



Aïllament i caracterització de l'enzim alcohol deshidrogenasa a "*Drosophila Hydei*": resposta metabòlica a la ingesta d'alcohols en aquesta espècie

Sílvia Atrian i Ventura

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



AÏLLAMENT I CARACTERITZACIÓ DE L'ENZIM ALCOHOL
DESHIDROGENASA A DROSOPHILA HYDEI. RESPOSTA
METABÒLICA A LA INGESTA D'ALCOHOLS EN AQUESTA
ESPÈCIE.

Memòria presentada per optar
al Grau de Doctor en Biologia
per la Universitat de Barcelona
per
SÍLVIA ATRIAN I VENTURA.

Vist i plau

El Director de la Tesi

Roser González Duarte

Dra. Roser Gonzàlez Duarte

Professor Adjunt del Departament de Genètica
de la Facultat de Biologia de la Universitat
de Barcelona.

Barcelona, Març 1984.



Al meu pare.

(1913-1972)

Però hem viscut per salvar-vos el mots
per retornar-vos el nom de cada cosa,
perquè seguíssiu el recte camí
d'accés al ple domini de la terra.

Vàrem mirar ben al lluny del desert,
davallàrem al fons del nostre somni.
Cisternes seques esdevenen cims
pujats per esglaons de lentes hores.

S.Espriu.

Els treballs exposats en aquesta Tesi Doctoral han estat duts a terme en el Departament de Genètica, de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, des del mes d'Octubre de 1979 fins el mes d'Octubre de 1983, amb el suport econòmic d'una beca de l'INAPE (Ministeri d'Educació i Ciència) per a la realització de tesis doctorals (anys 1981 i 1982) i una beca de Formació de Personal Investigador (Ministeri d'Educació i Ciència) (any 1983 i 1984).

Crec que, de bona llei, han de quedar explícits els agraïments a les següents persones i/o departaments, sense l'ajut dels quals hauria estat impossible la realització d'aquesta tesi:

- A la Dra. Roser Gonzàlez, directora d'aquesta tesi, per la seva constant i decidida orientació tant científica com personal durant aquests anys; per la seva confiança, paciència i comprensió en la planificació dels experiments, el seu desenvolupament i la crítica dels resultats.
- Al Dr. Antoni Prevosti, catedràtic i cap del Departament de Genètica, per haver proporcionat totes les facilitats per a la realització d'aquesta tesi, tant des del punt de vista material com científic.
- A les meves companyes de grup de treball, Dra. Elvira Juan i Dra Lluïsa Vilageliu, sota el mestratge de les quals vaig aprendre les tècniques bàsiques que m'han permès desenvolupar aquest treball i a qui haig d'agrair el seu ajut i suggerències durant tot aquest temps.
- A Na Maria Monclús de Prevosti, pels seus consells i orientació en la tria i conservació de les espècies de Drosophila.
- A tots els companys del Departament de Genètica que en algun moment m'han ajudat.

- Al Dr. K.F.Tipton per les seves valuoses suggerències de treball.
- A Na Fàtima Martín i N'Isidre Casals, cap del Servei d'Anàlisis d' Aminoàcids de la Facultat de Biologia, de la Universitat de Barcelona, per l'interès, facilitats i cura en la realització de les anàlisis que apareixen en aquest treball.
- Al Dr.Miquel Llobera i Dr. Josep M^a Argilés, i en general a tot el Departament de Fisiologia General de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, per permetre'm l'ús del seu equip de Cromatografia de Gasos i iniciar-me en aquesta tècnica.
- Al grup de Síntesi de Péptids del Departament de Tecnologia Química de l'Institut de Tecnologia Química i Tèxtil del C.S.I.C., personalitzat en la Dra.F.Reig i el Dr. Gracia Anton, per permetre'm l'ús del seu equip d'HPLC. Concretament també a En Carles Trullás, per la seva paciència, disponibilitat i interès en la realització material d'aquestes anàlisis.
- A Anna M^a Domingo i al Servei de Fotografia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona,(En Pere Demestres), per l'acurada realització de les gràfiques i fotografies, respectivament, que il.lustren aquesta tesi.
- A N'Isidre Ponti, per l'ajuda en el mecanografiat de la tesi, i per compartir amb mi tots els maldecaps que ha portat la seva realització durant aquests anys.

INDEX.

1. INTRODUCCIÓ.

1.1. DESCRIPCIÓ DE L'ENZIM ADH EN NO DROSOPHÍLIDS	3.
1.1.1. PROCARIOTES	4
1.1.2. LLEVATS	5
1.1.3. PLANTES SUPERIORS	6
1.1.4. MAMÍFERS	6
1.2. METABOLISME DE L'ETANOL EN MAMÍFERS	11
1.2.1. VIA ADH	11
1.2.2. VIA CATALASA	13
1.2.3. VIA MAOS	13
1.3. L'ENZIM ADH A <u>DROSOPHILA</u>	14
1.3.1. ESTUDIS GENÈTICS	14
1.3.1.1. LOCALITZACIÓ DEL GEN Adh	15
1.3.1.2. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE L'ADH.....	16
1.3.1.3. AL.LELOENZIMS. POLIMORFISME I SELECCIÓ	18
1.3.2. ESTUDIS BIOQUÍMICO-ESTRUCTURALS.....	21
1.3.2.1. ISOZIMS. DESCRIPCIÓ I ORIGEN.....	21
1.3.2.2. PURIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE L'ENZIM	23
1.3.2.3. MECANISME DE CATÀLISI ENZIMÀTICA	25
1.3.2.4. CARACTERITZACIÓ DEL GEN Adh i ARN-Adh	27
1.3.2.5. REGULACIÓ ONTOGÈNICA I HISTOLÒGICA.....	30
1.3.2.6. COMPARACIÓ DE L'ADH DINS EL GÈNERE DROSOPHILA.	32
1.3.3. ESTUDIS BIOQUÍMICO-FUNCIONALS	33
1.3.3.1. TOLERÀNCIA A L'ETANOL.PAPER DETOXIFICANT	33
1.3.3.2. FUNCIÓ DE L'ADH A <u>DROSOPHILA</u>	34
1.3.3.3. METABOLISME DE L'ETANOL A <u>DROSOPHILA</u>	39
1.4. OBJECTIUS DEL PRESENT TREBALL	44

2. MATERIAL I MÈTODES.

2.1. MATERIAL	46
2.1.1. SOQUES UTILITZADES	48
2.1.2. PRODUCTES QUÍMICS	48
2.1.3. APARELLS	54

2.2. MÈTODES.....	55
2.2.1. MÈTODES DE CULTIU DE DROSOPHILA	55
2.2.1.1. CULTIU EN FLASCONS	55
2.2.1.2. CULTIU A GRAN ESCALA	56
2.2.2. RECOLLIDA I SEMBRA D'OUS	56
2.2.3. DETERMINACIÓ DE LES DOSI LETALS 50%	57
2.2.4. LECTURES ESPECTROFOTOMÈTRIQUES	58
2.2.5. DETERMINACIÓ DE L'ESPECTRE D'ABSORCIÓ MOLAR ...	60
2.2.6. DETERMINACIÓ DE PROTEÏNA EN SOLUCIÓ	60
2.2.7. ELECTROFORESI EN MIDÓ	61
2.2.8. ELECTROFORESI EN POLIACRILAMIDA-SDS	62
2.2.9. GELS D'ELECTROENFOCAMENT	64
2.2.10. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA	66
2.2.11. DIÀLISI	70
2.2.12. ANÀLISI D'AMINOÀCIDS	70
2.2.13. DETERMINACIÓ DE L'EXTREM C-TERMINAL	73
2.2.14. DETERMINACIÓ DE L'EXTREM N-TERMINAL	74
2.2.15. CARBOXIMETILACIÓ DE LA PROTEÏNA	75
2.2.16. HIDRÒLISI TRÍPTICA DE LA PROTEÏNA	76
2.2.17. DIGESTIÓ AMB BROMUR DE CIANOGEN	78
2.2.18. CROMATOGRAFIA EN PAPER	78
2.2.19. ELECTROFORESI D'ALT VOLTATGE	79
2.2.20. SISTEMES DE DETECCIÓ DE PÈPTIDS	80
2.2.21. MAPES PEPTÍDICS ANALÍTICS I PREPARATIUS.....	81
2.2.22. ELUCIÓ DE PÈPTIDS	84
2.2.23. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ -HPLC-..	84
2.2.24. CROMATOGRAFIA DE GASOS	87
<u>3. DETERMINACIÓ DE PROPIETATS DE L'ADH EN EXTRACTE CRU EN</u> <u>16 ESPÈCIES DE DROSOPHILA.</u>	96
3.1. ACTIVITAT ADH AL LLARG DEL CICLE VITAL	98
3.2. DETERMINACIÓ DE LC/50 PER ETANOL I ISOPROPANOL ...	103
3.3. ESTABILITAT DE L'ENZIM EN EXTRACTE CRU	120
3.4. DETERMINACIÓ DEL pH ÒPTIM DE L'ENZIM	120
3.5. PUNTS ISOELÈCTRICS	137
3.6. PES MOLECULAR DE L'ENZIM NADIU	141

<u>4. PURIFICACIÓ DE L'ADH DE DROSOPHILA HYDEI.</u>	145
4.1. JUSTIFICACIÓ DE LA TRIA DE L'ESPÈCIE	147
4.2. ESQUEMA DE LA PURIFICACIÓ	151
4.3. CRITERIS DE PURESA	159
<u>5. ESTUDIS FUNCIONALS AMB L'ADH DE D.HYDEI.</u>	165
5.1. ESTABILITAT DE L'ENZIM PUR	168
5.2. PES MOLECULAR DEL MONÒMER D'ADH	168
5.3. ABSORCIÓ MOLAR DE L'ADH	171
5.4. DETERMINACIÓ DEL pH ÒPTIM DE L'ADH	173
5.5. PARÀMETRES CINÈTICS DE L'ADH	176
<u>6. ESTUDIS ESTRUCTURALS AMB L'ADH DE D.HYDEI.</u>	196
6.1. COMPOSICIÓ D'AMINOÀCIDS DEL MONÒMER D'ADH	198
6.2. DETERMINACIÓ DE METIONINA EN LA MOLÈCULA	204
6.3. DETERMINACIÓ DE L'EXTREM N-TERMINAL	206
6.4. DETERMINACIÓ DE L'EXTREM C-TERMINAL	206
6.5. CARBOXIMETILACIÓ	208
6.6. DIGESTIÓ TRÍPTICA	210
6.7. MAPES PEPTÍDICS ANALÍTICS	210
6.8. MAPES PEPTÍDICS PREPARATIUS	225
6.9. HPLC	239
<u>7. METABOLISME DELS ALCOHOLS A DROSOPHILA.</u>	272
7.1. RESPOSTA BIOLÒGICA A INGESTA D'ALCOHOLS	274
7.2. DETERMINACIÓ DE LA COMPOSICIÓ DEL MEDI NUTRITIU SUPLEMENTAT	278
7.3. ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES . DESCRIPCIÓ D'UNA ACTI- VITAT REDUCTÀSICA NADPH-DEPENENT	279
7.4. CROMATOGRAFIA DE GASOS	286
7.5. PROVES EXPERIMENTALS	293
7.6. RECUPERACIÓ DE L'ACTIVITAT ADH DESPRÉS DE TRACTA- MENT AMB ISOPROPANOL	305
<u>8. DISCUSSIÓ.</u>	314
8.1. PROPIETATS DE L'ENZIM ADH EN 16 ESPÈCIES DE <u>DROSO-</u> <u>PHILA</u>	315
8.2. PURIFICACIÓ DE L'ADH A <u>D.HYDEI</u> I PROPIETATS FUN- CIONALS	319

8.3. ESTUDIS ESTRUCTURALS DE L'ADH DE <u>D.HYDEI</u>	326
8.4. METABOLISME DELS ALCOHOLS A <u>DROSOPHILA</u>	349
<u>9. CONCLUSIONS.</u>	361
<u>10. BIBLIOGRAFIA</u>	366

-7- INTRODUCCIÓ,



1. INTRODUCCIÓ.

1.1. DESCRIPCIÓ DE L'ENZIM Adh EN DE DROSOPHILA

1.1.1. PRODUCCIÓ.

1.1.2. LOCALITZACIÓ.

1.1.3. RACONS D'ACTIVITAT.

1.1.4. SUBSTRAT.

1.2. DIFERÈNCIES ENTRE L'ENZIM Adh EN ELS MAMÍFERS.

-1- INTRODUCCIÓ.

1.1.1. PRODUCCIÓ I ORIGEN.

1.1.2. CARACTERITZACIÓ DE L'Adh.

1.1.3. ANÀLISI ENZIMÀTICA.

1.1.4. ORIGEN Adh I Adh-ARN.

1.1.5. ANÀLISI QUÍMICA I HISTOLÒGICA.

1.1.6. DIFERÈNCIES ENTRE EL GÈNERE DROSOPHILA.

1.2. DIFERÈNCIES ENTRE L'ENZIM Adh EN ELS MAMÍFERS.

1.2.1.1. DIFERÈNCIES ENTRE L'ADH.

1.2.1.2. DIFERÈNCIES ENTRE L'ADH I DROSOPHILA.

1.2.1.3. DIFERÈNCIES ENTRE L'ADH I DROSOPHILA.

1.4. OBJECTIUS DEL PRESENT TREBALL.

1. INTRODUCCIÓ.

1.1. DESCRIPCIÓ DE L'ENZIM ADH EN NO DROSOPHÍLIDS.

- 1.1.1. PROCARIOTES.
- 1.1.2. LLEVATS.
- 1.1.3. PLANTES SUPERIORS.
- 1.1.4. MAMÍFERS.

1.2. METABOLISME DE L'ETANOL EN ELS MAMÍFERS.

- 1.2.1. VIA ADH.
- 1.2.2. VIA CATALASA.
- 1.2.3. VIA MAOS.

1.3. L'ENZIM ADH A DROSOPHILA.

1.3.1. ESTUDIS GENÈTICS.

- 1.3.1.1. LOCALITZACIÓ DEL GEN Adh.
- 1.3.1.2. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA.
- 1.3.1.3. AL.LELOENZIMS.POLIMORFISME I SELECCIÓ.

