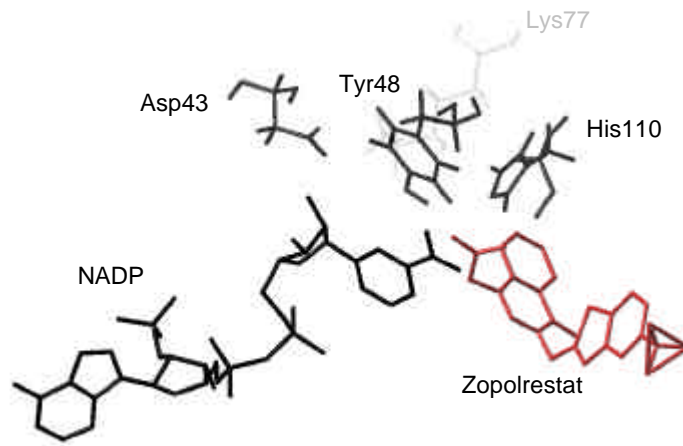


FIGURA 5. Centre actiu de l'aldosa reductasa, extret de Wilson et al., 1993. S'han representat els residus que conformen la tètada catalítica (en negre) -exceptuant la Lys77 (gris clar), que es superposa a la Tyr48-, el NADP i l'inhibidor zopolrestat (gris fosc).

Objectius

Objectius

Els objectius d'aquesta Tesi Doctoral s'emmarquen en l'estudi estructural i funcional de l'ADH4 de mamífer (home i rata) i en la recerca de formes homòlogues en altres línies de vertebrat.

1. ADH4 humana i de rata

Estudiar la funció dels enzims ADH4 de mamífer mitjançant l'anàlisi estructural i cinètica. Obtenir les seves seqüències i identificar les regions funcionalment rellevants. Estudiar la base estructural per a l'especificitat de substrat.

2. ADH d'estómac de Rana perezi

Obtenir la seqüència de l'enzim i estudiar l'especificitat de coenzim a nivell estructural.

3. ADH de Gallus domesticus:

Estudiar la presència d'una ADH en teixits extrahepàtics de Gallus domesticus, i caracteritzar-la a nivell estructural i funcional.