1.3.2. ESTUDIS BIOQUÍMICO-ESTRUCTURALS.

- 1.3.2.1. ISOZIMS. DESCRIPCIÓ I ORIGEN.
- 1.3.2.2. PURIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE L'ADH.
- 1.3.2.3. MECANISME DE CATÀLISI ENZIMÀTICA.
- 1.3.2.4. CARACTERITZACIÓ DEL GEN Adh i ARN-Adh.
- 1.3.2.5. REGULACIÓ ONTOGÈNICA I HISTOLÒGICA.
- 1.3.2.6. L'ENZIM ADH DINS EL GÈNERE DROSOPHILA.

1.3.3. ESTUDIS BIOQUÍMICO-FUNCIONALS.

- 1.3.3.1. TOLERÀNCIA A L'ETANOL.
- 1.3.3.2. FUNCIÓ DE L'ADH A DROSOPHILA.
- 1.3.3.3. METABOLISME DE L'ETANOL A DROSOPHILA.

1.4. OBJECTIUS DEL PRESENT TREBALL.

1.1. DESCRIPCIÓ DE L'ENZIM ADH EN NO DROSOPHÍLIDS.

Hom coneix com "alcohol deshidrogenasa" (ADH) l'enzim que és capaç de catalitzar l'oxidació biològica d'un alcohol al corresponent aldehid o cetona, utilitzant un coenzim adenilat (NAD^+ o NADP^+) com a acceptor de potencial reductor. Aquests enzims es classifiquen segons les normes internacionals (International Enzyme Commission) com E.C.1.1.1.1. i són presents al llarg de tota l'escala evolutiva dels éssers vius, si bé amb una estructura i característiques funcionals molt diverses. El conjunt mostra una gran heterogeneïtat, ja que inclou enzims que actuen sobre alcohols pròpiament dits i enzims que oxiden productes tan diversos com esteroids, mono- i poli-sacàrids o poli-alcohols, tots ells amb grups hidroxil en la seva molècula. Un altre factor diferencial entre les ADH és el receptor d' e^- que utilitzen, ja que, a més a més d'aquelles que funcionen amb NAD^+ o NADP^+ com a coenzim (el grup més nombrós), n'hi ha que utilitzen FAD, metasulfonat de fenacina o d'altres.

Una característica general de totes les ADH és el fet que acostumen a estar presents en un mateix organisme diverses formes moleculars, fruit, bé d'una variació genètica que es tradueix en una variació de les cadenes polipeptídiques que configuren l'enzim, bé de modificacions post-traduccionals a partir d'un sol model de cadena proteica.

Les veritables funcions "in vivo" d'aquest enzim resten encara fosques per a molts organismes estudiats, i, segons la seva especificitat de substrat o l'òrgan on són presents, se li han atribuït papers tan dispars com detoxificació de l'ingesta d'alcohols (etanol), metabolisme hidrocarbonat, metabolisme hormonal, processos de la visió, etc. El fet que en una àmplia gama d'organismes es coneguin mutants deficients totalment o parcial en ADH sembla excloure qualsevol vital per a aquest enzim.

Els organismes on l'estudi de l'enzim ADH ha estat més estès són: els procariotes, llevats, fongs, plantes superiors, insectes, peixos, amfibis, aus i mamífers, podent recalcar en aquest darrer cas la rata, el cavall i l'home. Des d'un altre punt de vista, el repàs de tota la literatura existent sobre aquest enzim revela dues grans directrius principals. D'una banda hi ha l'intent d'establir un possible nexa evolutiu entre tots els enzims ADH que mostren característiques d'actuació paral·leles al llarg de tota la filogènia, determinant si hom es troba davant casos d'homologia o analogia evolutiva. Els estudis duts a terme en aquest camp consisteixen fonamentalment en la comparació de les estructures primària, secundària i terciària de les molècules de l'enzim -més recentment de l'ADN genòmic- així com de les característiques cinètiques, amb les condicions d'activitat "in vivo". Dins de cada taxò, els estudis estructurals inclouen també la determinació de totes les característiques dels isozims o al·lelozims presents. Per un altre costat, s'intenta determinar quines són les veritables funcions de l'enzim en l'organisme i quines relacions hi ha entre aquestes funcions, les diferents formes moleculars de l'enzim presents, la seva distribució orgànica, la regulació durant el desenvolupament de la seva expressió, o determinades patologies relacionades amb els alcohols. Estudis derivats de l'existència d'isozims en molts organismes són els de genètica de poblacions, que intenten decidir si les diferents formes enzimàtiques segueixen una distribució amb bases geogràfiques o ecològiques, o si tenen un paper adaptatiu en front a determinades condicions ambientals.

1.1.1. PROCARIOTES.

Les alcohol-deshidrogenases que han estat aïllades a partir de molts microorganismes mostren una heterogeneïtat tant respecte a l'especificitat de substrat com a l'acceptor de potencial reductor, paral·lela a la complexitat i varietat de les vies metabòliques del regne procariota. Hom detecta ADH en fonts tan diverses com Escherichia coli, Clostridium acetobutylicum, Leuconostoc mesenteroides, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus stearothermophilus i Streptococcus mutants.

Aquest enzim és NAD-depenent i presenta afinitat de substrats anàlogues a les de l'ADH d'organismes superiors. Els treballs de seqüenciació de Kolb i Harris (1971) van demostrar que, malgrat que l'homologia de les ADH de procariotes i mamífers era molt baixa -amb diferències de grandària, composició d'amino-àcids, bloqueig del grup amino-terminal-, hi havia uns residus conservats en posicions idèntiques, presumiblement relacionats amb el locus actiu de l'enzim. La gran diversitat de microhàbitats on es desenvolupen els procariotes, fa impossible qualsevol comparació de funció metabòlica de l'ADH procariòtica i eucariòtica.

1.1.2. LLEVATS.

L'enzim ADH aïllat del llevat Saccharomyces cerevisiae va ésser la primera ADH purificada i cristal·litzada (Sund i Theorell, 1963). L'ADH de llevat (YADH) és un enzim constitutiu, responsable de la fermentació alcohòlica que realitza Saccharomyces en condicions anaeròbiques, i que mostra una elevada especificitat de substrat cap a l'acetaldehid i l'etanol. La reacció es troba normalment desplaçada cap a la formació d'etanol, o sigui, en sentit reductor. Aquesta preferència per substrats de cadena alifàtica curta i la major afinitat envers alcohols primaris que secundaris, són característiques totalment contràries a les de l'ADH dels organismes superiors.

Per estudis de seqüenciació (Dickinson i Daziel, 1967 i Jörnvall 1973) hom va comprovar l'existència en el locus actiu de l'enzim de substitucions que reduïen l'espai disponible per a la unió del substrat (cadena lateral del triptòfan i la treonina), fet que podria explicar l'especificitat esmentada. A partir d'aquests estudis, se sap que la forma activa de l'enzim és un tetràmer de pes molecular de 150.000 a 160.000d., format per 4 subunitats idèntiques (35.000 a 36.000 d), susceptibles de sofrir modificacions post-traduccionals, ja que per anàlisi electroforètica es detecta més d'una banda d'activitat ADH. Cada subunitat allotja 1 o 2 àtoms de zinc, indispensables per a l'acció

catalítica de l'enzim. La cadena proteica presenta un 40% d'homologia amb l'ADH de fetge de cavall, homologia acumulada en les regions bàsiques per al funcionament de l'enzim, fet que indica una conservació de les seqüències catalítiques al llarg de l'evolució.

Schimpfessel (1967) va descriure l'existència d'una segona ADH en el llevat, induïble per lactat i etanol i reprimible per glucosa, que juga un paper important en el metabolisme oxidatiu de Saccharomyces, concretament en la gluconeogènesi a partir d'etanol.

Encara en 1972, Fowler i col. varen demostrar una tercera ADH en llevat, de localització mitocondrial. Tots tres enzims són sintetitzats a partir de gens independents i no lligats.

1.1.3. PLANTES SUPERIORS.

Ha estat descrita l'existència de alcohol-deshidrogenases en la majoria de monocotiledònies i dicotiledònies estudiades: te, blat de moro, blat, civada, ordi, pèsol, cacauet, etc. i confirmada també la presència de Zn^{++} en coordinació. El cas millor estudiat és el del blat de moro (Zea mays), pel grup de Schwartz. En aquesta espècie, l'ADH és un dímer format per dues subunitats polipeptídiques diferents, cadascuna de les quals es codificada per un gen diferents - Adh_1 i Adh_2 - no lligats entre sí. Cada subunitat té un pes molecular de 60.000d. S'han identificat diferents al·lels per a cada gen, mutants ADH-null i gens modificadors de l'expressió gènica d' Adh_1 i Adh_2 . L'enzim és induïble en condicions anaeròbiques. Aquest control s'exerceix per regulació de la transcripció dels gens corresponents.

1.1.4. MAMÍFERS.

Els estudis de l'ADH en mamífers s'han centrat

principalment en tres espècies -rata, cavall i home- i quasi exclusivament en les formes hepàtiques d'aquest enzim (LADH). Els estudis esmentats presenten dues vessants principals: per un costat la comparació estructural de la molécula proporciona informació sobre el grau d'evolució de l'enzim dins de la filogènia del taxò i de la correspondència entre els punts més conservats de la seqüència i el paper que juguen en la catàlisi enzimàtica. D'altra banda, és manifest l'interès que comporta l'estudi del metabolisme dels compostos alcohòlics, principalment en l'home, per als problemes patològics i socials que l'alcoholisme representa.

Rata (Rattus sp.).

L'ADH de fetge de rata va ésser purificada primerament per Arslanian (1971) i Markovic (1971), que varen obtenir-la també en forma cristal·litzada. És un dímer de PM 80.000 format per monòmers idèntics entre sí. No s'ha detectat fins ara l'existència de més d'una estructura proteica en les subunitats, si bé l'enzim actiu proporciona bandes electroforèticament distingibles. Aquestes formes han estat atribuïdes per Jörnvall (1973) a diferències en l'estat redox dels grups sulfhidril de les cisteïnes, ja que les bandes són intercanviables per tractament amb tiols. Aquesta hipòtesi vindria reforçada per la presència d'un alt nombre de residus cisteïna -16- per subunitat, que explicarien l'alta reactivitat de la molècula front els tiols. L'ADH de fetge de rata presenta un 80% d'homologia respecte la de cavall amb unes regions catalítiques perfectament assimilables.

Cavall (Equus caballus).

Els estudis amb ADH de fetge de cavall (HLADH) començaren en 1948 amb els treballs de Bonnichen sobre la cristal·lització de l'enzim, però va ésser Jörnvall qui en 1970 va aconseguir la seva purificació i caracterització. L'enzim actiu és un dímer de PM 80.000d format per dos tipus de monòmers (E i S) (Pietrusko , Theorell 1969) amb 4 àtoms de Zn

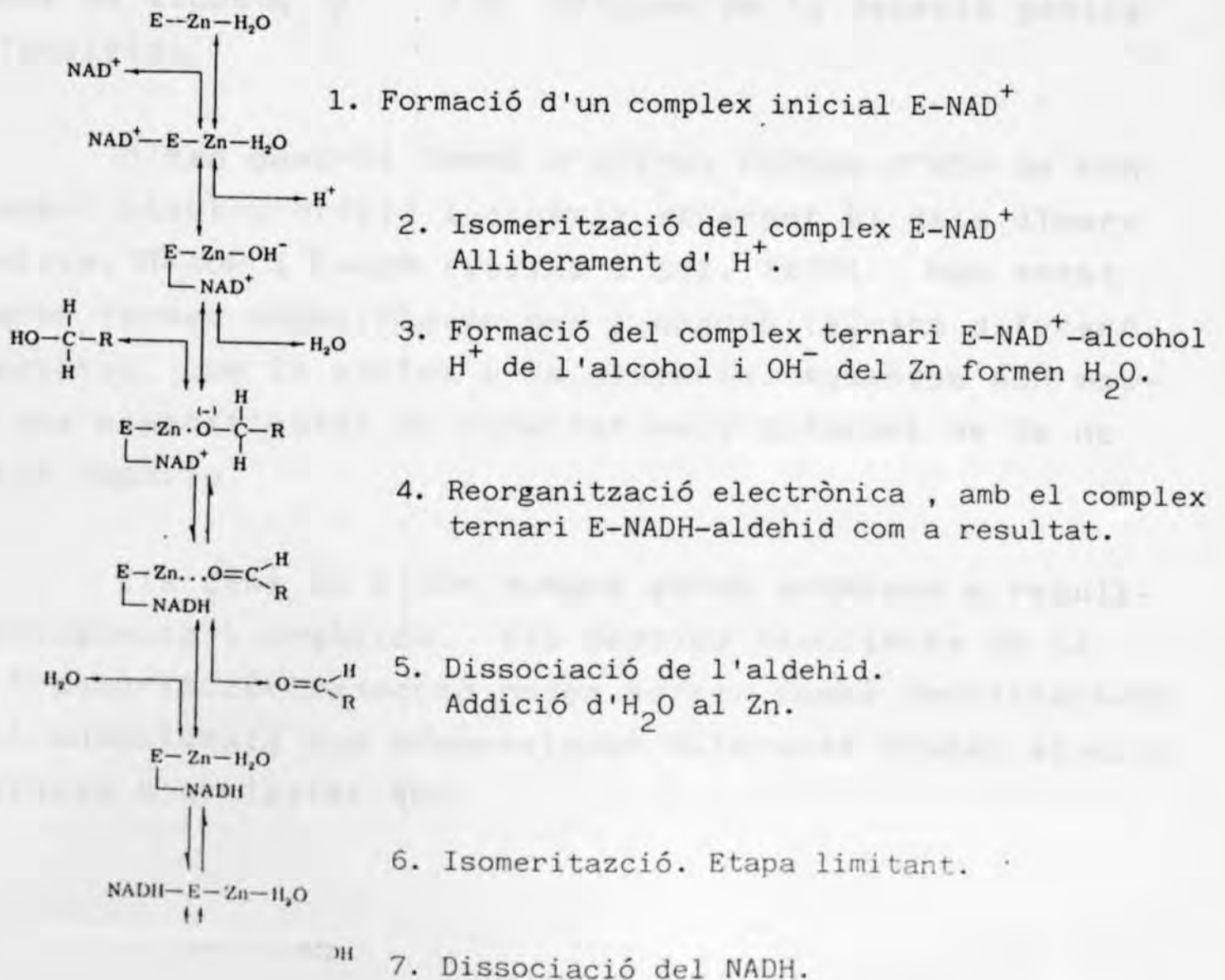
coordinats , dos per subunitat, i dos dels quals actuen en la catàlisi enzimàtica i els altres dos són estructurals. Les possibles combinacions de monòmers (EE/ES/SS) conformen el patró de bandes electroforèticament identificables. La cadena E té un pI més àcid que la cadena S, fet que explica els punts isoelèctrics dels dímers, determinats en 10.0 (SS), 9.3 (ES) i 8.7 (EE). Entre les cadenes proteiques E i S hi ha sis substitucions d'aminoàcids, tres de les quals suposen un increment de càrrega positiva que explica les diferències de pI. Els dímers EE són molt actius front l'etanol , mentre que els SS ho són molt amb esteroids. L'heterodímer mostra una activitat intermitja envers ambdós substrats. Sembla que els responsables d'aquesta especificitat diferencial són també les tres substitucions abans esmentades (110 Phe--Leu, 115 Asp--Ser, 94 Thr--Ile) a causa dels canvis espacials i de càrrega que introdueixen en el locus catalític de l'enzim.

Ambdues cadenes, E i S, consten de 374 residus, amb 14 cisteïnes i extrem amino-terminal acetilat. Els gens que les codifiquen semblen haver-se originat per duplicació gènica recent. Dins de cada una de les formes s'hi poden distingir diferents "subformes", interconvertibles segons les condicions del medi. Els responsables d'aquests fenòmens poden ésser la unió de factors extrínsecs, l'existència de conformòmers o formes deaminades i/o oxidades. Mitjançant estudis de densitat als electrons, Bränden i col. (1975) , varen resoldre l'estructura tridimensional de l'enzim actiu i la localització dels àtoms de Zn. Cada subunitat forma un el·lipsoide de 45x60x110 Å, més ample en les vores que en el nucli. Cada subunitat està dividida en dos dominis, units per un pont peptídic i separades per l'espai del locus actiu: 143 aminoàcids formen part del locus d'unió del coenzim i 231 del d'unió del substrat. Les característiques de l'estructura secundària d'ambdós dominis són molt diferents:

<u>coenzim</u>		<u>substrat</u>
44%	hèlix- α	18%
32%	fulla- β	35%
13%	"reverse bends"	14%
10%	-----	33%

El domini del coenzim mostra una estructura molt similar a la de la regió homòloga dels enzims lactat-DH, malat-DH i alfa-glicerofosfat-DH (Rossman, 1975), fet que concorda amb la teoria de l'origen comú de les seqüències receptores del coenzim en totes les deshidrogenases NAD^+ i NADP^+ -depenents. Una gran part de la cadena proteica sense estructura secundària determinada del locus catalític està implicada en la unió de l'àtom de zinc.

El mecanisme de catàlisi enzimàtica per la HLADH va ésser suggerit per Eklund i col (1974), combinant els resultats obtinguts per estudis cristal·logràfics i cinètics : la reacció segueix un model de segon ordre (Mecanisme de Theorell i Chance) segons l'esquema següent:



Home (Homo sapiens).

L'ADH humana de fetge va ésser purificada en 1964 per Wartburg i cristal·litzada en 1967 per Mourad i Woronick, i després àmpliament estudiada per Smith i Vallee. L'enzim actiu és un dímer de PM 80.000 format per dues cadenes polipeptídiques que guarden gran homologia amb l'ADH de cavall (un 90%). L'enzim actua sobre un gran ventall de compostos -alcohols primaris i secundaris, alifàtics, cíclics, aromàtics- de manera que l'etanol està molt lluny d'ésser el substrat més afi. L'afinitat envers un compost s'incrementa amb la longitud de la cadena hidrocarbonada, la introducció d'enllaços insaturats i les substitucions aromàtiques.

La genètica de l'ADH humana mostra un patró d'elevada complexitat, desxifrat per Smith (1971). Els monòmers resulten de l'expressió de tres gens autosòmics independents -Adh₁, Adh₂, Adh₃- que codifiquen respectivament per cadenes tipus α , β i γ . S'han identificat variants al·lelomòrfiques per a les cadenes β (β_1 i β_2) i γ (γ_1 i γ_2). El dímer resulta d'una de les possibles combinacions binàries entre cadenes de tipus α , β , i γ pròpies de la dotació gènica de l'individu.

S'han descrit també d'altres formes d'ADH de comportament electroforètic i cinètic diferent al dels dímers esmentats: π -ADH i χ -ADH (Vallee i col. 1977). Han estat aïllades formes específiques per a alguns teixits diferent a l'hepàtic, com la retina o la placenta. Aquestes ADH mostren una especificitat de substrat molt diferent de la de l'enzim hepàtic.

Els gens de l'ADH humana estan sotmesos a regulació ontogènica i orgànica. Els pèptids resultants de la seva transcripció-traducció poden sofrir també modificacions post-traduccionals que proporcionen diferents bandes electroforètiques d'activitat ADH.

Les funcions biològiques tradicionalment atribuïdes a l'ADH humana són des de detoxificació de l'ingesta d'etanol fins a la metabolització d'un ampli espectre de compostos que inclouen grups hidroxil, com β -esteroids, àcids grassos, etc.

Per acabar, cal recalcar que són de gran importància els estudis del polimorfisme de l'ADH en poblacions humanes i la correlació que hi pugui existir amb l'origen ètnico-geogràfic i la incidència i efectes de la consumició de begudes alcohòliques en cada una d'elles.

1.2. METABOLISME DE L' ETANOL EN ELS MAMÍFERS.

1.2.1. VIA ADH.

Encara que hi ha molts aspectes problemàtics en el metabolisme de l'etanol en els mamífers, hom assumeix que l'ADH hepàtica és el principal i màxim responsable de l'oxidació de l'etanol a acetaldehid. Per hepatectomia, s'observa una reducció del 75 al 90% de la metabolització de l'etanol. El remanent observat s'ha d'atribuir a sistemes aliens a l'ADH, com són l'acció peroxidàsica de la catalasa i el sistema microsomal d'oxidació d'etanol (MEOS), ambdós descrits en aquest mateix capítol.

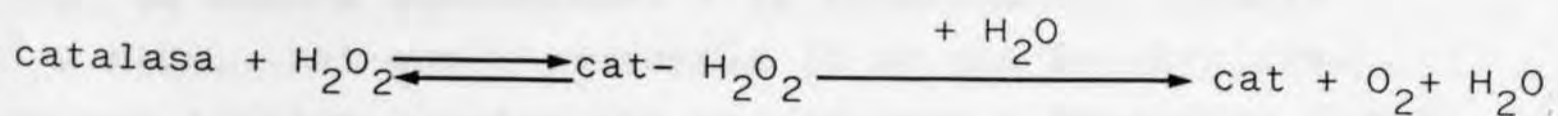
L'ADH hepàtica és un enzim citoplasmàtic amb una afinitat relativament baixa per l'etanol, amb la particularitat que l'equilibri $\text{etanol} \rightleftharpoons \text{acetaldehid}$ es troba, en condicions fisiològiques, molt desplaçat cap a la formació d'etanol. Aquest etanol format per l'acció de l'ADH seria oxidat a la mitocondria pel MEOS en condicions normals. Quan hi ha ingesta d'etanol, aquest és ràpidament oxidat per l'ADH a acetaldehid en desplaçar-se l'equilibri abans esmentat. L'acetaldehid és oxidat a acetat per l'aldehid-DH i l'acetat és assimilat directament via coenzim-A al metabolisme intermediari.

L'etanol i l'acetaldehid són compostos altament tòxics per a les diferents cèl.lules i teixits de l'organisme, per tant, la importància i duració dels seus efectes dependrà de la concentració d'aquests compostos en sang, i la velocitat de reacció de l'ADH i l'aldehid-DH. D'altra part, una activitat incrementada d'aquestes dues deshidrogenases altera dràsticament el quocient NAD^+/NADH de l'hepatòcit i el seu potencial redox, fet que exigeix l'existència de sistemes d'eliminació de potencial reductor. El veritable paràmetre limitant en la metabolització de l'etanol sembla radicar més en l'eliminació del NADH que no pas en factors intrínsecs de l'ADH, i s'han trobat diversos compostos activadors de la taxa ingesta/utilització metabòlica de l'etanol que tenen com a denominador comú el fet de procurar una via de drenatge del NADH cel.lular. Vies naturals que fan aquesta funció poden ésser l'activació de la lactat-DH o la reducció de diferents aldehids. La incorporació del NADH a la cadena respiratòria és també lògicament una etapa limitant per a l'assimilació dels alcohols.

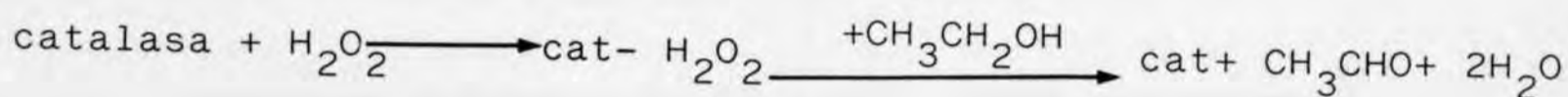
S'ha demostrat que la fructosa incrementa la metabolització d'etanol. Hom hipotetitza que la fructosa proporciona directament o indirectament (via gliceraldehid) bons substrats acceptors de potencial reductor. S'ha proposat també la transhidrogenació del coenzim: el NADH format per acció de l'ADH seria transformat en últim terme a NADPH via oxalacetat/malat/piruvat/oxalacetat/aspartat o citrat. El NADPH és el coenzim que subministre potencial reductor en les vies anabòliques cel.lulars i pot ésser utilitzat en d'altres reaccions com les reduccions microsomals o les catalitzades per les aldehid-reductases. Aquesta transhidrogenació és una hipòtesi que es veu confirmada pel fet que els substrats de vies biosintètiques i el gliceraldehid es coneixen com a potenciadors de l'assimilació alcohòlica.

1.2.2. VIA CATALASA.

Keilin (1945) va demostrar que la reacció catalitzada per la catalasa:



podia transcórrer també amb donadors d'hidrogen diferents d'una segona molècula de H_2O_2 del sistema anterior, entre les quals hom pot incloure l'etanol:



Aquesta reacció resta limitada als peroxisomes (De Duve 1966) ja que és en aquest orgànul on es localitza el peròxid d'hidrogen cel.lular.

1.2.3. VIA MAOS.

En 1965, Orme i Johnson, i Ziegler, varen descriure l'oxidació d'etanol per un sistema enzimàtic depenent de NADPH i oxigen lliure, i localitzat citològicament en els microsomes:



Encara avui en diano s'ha pogut establir quina és la importància quantitativa d'aquest sistema enzimàtic en la metabolització de l'etanol per l'organisme.

MAOS = Microsomal-Alcohol-Oxidizing-System

MEOS = Microsomal-Ethanol-Oxidizing-System.

1.3. L'ENZIM ADH A DROSOPHILA.

L'enzim ADH de Drosophila catalitza l'oxidació d'alcohols primaris o secundaris al corresponent aldehid o cetona, de manera concomitant a la reducció del coenzim NAD^+ a NADH. Tal com s'assenyala ja en els primers treballs amb l'enzim, realitzats per Johnson i Denniston, l'any 1964, i confirmats per Jacobson (1970), l'enzim és inactiu amb metanol com a substrat, però mostra una amplíssima capacitat de catàlisi envers els alcohols primaris i secundaris, alifàtics o insaturats, cíclics o aromàtics.

Diversos autors (Grell i col. 1965, Ursprung i Leone 1965) varen assenyalar també l'existència de diferents formes actives de l'enzim, separables mitjançant tècniques electroforètiques, que s'explicaven gràcies a un model d'al·lèlisme, on cada variant presentava a la vegada, diferents formes isomòrfiques. A Drosophila melanogaster , els dos al·lèls es varen denominar FAST i SLOW (segons la seva mobilitat en gels electroforètics), i es va comprovar la seva coexistència en poblacions naturals. Avui en dia , es troben descrits d'altres al·lèls minoritaris en la natura així com formes que responen a un altre tipus de variabilitat , com termosensibilitat o idoneïtat de pH.

Des d'aquests primers estudis dels anys 1964-1965, una gran quantitat de literatura ha aparegut al voltant de l'enzim ADH de Drosophila . Per tal d'estructurar mínimament aquesta presentació, i assumint d'entrada que tots els aspectes es troben entrallaçats i no es poden ignorar mútuament, s'han dividit els centres d'interès dels estudis segons l'esquema presentat de la introducció.

1.3.1. ESTUDIS GENÈTICS.

1.3.1.1. LOCALITZACIÓ DEL GEN ADH.

El gen Adh de Drosophila melanogaster ha estat degudament mapat, tant genèticament com citològicament. Les primeres descripcions del producte gènic revelaren ja que l'enzim presentava diverses formes al·lèliques que es podien unir en heterozigosi per a donar els consegüents híbrids (Johnson i Denniston, 1964 ; Grell 1965; Ursprung i Leone 1965). Grell va utilitzar aquestes variants electroforètiques per a mapar genèticament el locus Adh: va resultar localitzat en el braç esquerre del segon cromosoma, en posició 2:50.1, entre els marcadors "elbow" (50.0) i "reduced-scraggly" (51.0). Courthright (1966) va confirmar aquests resultats. El mateix autor va situar el gen Adh en el mapa de Bridges dels cromosomes politènics de D. melanogaster, entre les bandes 34E3 i 35D1. Woodruff i Ashburner (1979), en un magnífic estudi exhaustiu de la regió que comprèn el gen Adh en aquesta espècie, concreten la seva situació a les bandes 35B2-B3, amb més probabilitats per a la primera.

Els darrers estudis que s'han dut a terme en aquest camp , consisteixen en la hibridació "in situ" de cromosomes politènics de D. melanogaster, utilitzant com a sonda radioactiva el mateix gen Adh clonat per Goldberg (1980). Els resultats obtinguts -banda 35B1- coincideixen doncs plenament amb la localització genètica de Woodruff i Ashburner. (Benjayati i col. 1980, Goldberg 1980).

Recentment, Oakeshott i col. (1982) han descrit algunes espècies del subgrup mulleri (grup Repleta) on hi ha una clara evidència genètica d'una duplicació del gen Adh. Ambdós loci estan mapats a 0.4 ± 0.3 cM l'un de l'altre, no codifiquen per proteïnes idèntiques i la seva expressió relativa sembla regulada durant l'ontogènia. Els autors remarquen que aquest fenomen, descrit primordialment a D. buzzatti es podria haver estès en d'altres espècies del mateix grup, representant una duplicació recent de la regió cromosòmica que comprèn aquest gen.



1.3.1.2. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA D'Adh.

D'altres estudis varen encaminar-se de seguida a posar en evidència el control genètic a què podia estar sotmesa l'expressió del gen Adh, tractant de localitzar en els cromosomes de Drosophila melanogaster loci que afectessin els valors normals d'activitat enzimàtica. Ward i Hebert (1972) deduïren l'existència de gens modificadors per explicar les diferències en activitat ADH entre soques d'un mateix al·lel, localitzant-los en els cromosomes 2, 3 i X. Ward (1975) defineix l'activitat ADH com un caràcter quantitatiu de variabilitat contínua, fet que demostra per selecció artificial positiva sobre l'activitat enzimàtica. L'anàlisi genètica d'aquests resultats mostrava que la diferència provenia en un 80% de modificadors sobre el cromosoma 2 i en un 20% de modificadors sobre el cromosoma 3. Barnes i Birley (1975) i Pipkin i Hewit (1971) assenyalen factors situats sobre el cromosoma X. McDonald i col. (1977, 1978) realitzen una selecció artificial durant 28 generacions per a tolerància a l'etanol. Donat que comproven que el producte gènic final (proteïna ADH) no ha sofert cap modificació respecte la inicial, l'increment d'activitat s'atribueix a l'acció de gens modificadors que han estat seleccionats positivament i que han fet augmentar el nombre de molècules presents en cada individu. Els autors van encara més lluny en postular un model de regulació anàleg a l'operó bacterià, ja que, donada la distància física entre els gens modificadors (cromosoma 2 i 3) i el gen estructural, l'acció dels primers s'hauria de dur a terme mitjançant molècules reguladores, l'acció de les quals sobre les seqüències adjacents al gen, provocaria la modulació desitjada. Malgrat com és d'atractiu aquest model, presenta serioses dificultats, sobre les quals no s'ha aportat cap mena de dada. Així, hom pot argüir que:

-no hi ha cap evidència de l'existència de macromolècules reguladores, ni de l'enllaç de cap possible candidat (ja sigui pèptid, proteïna, ARN o ADN) a regions properes al gen estructural.

-no hi ha cap evidència que la modulació de l'expressió gènica es realitzi a nivell de control transcripcional.

-tampoc hi ha evidències suficients que demostrin que l'increment d'activitat enzimàtica sigui realment causat per un increment del nombre de molècules d'ADH, i no a modificacions epigenètiques de la mateixa proteïna. Tot i admetent la primera hipòtesi, l'augment de nivells de producte gènic tant pot ésser causa d'una síntesi incrementada com d'una degradació retardada o disminuïda.

Maroni (1978) , en experiments paral·lels de selecció en isolínies de D.melanogaster de cada un dels dos al·lels d'ADH , sembla demostrar satisfactòriament que la regulació de l'activitat catalítica s'exerceix via nombre de molècules d'ADH acumulades en l'adult, tot localitzant també un element de control en el mateix cromosoma 2. El mateix autor , en 1982 que, a més a més dels elements moduladors de quantitat de proteïna, hi ha elements(un dels quals es localitza en el cromosoma 3) que modifiquen post-traduccionalment el pèptid, proporcionant un enzim amb característiques catalítiques diferenciades. Birley i col. (1981) ho confirmen en seleccionar un factor del cromosoma 3 que sembla influir en les constants cinètiques dels enzims sintetitzats.

Finalment, una altra línia de treball sobre la regulació gènica de l'ADH segueix l'assumpció de l'existència de regions de control adjacents a les zones codificadores del gen. La primera temptativa en aquest camí la va realitzar Thompson (1977) en localitzar una mutació a 0.01cM del locus estructural, que n'afecta l'expressió.

Amb les tècniques darrerament desenvolupades d'anàlisi directa del genoma, s'ha de suposar que la localització del gen o seqüència que afecti la transcripció o traducció de l'ADH ha de trobar noves respostes. Problemes de regulació, com la regulació histològica o ontogènica, estan essent també profundament estudiats mitjançant tècniques d'enginyeria genètica, tal com es detallarà en l'apartat 1.3.2.5.

1.3.1.3. AL.LELOENZIMS. POLIMORFISME I SELECCIÓ.

Ultra els dos al.lels majoritaris que presenta D. melanogaster pel gen Adh (Adh-slow i Adh-fast), se n'ha aïllat d'altres de diferent mobilitat electroforètica o diferent termosensibilitat a partir de poblacions naturals, on es troben en freqüència molt baixa. D'altres al.lels han estat induïts per mutagènesi com l'al.lel D, a partir del Fast, per Grell (1965). Entre els al.lels minoritaris esmentats, cal assenyalar:

US (Ultra-Slow)	Rússia	(Grossman i col 1970)
UF (Ultra-Fast)	La Manxa	(Thatcher 1977)
FF (Faster than fast)	USA	(Sampsell 1977)

Dels altres paràmetres que donen variabilitat en aquest locus, el més estudiat és el de termosensibilitat/termoresistència. Els mateixos al.lels ADH-F i ADH-S inclouen tota una gama de variabilitat dins de cada classe electroforètica, si bé ADH-S és més termoresistent que ADH-F (Gibson 1970). Moltes de les variants termoresistents han estat aïllades i caracteritzades (Thörig 1975, Milkman 1976, Sampsell 1977). Lewis i Gibson (1978) descriuen la variant termoresistent "Château Douglas" en les poblacions australianes. També s'ha aïllat molts mutants defectius en activitat ADH (mutants null) a partir de poblacions naturals (Girard i Palabost, 1976). Evidentment tota la variabilitat esmentada, detectable a nivell fenotípic, no és més que un reflex del polimorfisme real que inclou qualsevol canvi d'un nucleòtid en la seqüència del gen. Darrerament, s'ha posat de manifest aquesta variabilitat a nivell d'ADN entre soques dels diferents electromorfs (veure apartat 1.3.2.4.)

Una vegada establerta l'existència d'aquests polimorfismes, hom va tractar de trobar resposta a la qüestió de com és mantenien en poblacions naturals. Tenia algun dels al.lels un valor adaptatiu en front d'alguna situació ambiental concreta, de manera que es produeixi una

selecció positiva ? Cal remarcar que la complexitat intrínseca d'aquesta pregunta es veu agreujada per una desconeixença quasi absoluta de la veritable funció de l'enzim ADH a Drosophila i el seu paper en la metabolització dels alcohols.

Una primera aproximació al problema exigeix un estudi de les possibles correlacions entre les freqüències gèniques de cada un dels al.lels en diferents poblacions i algun dels paràmetres ambientals que les caracteritzin. Vigue i Johnson (1973) varen demostrar que les freqüències dels al.lels F i S seguien una clina N/S als Estats Units. La clina reseguia el gradient de temperatura d'aquelles terres, de manera que Adh-F es troba en major freqüència en les poblacions nòrdiques i va deixant pas progressivament a Adh-S a mida que ens apropem a la frontera mexicana, on aquest és ja majoritari. Birley i Barcenes (1973) varen descriure que les línies portadores de l'al.lel F presentaven activitat ADH específica més alta que les de l'al.lel S, fet que ha estat atribuït tant a una afinitat més gran de l'enzim cap al seu substrat (Clarke, 1975) com a una síntesi incrementada d'ADH (Lewis i Gibson, 1972). A la vegada, l'enzim S és més termoestable que l'enzim F, (Gibson, 1970). Aquestes propietats varen donar una bona teoria per al manteniment del polimorfisme dels al.lels F i S en les poblacions naturals, ja que F presentaria una major eficàcia biològica en poblacions fredes i S en poblacions caloroses. Desgràciadament, no sempre s'han trobat relacions tan reveladores com les esmentades per a recolzar aquesta teoria seleccionista. Pipkin (1971 a 1977) va estudiar les poblacions des de Texas fins a Mèxic, analitzant també les freqüències de F i S i correlacionant-les amb les temperatures màximes i mínimes de cada indret durant un període de 10 anys, detectant només correlacions positives amb les temperatures mínimes però no amb les màximes, que hom creu responsables, en principi de la presència d'ADH-S en la població.

David (1975) descriu una clina equivalent a la d'Estats Units que comprendria Europa com a extrem nord -on la freqüència de l'al·lel F arriba a un 90%- i l'Àfrica Equatorial com a extrem sud -amb freqüències de F d'un 10%-. Malgrat això, d'altres diferències ambientals han d'estar afectant les freqüències gèniques d'aquests al·lels ja que, a igualtat de latitud, la presència d'ADH-F en les poblacions europees és el doble que en les americanes.

Un altre paràmetre ambiental que ha estat àmpliament considerat com a potencial regulador de les freqüències de F i S ha estat el contingut en alcohols de l'habitat natural de Drosophila. Ja s'ha esmentat que ADH-F té una activitat enzimàtica més elevada que ADH-S. Hom va suposar que la presència d'etanol en el medi podria seleccionar favorablement per l'al·lel F en les poblacions naturals. Morgan, van Delden i Amsley (1975) trobaren tots, de manera independent, que la freqüència d'Adh-F es podia augmentar artificialment en laboratori, sotmetent a les poblacions a dietes riques en etanol. Els últims resultats en aquest sentit d'Alahiotis (1982) confirmen que existeix una clara correlació entre les propietats bioquímiques de l'enzim corresponent a un determinat al·lel i les característiques ambientals de les poblacions on es troba, ja siguin naturals com de laboratori.

Malgrat el gran nombre d'estudis realitzats, no s'ha trobat una resposta que contesti globalment a la pregunta posada inicialment. S'ha de considerar que les classes S i F disten molt d'ésser homogènies i cada una d'elles inclou d'altres subclasses que presenten variabilitat per un altre concepte, variabilitat que a la vegada es pot veure afectada i controlada per d'altres paràmetres que no s'estan considerant. Només una consideració global de tots els punts del genoma que puguin afectar potencialment l'expressió d'Adh resoldria el problema del manteniment del polimorfisme en aquest locus de Drosophila.

Les últimes dades que han aparegut sobre les propietats diferencials dels al·lels F i S semblen demostrar que si bé la forma ADH-F té un nivell d'afinitat cap el substrat lleugerament superior al de la proteïna ADH-S, la gran diferència d'activitat enzimàtica observada entre els individus d'ambdós línies - i encara entre aquestes i UF i US- és deguda a una taxa diferencial de síntesi proteica a partir del gen, que es reflexa també en els nivells citoplasmàtics de l'ARN-ADH. Ja que, per mapatge de restricció s'observen diferències en les zones 3' i 5' adjacents a les seqüències transcrites del gen entre les soques Adh-S i Adh-F, sembla prendre cos l'existència de regions moduladores que s'havia hipotetitzat. (Anderson i Mc Donald, 1983).

1.3.2. ESTUDIS BIOQUÍMICO-ESTRUCTURALS.

1.3.2.1. ISOZIMS. DESCRIPCIÓ I ORIGEN.

Johnson i Denniston (1964) i Grell (1965) evidencien ja l'existència de diversos isozims separables per electroforesi en els homozigots pertanyents a qualsevol dels al·lels descrits. El model bàsic consisteix en tres bandes electroforètiques, la més catòdica de les quals posseeix invariablement la major activitat enzimàtica. Més tard aquest model s'ha vist que era universal per a qualsevol al·lel ADH de l'espècie Drosophila melanogaster o de les altres espècies de Drosophila.

Els intents d'explicació de l'origen dels diferents isozims (Ursprung i Carlin, 1968; Imbersky, 1968; Grell i col. 1968) varen posar de manifest que cada isozim contenia només producte provinent de l'expressió d'un sol gen únic - contràriament al que passa en l'home o el cavall. Així es van descartar les idees de diferents graus de polimerització d'un monòmer enzimàtic o d'unitats estructurals diverses entre sí. Les primeres evidències experimentals demostraren també que les bandes eren intercanviables per tractaments amb NAD^+ , fet que va conduir a la idea d'un model d'equilibri entre

molècules de l'enzim unides a diferent nombre de molècules de coenzim. Johnson (1968,1970) descriu que mitjançant tractaments tèrmics també es pot alterar el patró de bandes inicial, de manera que els isozims més catòdics (més actius) serien més inestables que els més anòdics. Postula l'autor que els canvis conformacionals provocats per la unió del coenzim causarien alteracions en els enllaços que estabilitzen la molècula. Jacobson (1972) presentà un fet important en comprovar que l'acetona induïa el mateix canvi de bandes que el NAD^+ . La unió del cofactor deixa doncs d'ésser la única raó per explicar els conformòmers, i a més a més, el complex NAD^+ -acetona mostra una major eficàcia transformacional. Els mateixos canvis s'observen si l'acetona és subministrada "in vivo".

A partir d'aquestes dades es va construir un model on el responsable dels canvis era un compost NAD^+ -carbonil (anàleg a NAD^+ -acetona) que en unir dues molècules a l'enzim ocasionaria la forma catòdica, en unir-ne una, la intermitja, i la forma anòdica no en portaria cap d'unida. Però Day (1974) ja assenylà que l'explicació completa a aquest fenomen no podia consistir en una interacció simple, ja que l'addició de molècules de NAD^+ difícilment dóna raó d'un canvi d'estabilitat de l'enzim; i un canvi conformacional no explica canvis tant bruscs de càrrega elèctrica com els observats.

La darrera llum sobre el problema l'han aportada Winberg i col (1983), amb dades que anul·len algunes de les hipòtesis que s'havien mantingut fins ara com a certes. En primer lloc, es comprova que el NAD^+ pur és totalment inactiu per a l'interconversió de bandes, ja que els resultats observats amb aquest coenzim són deguts a la contaminació de les preparacions comercials amb acetona. Els agents que resulten realment actius són els complexos NAD^+ -acetona o bé NAD^+ -butanona. Ni cetones cícliques ni aldehids complexats amb el NAD^+ són actius per a aquest propòsit, ni ho són les cetones per sí soles.

Un altre factor que podria contribuir a l'aparició dels isozims fóra la desaminació dels aminoàcids més làbils de la molècula, que explicaria algunes bandes intermitges que s'observen en determinades ocasions entre les tres de majoritàries -la desaminació d'un residu provoca un descens de 0.1 a 0.2 unitats en el punt isoelèctric-. Per estudis d'inhibició amb pirazol, Winberg assenyala que l'acetona interactua en el punt d'unió del substrat al complex binari enzim-NAD⁺. Una explicació del mecanisme d'interconversió de bandes exigiria doncs un coneixement exhaustiu del mecanisme de catàlisi enzimàtica. Ja que l'ADH de Drosophila no conté àtoms metàl·lics, el paper del Zn⁺⁺ en l'ADH de mamífers seria dut aquí a terme per un o diversos residus d'aminoàcids, que enllaçaria directament la cetona, qui, a la vegada, formaria un compost estable amb el NAD⁺. Les raons per les quals les cetones cícliques són inactius serien purament espaials.

1.3.2.2. PURIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE L'ENZIM.

Sofer i Ursprung (1968), Jacobson (1970) citen els primers mètodes de purificació de l'enzim ADH a Drosophila melanogaster, basats en la cromatografia de bescanvi iònic, en un intent de caracterització de la molècula en la seva forma activa. L'alt grau d'impureses i la inestabilitat d'aquestes preparacions va provocar que els resultats d'aquests treballs no donessin dades massa fiables. Malgrat tot, hom va establir algunes idees bàsiques, com són la certesa que la forma activa era un compost d'unitats estructurals que eren idèntiques entre sí. Fins 1975 (Schwartz i col.) i 1977 (Thatcher) hom no va comptar amb treballs d'una certa credibilitat a nivell de coneixement de l'estructura bioquímica de l'enzim. Hom va establir que l'enzim actiu era un dímer de 54.000d de pes molecular, format per dues subunitats idèntiques de 27.000d. La cadena proteica de cada monòmer consta de 254 residus, que varen ésser quantificats per anàlisi d'aminoàcids. Com a fet remarcable cal assenyalar el baix contingut en cisteïna (dues per subunitat) respecte la LADH de mamífer, l'ab-

sència de metionines i la presència d'un grup que bloqueja l'extrem amino-terminal.

La diferència entre l'ADH-F i l'ADH-S rau en un residu aminoacídic (posició 192: treonina en F i lisina en S). Aquesta diferència va ésser deduïda primerament per anàlisi dels mapes peptídics tríptics d'ambdues variants, ja que la substitució esmentada suposa l'aparició en S d'un nou pèptid per addició d'una diana tríptica en la molècula. (Fletcher i col. 1978). La seqüència completa d'aminoàcids per a diferents al·lels va ésser publicada en 1980 per Thatcher. Apart de confirmar la dada abans esmentada, es va veure que les diferències entre les altres formes d'ADH descrites a D. melanogaster consistien sempre en una sola substitució d'aminoàcid, si bé es varen detectar també algunes substitucions sense efecte en la càrrega de l'enzim. Heus aquí un petit esquema il·lustratiu:

posició 14	GLICINA (SLOW) -----	ASPÀRTIC (NULL-11)
posició 45	ALANINA (SLOW) -----	ASPÀRTIC (UFAST)
posició 192	LISINA (SLOW) -----	TREONINA (FAST)

Donades les diferències detectades en les activitats específiques de cada una d'aquestes variants, cal suposar que les substitucions afectin d'alguna manera l'afinitat de l'enzim envers el seu substrat o bé el coenzim. Chambers i col (1981 a i b), en analitzar l'estructura de la variant termosensible "Château Douglas", detecten també una sola substitució respecte ADH-F: posició 214 (prolina per serina).

Hom no ha aconseguit obtenir l'enzim en forma cristal·litzada i, per tant, no ha estat possible l'estudi de les estructures secundària ni terciària de l'enzim. A partir de l'estructura primària s'han construït models teòrics de les estructures d'ordre superior. La regió N-terminal dóna una zona d'alternança α - β que sembla concordar amb l'estructura descrita de tots els dominis d'unió del coenzim NAD^+

a les deshidrogenases (model de Rossmann), i que , en l'ADH de mamíferes localitza en la regió C-terminal dels monòmers. Malgrat aixó no s'ha pogut establir cap regió d'homologia clara entre l'ADH de Drosophila i la de llevat o fetge de mamífer i , per tant, es postula que no tenen origen filogenètic comú.

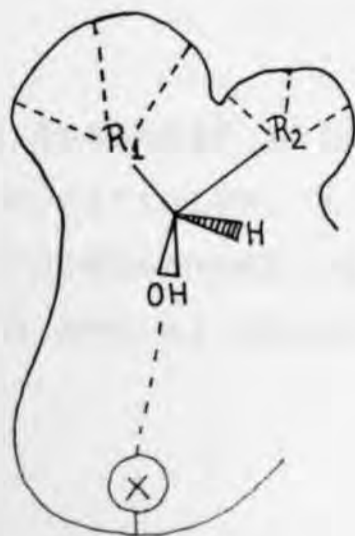
Els estudis estructurals de l'ADH de Drosophila han seguit dues línies principals de recerca. Per un costat hom ha intentat deduir algun indici sobre el mecanisme de catàlisi de l'enzim, combinant dades d'inhibició i afinitat envers diferents substrats per part de mutants de seqüència coneguda. Per altra banda, l'estudi en diferents espècies de Drosophila pot donar llum a l'evolució i grau de divergència d'aquest enzim dins el taxó, així com il·lustrar quina és la relació existent entre l'enzim i les característiques nutricionals de l'habitat de cada una d'aquestes espècies.

1.3.2.3. MECANISME DE CATÀLISI ENZIMÀTICA.

Des que hom va disposar de preparacions d'enzim amb un grau fiable de puresa, es varen desenvolupar estudis de cinètica de les reaccions d'oxidació catalitzades per l'ADH. Thatcher (1977) confirmà els resultats trobats amb extractes crus respecte la major afinitat de l'enzim envers alcohols secundaris, i calculà les constants de Michaelis (K_m) aparents i les velocitats màximes de reacció amb diferents alcohols com a substrat. L'afinitat sembla augmentar també amb la longitud de la cadena hidrocarbonada. En desconèixer-se l'estructura espacial de l'ADH , no se sap tampoc quins són i quina és l'estructura dels llocs catalítics. Winberg (1982, a i b) assenyala que la reacció ha de seguir un model de Theorell-Chance per a reaccions de segon ordre equivalent al de les ADH ja descrites en d'altres organismes. La dissociació del complex binari E-NADH seria l'etapa limitant en l'oxidació dels alcohols secundaris; mentre la del complex ternari E-NADH-Producte ho seria en l'oxidació dels primaris. (McKinley-McKee i col. 1983).

Com que s'admet que existeixen diferències entre les propietats catalítiques de l'enzim dels diversos al·lelomorfs i es coneix també les substitucions d'aminoàcids que els caracteritzen, l'autor postula que els esmentats residus (p.e. 192 entre Fast i Slow), estan directament implicats en el mecanisme de catàlisi. I ja que ADH-F i ADH-S mostren també comportament diferencial quant a l'unió del coenzim i d'anàlegs estructurals seus, sembla que l'aminoàcid 192 tindria un gran protagonisme en el locus d'enllaç del NAD^+ . La teoria concreta dels autors és que ADH-S, a causa de la seva càrrega positiva extra, lligaria més intensament el coenzim a la molècula proteica de l'enzim, fet que faria disminuir la taxa de dissociació del complex E-NADH. En ésser precisament aquesta la reacció limitant de tot el procés d'oxidació, aquest fet es traduiria en una velocitat màxima menor i una Km major, que caracteritzen ADH-S front ADH-F. Winberg repassa també l'activitat de l'ADH amb molts possibles i variats substrats. A part de confirmar les idees clàssiques en quant a afinitat de l'ADH, descriu una manca d'activitat enzimàtica envers els alcohols histidinol, pantotanol i retinol, cosa que fa descartar un possible paper fisiològic de l'ADH en el metabolisme de la histidina, el coenzim A, la vitamina A o el procés visual a Drosophila.

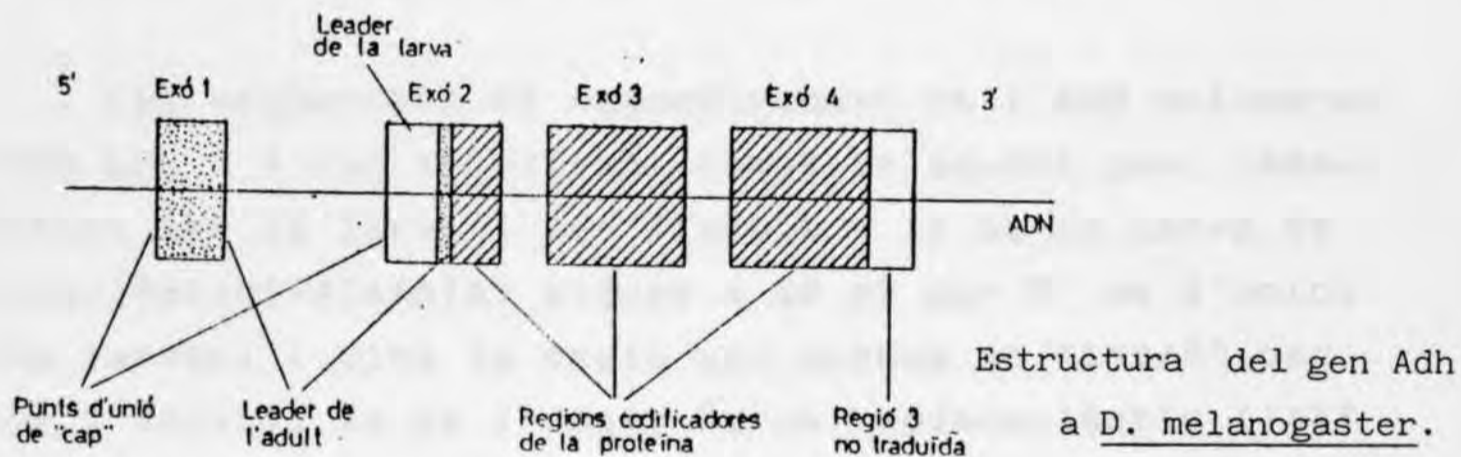
Res no se sap tampoc sobre el punt veritable d'unió del substrat al complex E- NAD^+ . El mateix Winberg assenyala que, donades les diferències d'afinitat envers distints enantiomorfs d'un mateix compost, la regió d'unió de l'alcohol seria un "sac" d'entorn hidrofòbic que enllaçaria per punts diferents els dos radicals alquil:



Les dimensions diferents dels dos subdominis (R_1 i R_2) explicaria les divergències de comportament entre enantiomorfs. La funció catalítica del punt (X), acompanyada en l'ADH de llevat i de mamífers pels àtoms de zinc, ha d'ésser atribuïda en aquest cas a algun residu d'aminoàcid.

1.3.2.4. CARACTERITZACIÓ DEL GEN Adh i ARN-ADH.

Des que Goldberg (1980) va aïllar i clonar el gen que codifica per l'ADH a Drosophila melanogaster han sorgit moltes dades mercès a les quals hom té avui en dia una visió bastant completa de l'estructura i funcionament del gen Adh dins el genoma de Drosophila :



Les seqüències codificadores es troben en forma de tres exons interromputs per dos introns de longitud molt semblant:

1 ^r exó	-----	96 nt	-----	32 AA	N-term. ↑ ↓ C-term.
1 ^r intró	-----	65 nt			
2 ⁿ exó	-----	405nt	-----	135 AA	
2 ⁿ intró	-----	70 nt	-----		
3 ^r exó	-----	264nt	-----	88 AA	

En els introns, s'han detectat totes les característiques típiques dels introns eucariotes, i que hom creu relacionades amb la funció de processament del transcrit primari a mARN: inici de l'intró amb el dinucleòtid GT i acabament amb AG.

L'anàlisi de les seqüències adjacents per 3' i 5' als exons, seqüències transcrites però no traduïdes, ha proporcionat noves dades bastant sorprenents (Benyajati, 1983). Mentre els 180 nt que segueixen el codó que codifica per l'aminoàcid C-terminal de l'enzim resten invariables en la larva i l'adult de Drosophila melanogaster (regió adjacent a l'extrem 5' del gen), això no es compleix en la regió adjacent per 3' al gen, que comprèn els nucleòtids des del punt de reconeixement de la polimerasa II i inici de síntesi de l'ARN fins el primer codó de la proteïna. Mentre en la larva, aquesta regió és una seqüència de 71 nt, directament adjacent a l'exó 1, en l'adult, la seqüència que a compleix aquesta funció (de 123 nt) es troba interrompuda per un "intró" de considerables dimensions (654 nt) que d'alguna manera ha d'ésser obviat per l'ARN-polimerasa II.

Les seqüències de reconeixement de l'ARN polimerasa (TATA box) s'han localitzat també en aquest gen, independentment per la larva i per l'adult: la de la larva és un octanuclèotid (TATAAATA) situat a 24 nt per 5' de l'inici de l'ARN larvari (dins la regió que suposa un "intró" per l'ARN de l'adult); la de l'adult és un heptanuclèotid (TATT TAA) situat a 25 nt per 5' de l'inici de l'ARN de l'adult. Ambdós són seguits per les regions riques en CG típiques.

Així doncs, el producte de transcripció del gen Adh no és una classe homogènia en la larva i l'adult, sinó que està compost per dues classes independents i no mútuament excloents, ja que el pas d'una a l'altra sembla ésser gradual. La mida mitjana de l'ARNm present en la cèl.lula és de 1100 a 1150 pb. No es coneix quina és la regulació de l'expressió de cada una de les modalitats en un determinat estadi del desenvolupament, ni com aquesta pot influir en la distribució histològica de l'enzim ADH.

Benyajati i col. (1982) varen descriure com alteracions en els introns -substitucions de bases o inser-

cions/deleccions- explicaven la deficiència d'activitat de diversos mutants ADH-null, bé per proteïna aberrant, bé per ARNm aberrant. A partir d'aquí es va deduir la importància d'aquestes regions en el correcte processament global del gen i la influència que una mutació en un intró pot tenir en l'expressió dels altres. Alteracions en les regions 3' i 5' adjacents al gen varen donar també idea de la seva importància en l'expressió gènica i la seva regulació, i encara seran necessaris posteriors estudis per a la identificació concreta de seqüències reguladores o modificadores.

L'accessibilitat al genoma de Drosophila a causa del desenvolupament de les tècniques de genètica molecular i enginyeria genètica, ha fet que els estudis d'evolució basats en l'estructura proteica deixessin pas a l'estudi directe de l'ADN que suporta aquest gen, i la variabilitat a nivell de substitució de nucleòtids. L'estudi de la seqüència de bases a la vegada que proporciona directament la seqüència d'aminoàcids de la proteïna codificada, permet la comparació de totes les regions no traduïdes o no transcrites, que poden ésser també d'importància màxima dins el funcionament gènic. Fins ara, aquests estudis s'han realitzat principalment entre diferents soques i al·lelomorfs d'una mateixa espècie: Drosophila melanogaster (Kreitman, 1983). Aquest autor descriu que el polimorfisme a nivell de substitucions de nucleòtids és molt més elevat en un gen que el que es podria induir a partir de les substitucions d'aminoàcids en les proteïnes corresponents. Així doncs, aquest polimorfisme es centra en els punts silenciosos dels exons (tercers nucleòtids dels codons) o bé en els introns i seqüències adjacents, si bé amb distribucions no uniformes: hi ha zones com la 3' adjacent no traduïda i la no transcrita que presenten un percentatge de polimorfisme més baix que els mateixos exons: cal atribuir aquest fet a un paper diferencial de la selecció natural, que ha conservat molt aquestes seqüències, potencialment per la importància que deuen tenir en el processament del gen.

Zwiebel i col. (1982) analitza el grau d'homologia que hi ha entre la regió del genoma que comprén el gen Adh en diferents espècies de Drosophila, en un intent de comprovar si la filogènia construïda a nivell de divergència de seqüències genòmiques és un reflex de la filogènia clàssica basada en criteris morfològics, i, encara, de la filogènia basada en la comparació de proteïnes. Els seus resultats són afirmatius, indicant que, per una banda, la divergència morfològica, o fenotípica en general, és un bon reflex de la divergència genotípica, i per una altra banda, que el gen Adh és un bon representant de la divergència del genoma sencer, ja que mitjançant la comparació única d'aquesta seqüència hom obté esquemes equivalents als de comparació global del genoma.

1.3.2.5. REGULACIÓ ONTOGÈNICA I HISTOLÒGICA.

La regulació a què està sotmesa l'expressió del gen Adh es tradueix en diferents nivells d'activitat enzimàtica durant els estadis de desenvolupament de l'individu - regulació ontogènica - i també en els seus diferents teixits - regulació histològica -.

La regulació durant el desenvolupament va ésser determinada per Ursprung i col. (1968). L'activitat presenta un increment constant a partir de l'eclosió de l'embrió fins el moment de formació de la pupa, amb un primer màxim en la larva de tercer estadi. Durant el període en què la mosca resta com a pupa, l'activitat decreix a un nivell basal, que torna a incrementar-se a partir del neixament de l'adult.

-Dades pertanyents a l'espècie D. melanogaster. - En l'adult, segons Dunn (1969), l'activitat atany un segon màxim després de quatre dies de l'emergència, superior al de la larva, que es manté aproximadament fins el dotzè dia de vida adulta, moment a partir del qual comença una constant davallada. Perfil anàleg per a l'activitat enzimàtica durant el cicle vital han estat descrit per a d'altres espècies (Imbersky 1972, Mc Donald i Avise 1976)

Ursprung (1970) va descriure tant per tinció histoquímica com per lectura directa d'activitat enzimàtica, la distribució en els diferents teixits de l'individu:

larva: fat body, intestí, túbuls de Malpighi.

adult: fat body, intestí, túbuls de Malpighi i genitals masculins.

Els majors nivells d'activitat ADH es concentren en les cèl·lules del "fat body", variant d'acord amb la taxa de síntesi proteica global d'aquest òrgan. Hom pot deduir també que les diferències en els estadis de desenvolupament d'activitat ADH són en realitat ocasionades per la importància i estat dels teixits on s'expressa aquest gen, més que per una repressió o estímul de síntesi en un mateix teixit. De fet David ja havia assenyalt que no calia buscar cap significació de funcionalitat biològica de l'enzim a partir del seu esquema en el desenvolupament, ja que aquest és paral·lel a molts dels altres enzims de Drosophila, i a la vegada no reflexa més que les variacions en el metabolisme general de l'individu durant el cicle vital.

Ja s'ha parlat de l'existència de promotors específics i diferenciats per a controlar l'expressió del mateix gen Adh en larva o adult. No es coneix com es controla l'ús d'un o altre promotor.

Per experiments de microinjecció del gen en embrions de soques defectives (Adh-null), s'han obtingut nivells de proteïna ADH i d'activitat enzimàtica equivalents als de les soques salvatges, amb el mateix patró de desenvolupament i distribució histològica. Els punts d'inserció del fragment injectat en el cromosoma no sembla haver de presentar cap característica específica, ni sembla existir preferència cap a cap dels quatre cromosomes de Drosophila. Tot indica doncs que les seqüències adjacents al gen, també injectades, contenen tota la informació necessària per al control de l'expressió gènica, i que el conjunt és funcional independentment de l'entorn cromosòmic on es trobi situat. (Goldberg i Maniatis, 1983)



1.3.2.6. COMPARACIÓ DE L'ENZIM ADH DINS EL GÈNERE DROSOPHILA.

Juan i Gonzàlez (1980) introduïren una nova metodologia en el procés de purificació de l'enzim ADH -la cromatografia de bescanvi iònic- que permetè l'obtenció de l'enzim amb un alt grau de puresa, i una estabilitat netament superior a les descrites fins el moment (Thatcher 1977). Aquesta metodologia va facilitar la purificació de l'enzim de diverses espècies de Drosophila i la caracterització de diferents paràmetres bioquímics, per tal d'establir una correlació entre aquests i les respostes adaptatives de cada espècie front ambients rics en alcohol. (Vilageliu i col. 1982) L'enzim de totes les espècies té una estructura molecular idèntica a la de D. melanogaster (dímer actiu de pes molecular 54.000 format per dos monòmers idèntics de 27.000d) i els seus punts isoelèctrics estan tots compresos entre 7.00 i 10.00. Els monòmers presenten un esquelet d'aminoàcids equivalent, amb el mateix nombre de residus cisteïna i triptòfan.

Les diferències d'estructura primària no sempre expliquen les notables diferències que s'observen en els nivells d'activitat enzimàtica de cada espècie, fet que ha fet suposar que d'altres factors entren en joc, com poden ésser els nivells d'enzim sintetitzat en cada cas. Aquesta dada concordaria perfectament amb la hipòtesi d' Anderson i Mc Donald (1983) per explicar les diferències d'activitat entre els individus ADH-S i ADH-F de D. melanogaster mitjançant nivells diferencials d'enzim en l'individu.

Totes les espècies estudiades per Vilageliu i col presentaren un enzim ADH amb idèntica activitat específica, llevat el de D. funebris, que representava el doble.

Per més detalls sobre la comparació de totes les espècies, es remet al capítol de la discussió.

1.3.3. ESTUDIS BIOQUÍMICO-FUNCIONALS.

1.3.3.1. TOLERÀNCIA A L'ETANOL.PAPER DETOXIFICANT DE L'ADH.

A partir de les dades d'activitat ADH en poblacions de D.melanogaster capturades en ambients rics en alcohol, es va postular que aquest enzim era essencial per a la seva tolerància.(Grell,1968; Gibson, 1970; Briscoe, 1975). Hom va comprovar que, realment, la diferència entre dues espècies que mostraven característiques extremes de tolerància o no tolerància d'etanol -com D.melanogaster i D.simulans- provenia dels nivells d'activitat ADH propis de cada una. (David,1974). Aquesta tolerància diferencial permet una partició quasi excloent dels nínxols ecològics entre ambdues espècies: D.melanogaster explota els ambients rics en etanol (cellers, bodegues) mentre D. simulans resta a camp obert. (McKenzie i Parsons, 1972). Posteriorment, s'ha comprovat que totes les espècies que d'una manera persistent o eventual són capturades en punts relacionats amb processos d'elaboració vitícola presenten activitat ADH considerable. Un cas extrem seria el de l'espècie D.lebanonensis, descrita en els cellers de la Manxa, (David i col. 1979), que té una tolerància a l'etanol i una activitat ADH encara superiors a les de D.melanogaster. El fet que els mutants ADH-null no tolerin sinó concentracions mínimes d' alcohols, confirma que l'ADH ha estat l'instrument que ha permès a diverses espècies l'explotació de nous hàbitats rics en etanol. Ja s'ha indicat també que són els nivells d'enzim presents en l'individu els que expliquen la major activitat ADH d'unes espècies respecte d'altres i podrien explicar també la d'una variant o soca respecte una altra dins la mateixa espècie. Així doncs, en última instància seien els gens o seqüències reguladors de l'expressió del gen Adh els responsables directes de la tolerància exhibida per cada espècie.

Malgrat aquestes primeres dades tan prometedores, no sempre hi ha una clara correlació entre activitat ADH en

El fet d'haver localitzat les espècies amb més activitat ADH en ambients rics en etanol, va fer pensar que la metabolització dels alcohols seria aquesta funció bàsica en l'organisme. Però aquesta funció no es correspon amb les especificitats preferencials de l'enzim, determinades primer a partir d'extractes crus de Drosophila i confirmades més tard amb enzim pur (David 1976). D'entrada, cal assenyalar que l'afinitat de l'enzim front els alcohols primaris - a igual nombre de carbonis- és molt més baixa que front els secundaris, mentre que la toxicitat d'aquests darrers és molt més elevada. Per què l'enzim és més actiu front un producte més tòxic? Endemés, l'enzim és inactiu totalment amb metanol com a substrat i, en canvi, Drosophila tolera nivells basals d'aquest alcohol, comparables amb els que tolera d'alcohols primaris de cinc o més àtoms de C en la molècula. L'etanol és, amb gran diferència, l'alcohol menys tòxic -o sigui, el més tolerat-i un envers els quals l'ADH té menys afinitat. L'aparent paradoxa a la qual s'arriba és que hi ha una relació inversa entre afinitat de l'enzim cap a un alcohol i la tolerància de Drosophila envers ell.

Juan (1980) va assenyalar el pH òptim d'acció de l'ADH-S de D.melanogaster a 8.0 i 9.5. Thatcher (1977) havia calculat la Km pel coenzim en 0.33mM. Ambdues condicions disten molt de reflexar les possibles condicions fisiològiques de l'entorn on es trobi l'enzim, quina significació pot tenir això?

El substrat envers el qual l'ADH mostra més afinitat és l'isopropanol. L'isopropanol és un alcohol secundari, l'oxidació del qual allibera acetona, compost que no es metabolitza i és altament tòxic per a l'organisme. El mateix succeix de fet amb la resta d'alcohols secundaris. Ens trobem doncs que l'enzim és especialment actiu amb substrats que donen productes tòxics (David i col. 1978), productes que a la vegada causen interconversió d'isozims -veure apartat 1.3.2.1.-, de la forma més activa a la menys activa. Aquesta pèrdua de capacitat metabòlica per interconversió

d'isozims va ésser descrita tant subministrant isopropanol com directament acetona a les mosques (Papel i col. 1979). L'activitat oxidativa de l'enzim es troba realment inhibida en l'organisme després del tractament amb isopropanol o acetona i es pot recuperar quan se suprimeix aquest compost de la dieta de la mosca. La recuperació implica una altra vegada la interconversió d'isozims corresponent. Aquest fenomen s'ha detectat en tots els al.loenzims de D.melanogaster i en d'altres espècies de Drosophila, com D.funnebris i D. immigrans (Vilageliu, 1981); i ha estat interpretat com un possible mecanisme de defensa que inhibeixi la producció de cetones, encara que pot consistir simplement en una conseqüència del mecanisme cinètic de l'enzim en l'oxidació dels alcohols secundaris.

Estudis més acurats de l'afinitat de l'enzim vers una gran quantitat d'alcohols, potencial substrats "in vivo" de l'ADH ha revelar els següents punts interessants:

- no és probable que l'enzim tingui un paper important ni en els processos visuals ni en el metabolisme de la histidina ni del coenzimA, ja que inactiu en front el retinol, l'histidinol i el panthotenol.
- l'enzim és lleugerament actiu amb farnesol, compost relacionat amb el metabolisme del colesterol i les hormones juvenils. Malgrat això s'ha de descartar un paper preponderant de l'ADH en aquests camps, ja que l'ODH (octanol deshidrogenasa) és molt més activa amb compostos de més de 8 carbonis en la molècula. Tampoc sembla adequat suposar que un enzim, els mutants null del qual mostren un correcte cicle biològic, pugui representar un graó vital en el desenvolupament o el metabolisme lipídic.
- l'enzim és especialment actiu front compostos aromàtics d'estructura molt semblant a la d'algunes de les feromones conegudes, fet que podria indicar alguna funció en el metabolisme de les catecolamines o processat de feromones. (Winberg, 1982)

L'activitat que, de totes maneres, es detecta en front de l'etanol pot respondre a dues finalitats diferents : la seva assimilació com a nutrient, o la seva eliminació com a tòxic potencial.

L'etanol, en absència de qualsevol altre aliment, i en concentracions no letals, allarga les esperances de vida dels individus, tant subministrat per via oral com respiratòria (VanHerrewege, 1974,1978), la qual cosa indueix a pensar que els productes d'oxidació de l'etanol poden entrar directament al metabolisme intermediari via AcetilCoA. Recentment s'ha comprovat, com a confirmació d'aquesta hipòtesi, que l'acetaldehid subministrat per via oral a concentracions no letals, té el mateix efecte. (David, 1982).

L'etanol, a altes concentracions, causa la intoxicació i mort dels individus. Només algunes espècies amb una elevada presència d'enzim ADH poden sobreviure a concentracions d'etanol superiors a 5-10%, cas on l'ADH tindria com a paper preponderant la detoxificació alcohòlica (equivalent a la funció de l'ADH hepàtica de mamífer). De fet, la concentració d'alcohol o acetaldehid esdevé perjudicial quan l'enzim responsable de la seva oxidació resti saturat i per tant s'acumulin aquells compostos en l'organisme. Determinades espècies mostren una tolerància més elevada que les màximes concentracions d'alcohol trobades en la natura (D.lebanonensis amb LC₅₀ d'un 28%, front 15% de contingut alcohòlic màxim en fruits fermentats). És difícil de trobar una explicació a aquesta "activitat supèrflua " de l'enzim. Totes les dades semblen indicar però que la funció detoxificant ha estat una adquisició evolutiva relativament recent d'un enzim ja preexistent que, en augmentar la seva preseència en l'individu, ha permès l'explotació d'habitats encara verges (David,1983). Aquesta adquisició sembla constituir un exemple clar de convergència adaptativa, ja que les espècies on s'ha detectat no guarden cap tipus de relació filogenètica especial.

En el procés de conversió d'una simple capacitat metabolitzadora d'alcohols -a relativament baixes concentracions- a un mecanisme de detoxificació que permeti la colonització de nous nínxols ecològics sembla que han jugat un paper molt important els paràmetres cinètics que caracteritzen l'enzim de cada espècie (K_m i V_{max}), a més a més de la quantitat global present en l'organisme. La constant de Michaelis seria relativament determinant quan les concentracions de substrats hi fossin equivalents o més baixes (condicions d'aprofitament energètic de l'etanol). En canvi, quan les concentracions de substrat depassessin en molt la K_m , el paràtre determinant fóra la velocitat màxima de reacció. Així doncs, totes les espècies de Drosophila seran capaces de metabolitzar quantitats d'etanol del mateix ordre de la K_m de la seva ADH; però només aquelles amb velocitat màxima de l'enzim adequada podran tolerar quantitats d'alcohol superiors. Es posa així ben de manifest la independència bioquímica de dos conceptes que en principi varen aparèixer molt confosos, com són l'aprofitament metabòlic i la detoxificació dels alcohols en general i de l'etanol en particular. Aquesta independència es podria situar també a nivell genètic, ja que mentre el primer punt vindria només determinat per les característiques intrínseques de la molècula enzimàtica, i per tant, per la seqüència codificadora del gen, la segona pot dependre també de factors que regulin o modulin l'expressió d'aquest gen i proporcionin una quantitat superior de producte gènic a l'individu. (David, 1979).

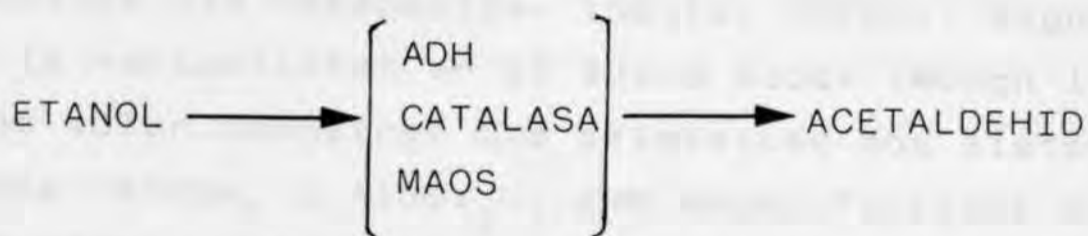
El paper detoxificant de l'ADH es pot estendre també a d'altres alcohols apart de l'etanol. En els fruits en descomposició, s'han detectat nivells apreciables d'isopropanol, n-propanol i n-butanol endemés de l'etanol (McKechnie 1982), de manera que tots aquests compostos poden ésser metabolitzats "in vivo" per l'ADH.

Per concloure aquest apartat, cal esmentar la possible funcionalitat de l'activitat inversa de l'enzim, o sia, el procés de reducció de les cetones i aldehids als

alcohols corresponets. Contràriament a les observacions fetes amb l'ADH de mamífer, on l'activitat en condicions fisiològiques està netament desplaçada cap el sentit reductor, l'ADH de Drosophila presenta uns nivells insignificants d'activitat inversa. En la bibliografia es troba alguna cita d'exemples de funcionalitat inversa de l'ADH, quan es subministra acetaldehid o acetona en les dietes (David, 1978,1982), però aquest punt serà precisament objecte d'especial atenció en aquesta tesi.

1.3.3.3. METABOLISME DE L'ETANOL A DROSOPHILA.

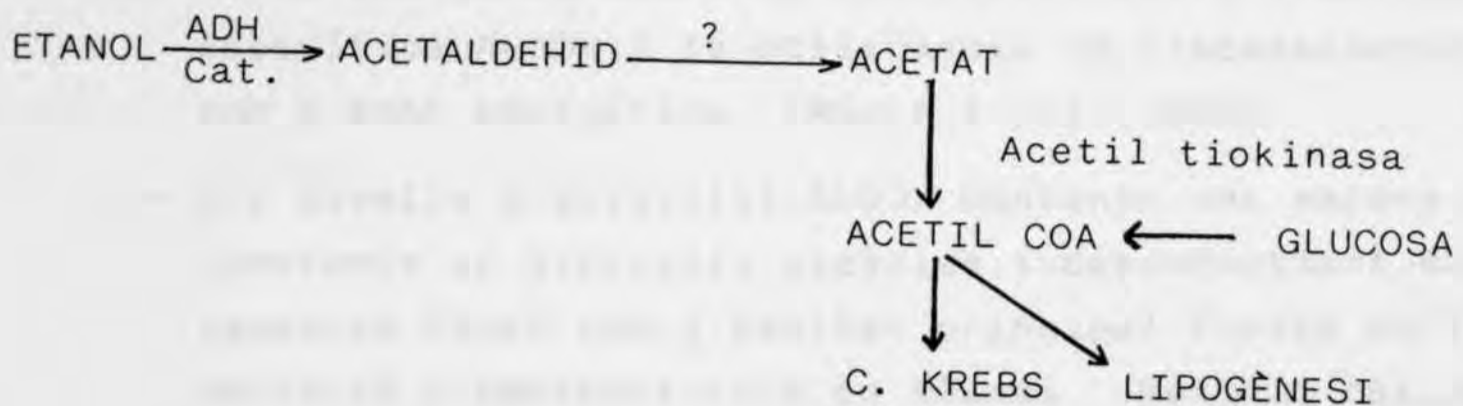
Si bé resta universalment assumit que l'enzim ADH suposa el primer pas metabòlic per a l'assimilació de l'etanol al metabolisme intermediari, encara avui en dia hi ha greus controvèrsies al voltant dels altres enzims que completarien aquesta via. Per paral·lelisme als mecanismes descrits en els mamífers -veure apartat 1.2. -, hom pot suposar que , a més a més de la reacció majoritària catalitzada per l'ADH, l'etanol pot ésser degradat per sistemes minoritaris, com el de la catalasa o el d'oxidació mitocondrial d'alcohols:



Hom va demostrar que existeix una activitat catalàsica molt activa a Drosophila, però no es va poder detectar l'existència d'un sistema equivalent al MAOS. (Deltombe-Lietaert i col. ,1979). Hom ha atribuït a l'activitat catalàsica els nivells bàsics de metabolització d'alcohols que s'observen en soques null per ADH, o en diferents casos on l'activitat d'aquest enzim es troba molt deprimida.

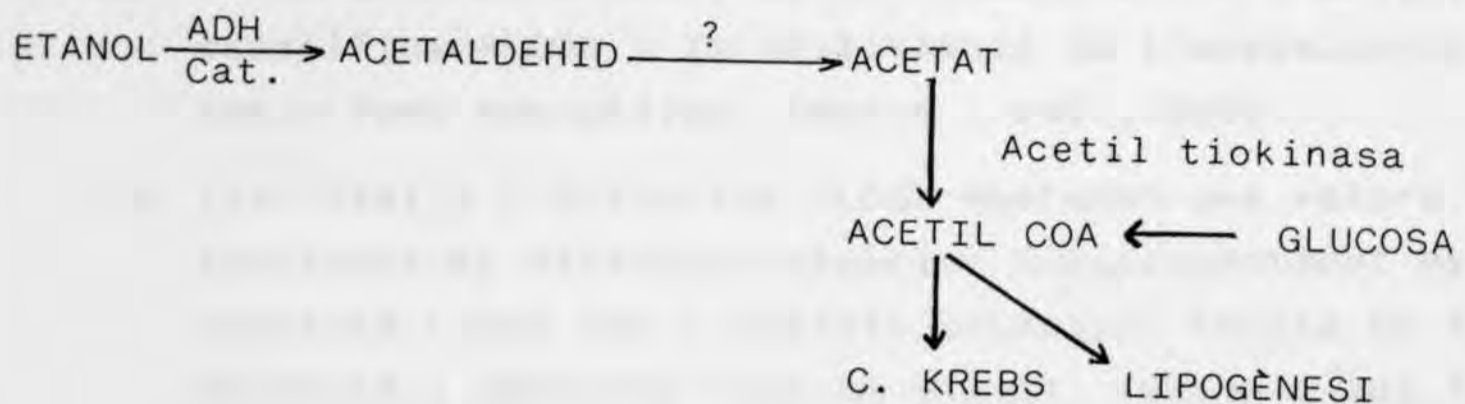


La incògnita més greu rau, malgrat tot, en la identificació del sistema enzimàtic responsable de l'oxidació de l'acetaldehid produït a partir de l'etanol a acetat, compost que és directament assimilable en forma de complex activat AcetilCoA.



El primer candidat que va ésser considerat idoni per a l'oxidació de l'aldehid és l'aldehid oxidasa de Drosophila (Day, 1974; Clarke, 1975). L'aldehid oxidasa (E.C. 1.2.3.1.) és una flavoproteïna amb àtoms metàl·lics coordinats, controlada per molts loci independents, i que catalitza l'oxidació d'aldehids sense el concurs de cap coenzim. Aquesta hipòtesi va començar a ésser desestimada en comprovar que mutants deficients per a aquesta activitat (AO-null) no mostraven cap tipus d'increment en la sensibilitat cap a l'etanol respecte a les soques salvatges, fet que evidentment es contradiu amb un paper important d'aquest enzim en l'esmentada via metabòlica. (David, 1978). Alguns estudis sobre la variabilitat en el locus Aldox (Moxon i col. 1982) semblen voler demostrar que existeixen dos sistemes independents -Aldox₁ i Aldox₂-, amb especificitats selectives. Mentre Aldox₁, el sistema majoritari, tindria funcions fisiològiques encara no ben determinades, Aldox₂, un sistema d'activitat molt més feble, que conserva la seva activitat en soques AO-null, podria ésser l'encarregat de la degradació de l'acetaldehid cel·lular. Malgrat tot, les últimes evidències suggereixen unànimement que aquest enzim no té cap mena de relació amb el metabolisme alcohòlic. Heus aquí els punts de contradicció més flagrants:

La incògnita més greu rau, malgrat tot, en la identificació del sistema enzimàtic responsable de l'oxidació de l'acetaldehid produït a partir de l'etanol a acetat, compost que és directament assimilable en forma de complex activat AcetilCoA.



El primer candidat que va ésser considerat idoni per a l'oxidació de l'aldehid és l'aldehid oxidasa de Drosophila (Day, 1974; Clarke, 1975). L'aldehid oxidasa (E.C. 1.2.3.1.) és una flavoproteïna amb àtoms metàl·lics coordinats, controlada per molts loci independents, i que catalitza l'oxidació d'aldehids sense el concurs de cap coenzim. Aquesta hipòtesi va començar a ésser desestimada en comprovar que mutants deficients per a aquesta activitat (AO-null) no mostraven cap tipus d'increment en la sensibilitat cap a l'etanol respecte a les soques salvatges, fet que evidentment es contradiu amb un paper important d'aquest enzim en l'esmentada via metabòlica. (David, 1978). Alguns estudis sobre la variabilitat en el locus Aldox (Moxon i col. 1982) semblen voler demostrar que existeixen dos sistemes independents -Aldox₁ i Aldox₂-, amb especificitats selectives. Mentre Aldox₁, el sistema majoritari, tindria funcions fisiològiques encara no ben determinades, Aldox₂, un sistema d'activitat molt més feble, que conserva la seva activitat en soques AO-null, podria ésser l'encarregat de la degradació de l'acetaldehid cel·lular. Malgrat tot, les últimes evidències suggereixen unànimement que aquest enzim no té cap mena de relació amb el metabolisme alcohòlic. Heus aquí els punts de contradicció més flagrants:

- 1- L'acetaldehid, en concentracions no letals, incrementa la vida dels adults en absència de qualsevol altra font d'energia. No s'observa cap mena de relació entre la seva utilització per soques ADH-null, AO-null, ADH-AO-null i salvatges. (David, 1982).
- 2- Hi ha una manca clara de correlació entre l'activitat específica ALDOX i la utilització de l'acetaldehid com a font energètica. (Moxon i col., 1982)
- 3- Els nivells d'activitat ALDOX mantenen uns valors molt constants en diferents espècies, independentment de si aquestes tenen com a hàbitat principal fruits en fermentació o ambients rics en etanol. (Moxon i col. 1982)
- 4- Per estudis histoquímics de tinció específica d'activitat ADH i ALDOX, s'observa que hi ha diferents casos de teixits que en mostren una i no l'altra. (Dickinson, 1970; Goldberg i Maniatis, 1983).
- 5- Una comparació dels perfils d'activitat enzimàtica durant el desenvolupament de l'ADH i l'AO mostra que en els estadis on l'activitat ADH és mínima (pupa), l'activitat AO és màxima.

L'activitat AO sembla directament implicada en processos vitals com poden ésser el metabolisme hormonal regulador del desenvolupament i l'ècdisi -deduïble del patró de desenvolupament- o bé l'assimilació de compostos heterocíclics típics dels vegetals on moltes espècies es nodreixen -deduïble a partir de l'afinitat elevada de l'enzim per substàncies pterídiques o pirimidíniques com a substrat. (Kranitsky, 1978).

L'acetaldehid és un compost extramadament tòxic, que no s'acumula ni en la cèl.lula ni en els espais intercel.lulars. En els mamífers, l'enzim acetaldehid-deshidrogenasa és el responsable de l'oxidació d'aquest compost. Lietaert i col. (1982) varen intentar la detecció d'aquest sistema enzimàtic a Drosophila, però no varen observar cap rastre d'activitat ni per detecció espectrofotomètrica ni electroforètica, malgrat que el disulfiram, potent inhibi-

dor de l'ACDH-DH inhibia també la desaparició de l'acetaldehid en un sistema d'estudi "in vitro".

Una altra possible explicació a la metabolització de l'acetaldehid ha sorgit en considerar que la mateixa ADH podria oxidar tant alcohols com aldehyds. El sistema ADH aplicat sobre una molècula d'etanol i amb el concurs de dos molècules de coenzim NAD^+ , proporcionaria directament la molècula d'acetat. (Heinstra, 1983).



Anteriorment, d'altres autors havien intentat detectar activitat enzimàtica de l'ADH amb aldehyds com a substrat, sense resultats positius. Això hauria estat a causa que no és l'isozim majoritari -el de migració més catòdica- aquell que mostra activitat aldehyd-deshidrogenàsica, sinò la forma intermitja. Les característiques cinètiques d'aquesta reacció resten per determinar. El resultat obtingut amb D.melanogaster no es repeteix amb D.simulans, on l'ADH es mostra pràcticament inactiva front l'acetaldehid. Aquest fet és assenyalat per l'autor com a possible responsable de la diferència de tolerància a l'etanol de les dues espècies, més que una activitat ADH diferencial sobre l'etanol.

Per acabar, tot just ressenyar les últimes dades aparegudes recentment: Garcin i col. (1983) refusen tots els resultats explicats anteriorment en detectar activitat ACDH-DH en homogenats crus de Drosophila melanogaster sota unes condicions diferent de les intentades per Lietaert anteriorment. Si aquestes dades es confirmen, potser haurà quedat closa l'antiga polèmica sobre la metabolització de l'acetaldehid a Drosophila.

Un punt directament relacionat amb el metabolisme alcohòlic, és la dinàmica del NAD^+ / $NADH$ cel.lulars, com a coenzims de l'ADH. No hi ha dades concretes sobre les seves concentracions intracel.lulars, però en tot cas, serien lluny dels nivells de saturació de l'enzim. Hom ha descrit com, en els mamífers, les concentracions de NAD^+ cauen dràsticament després de la ingesta d'etanol i és lògic pensar que un fenomen paral.lel tingui lloc a Drosophila. Els mecanismes de regeneració del coenzim en forma oxidada esdevenen vitals per assegurar el continu funcionament de l'ADH. Els que es troben descrits per mamífers difereixen considerablement dels candidats a Drosophila: mentre la regeneració anaeròbica piruvat---lactat és majoritària en els organismes superiors, en els insectes cal atribuir la mateixa funció a l'equilibri alfa-glicero-fosfat --- dihidroxi-acetona-f(Sacktor, 1962), o malat --- aspartat (Caverner i Clegg 1981).

1.4. OBJECTIUS DEL PRESENT TREBALL.

Els objectius principals dels treballs que aquí es descriuran queden emmarcats dins de dues grans problemàtiques. Primerament, l'estudi estructural i funcional de l'enzim dins del gènere Drosophila, en un intent de determinació de l'esquema evolutiu dins del taxó, i les influències que sobre aquest esquema hagin pogut exercir diversos paràmetres ecològics. En segon lloc, un intent de clarificació de les reaccions de resposta de Drosophila sota unes condicions de "stress" d'alcohol, i el paper que l'ADH hi juga.

Per diverses raons que s'esmentaran en el seu moment, l'espècie amb la qual s'han realitzat els estudis és Drosophila hydei, representant cosmopolita del grup Repleta.

Els punts concrets d'aquest treball poden resumir-se en:

- (a) Visió general de les propietats de l'enzim ADH nadiu a diferents espècies de Drosophila.
- (b) Estudi estructural de l'enzim ADH de D.hydei. Comparació amb les dades de les espècies que ja havien estat estudiades en el Departament.
- (c) Estudi comparatiu dels mètodes més actuals d'aïllament i purificació de pèptids triptics.
- (d) Estudi del metabolisme dels alcohols i els seus productes d'oxidació en individus sotmesos a dietes riques en etanol i isopropanol.
- (e) Estudi dels enzims que intervenen en les reaccions enzimàtiques del catabolisme alcohòlic.

2. MATERIAL I MÈTODES.

2.1. MATERIAL

2.1.1. SOQUES UTILITZADES.

2.1.2. PRODUCTES QUÍMICS.

2.1.3. APARELLS.

2.2. MÈTODES

2.2.1. MÈTODES DE CULTIU DE BRUCELLA

2.2.1.1. CULTIU EN FLASCONS.

2.2.1.2. CULTIU A GRAN ESCALA.

2.2.2. RECOLLEDA I SEMBRA D'OVUS.

2.2.3. DETERMINACIÓ DE DOSI LATAL 90.

2.2.4. LECTURES ESPECTROFOTOMÈTRIQUES.

2.2.5. DETERMINACIÓ DEL COEFICIENT D'ABSORPCIÓ MOLAR.

2.2.6. DETERMINACIÓ DE LA QUANTITAT DE PROTEÏNA EN SOLUCIÓ.

2.2.7. ELECTROFORESI EN NIDÓ.

-2- MATERIAL I MÈTODES.

2.2.8. ELECTROFORESI EN POLIACRILAMIDA/SDS.

2.2.9. ELECTROENFOCAMENT.

2.2.10. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.

2.2.10.1. FILTRACIÓ EN GEL.

2.2.10.2. SEPARACIÓ IONIC.

2.2.10.3. AFINITAT BIOLÒGICA.

2.2.11. DIALISI.

2.2.12. PREPARACIÓ DE LA MOSTRA PER A ANÀLISI D'AMINOÀCIDS.

2.2.12.1. HIDRÒLISI ÀCID.

2.2.12.2. OXIDACIÓ DE LA PROTEÏNA.

2.2.12.3. DETERMINACIÓ DE TRYPTOPAN.

2.2.12.4. ANÀLISI QUANTITATIVA D'AMINOÀCIDS.

2.2.13. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT α-GAMANOL.

2.2.14. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT α-GLUCONOL.

2.2.15. CARBOXIMETILACIÓ DE LA PROTEÏNA.

2.2.16. HIDRÒLISI TRÍPTICA DE LA PROTEÏNA.

2. MATERIAL I MÈTODES.

2.1. MATERIAL

2.1.1. SOQUES UTILITZADES.

2.1.2. PRODUCTES QUÍMICS.

2.1.3. APARELLS.

2.2. MÈTODES

2.2.1. MÈTODES DE CULTIU DE DROSOPHILA

2.2.1.1. CULTIU EN FLASCONS.

2.2.1.2. CULTIU A GRAN ESCALA.

2.2.2. RECOLLIDA I SEMBRA D'OUS.

2.2.3. DETERMINACIÓ DE DOSI LETAL 50.

2.2.4. LECTURES ESPECTREFOTOMÈTRIQUES.

2.2.5. DETERMINACIÓ DEL COEFICIENT D'ABSORCIÓ MOLAR.

2.2.6. DETERMINACIÓ DE LA QUANTITAT DE PROTEÏNA EN SOLUCIÓ.

2.2.7. ELECTROFORESI EN MIDÓ.

2.2.8. ELECTROFORESI EN POLIACRIALAMIDA/SDS.

2.2.9. ELECTROENFOCAMENT.

2.2.10. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.

2.2.10.1. FILTRACIÓ EN GEL.

2.2.10.2. BESCANVI IÒNIC.

2.2.10.3. AFINITAT BIOLÒGICA.

2.2.11. DIÀLISI.

2.2.12. PREPARACIÓ DE LA MOSTRA PER A ANÀLISI D'AMINO-ÀCIDS.

2.2.12.1. HIDRÒLISI ÀCIDA.

2.2.12.2. OXIDACIÓ DE LA PROTEÏNA.

2.2.12.3. DETERMINACIÓ DE TRIPTÒFAN.

2.2.12.4. ANÀLISI QUANTITATIVA D'AMINOÀCIDS.

2.2.13. DETERMINACIÓ DE L'EXTREM C-TERMINAL.

2.2.14. DETERMINACIÓ DE L'EXTREM N-TERMINAL.

2.2.15. CARBOXIMETILACIÓ DE LA PROTEÏNA.

2.2.16. HIDRÒLISI TRÍPTICA DE LA PROTEÏNA.

2.1. 2.2.17. DIGESTIÓ AMB BROMUR DE CIANÒGEN.

2.2.18. CROMATOGRAFIA EN PAPER.

2.1. 2.2.19. ELECTROFORESI D'ALT VOLTATGE.

2.2.20. SISTEMES DE DETECCIÓ DE PÈPTIDS.

2.2.21. MAPES ANALÍTICS I PREPARATIUS.

2.2.22. ELUCIÓ DE PÈPTIDS.

2.2.23. HPLC: CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ DE PÈPTIDS.

2.2.24. CROMATOGRAFIA DE GASOS. HEAD SPACE.

En aquest apartat s'ha descrit el mètode de captura de la mostra i el mètode de l'elució de la mostra. El mètode de captura de la mostra és el mètode de captura de la mostra i el mètode de l'elució de la mostra. El mètode de captura de la mostra és el mètode de captura de la mostra i el mètode de l'elució de la mostra.

-obtenir una bona representació del grup de D. melanogaster que s'estudia en una de les espècies que presenta activitat alcoholdehidrogenàsica més alta. Per estudiar les espècies properes s'espera deduir si la semblança de propietats bioquímiques és a causa de proximitat filogenètica o de convergència funcional.

-obtenir una visió de les propietats d'un mateix ensim (ADH) en cada un dels grups més representatius del gènere.

Les espècies utilitzades de D. melanogaster en els estudis de metabolisme d'alcohol, defectives per algun gen relacionat amb aquest metabolisme, es detallen en la Taula 2.2.

2.1.3. PRODUCTES QUÍMICS:

Èsters de sodi: Acetilcolina, Nicotilamina.

Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex D-25 medium, Sephadex G-75 Superfine, Sephadex G-75 Superfine, Sephadex 3-200, Superfine, CM-Sephadex CL-6B, Blue-Sephadex CU-6B.

Pierce: N-ètilcolina, GMP-lisina, plaques de poliamid.

Wako: Agar-agar, Lactobacillus.

2.1. MATERIAL

2.1.1. SOQUES UTILITZADES DE DROSOPHILA.

Les soques utilitzades per a les determinacions de les propietats de l'enzim ADH pertanyen a 3 subgèneres diferents dins del gènere Drosophila: Sophophora, Dorsilopha i Drosophila. En la taula 2.1. s'indica per a cada espècie el grup filogenètic i zoogeogràfic al qual pertany dins el seu subgènere (segons Patterson i Stone) l'indret de la captura de la soca i el laboratori on ha estat conservada o d'on s'ha obtingut. L'elecció d'aquestes espècies, ultra la seva disponibilitat, va obeir als següents criteris:

-obtenir una bona representació del grup de D.melanogaster, ja que aquesta és una de les espècies que presenta activitat alcoholdehidrogenàsica més alta. Per estudi de les espècies properes s'espera deduir si la semblança de propietats bioquímiques obeïa a raons de proximitat filogenètica o de convergència funcional.

-obtenir una visió de les propietats d'un mateix enzim (ADH) en cada un dels grups més representatius del gènere.

Les soques utilitzades de D.melanogaster en els estudis de metabolisme d'alcohols, defectives per algun enzim relacionat amb aquest metabolisme, es detallen en la taula 2.2.

2.1.2. PRODUCTES QUÍMICS.

Eastman Kodak: Acrilamida, Bisacrilamida.

Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex G-25 medium, Sephadex G-25 Superfine, Sephadex G-75 Superfine, Sephacryl S-200, Superfine, CM-Sepharosa CL-6B, Blue-Sepharosa CL-6B.

Pierce: N-etilmorfoline, DNP-lisina, plaques de poliamida per a cromatografia en capa fina (15x15) Chen Chung.

Doesder: Agar-agar, isopropanol.

SUBGÈNERE	GRUP	ESPÈCIE	ZONA ZOOGEogrÀFICA	SOCA	LABORATORI		
Sophophora	<u>Melanogaster</u>	<u>D.greeni</u>	etiòpica	Côte d'Ivoire	Gif-s-Ivette		
		<u>D.mauritiana</u>	etiòpica	Côte d'Ivoire	Gif-s-Ivette		
		<u>D.kikkawai</u>	etiòpica	Côte d'Ivoire	Gif-s-Ivette		
		<u>D.burlai</u>	etiòpica	Côte d'Ivoire	Gif-s-Ivette		
		<u>D.bocqueti</u>	etiòpica	Côte d'Ivoire	Gif-s-Ivette		
		<u>D.erecta</u>	etiòpica	Côte d'Ivoire	Gif-s-Ivette		
		<u>D.teissieri</u>	etiòpica	Côte d'Ivoire	Gif-s-Ivette		
		<u>D.yakuba</u>	etiòpica	Côte d'Ivoire	Gif-s-Ivette		
		Drosophila	<u>Willistoni</u>	<u>D.willistoni</u>	neotropical	Califòrnia	Davis
				<u>Subobscura</u>	paleàrtica	Bilbao	Barcelona
paleàrtica	Canàries				Barcelona		
<u>Virilis</u>	<u>D.littoralis</u>			paleàrtica	Liliet	Barcelona	
	<u>D.hydei</u>			paleàrtica	Menorca	Barcelona	
	<u>Mesophragmàtica</u>				neotropical	Xile	Barcelona
			neotropical	Xile	Barcelona		
	<u>Quinaria</u>	<u>D.phalerata</u>	paleàrtica	Bordils	Barcelona		

SOCA

CARACTERÍSTIQUES

ORIGEN

ADH^{slow}

soca isogènica per l'al·lel slow de l'ADH

Barcelona

ADHⁿ¹

soca que produeix una ADH no funcional(CRM⁺)

Univ. d'Utrecht

bADHⁿ⁴

soca que no sintetitza ADH

Univ. de Cambridge

ma-1^{F1}

soca defectiva pels enzims:

piridoxal oxidasa
xantin-DH
aldehid-oxidasa

Univ. d'Utrecht

A-47

soca b Df(2L)A47. cn bw/ In (2LR)O,Cy dp^{lvi} pr cn²

Univ. de Cambridge

TAULA 2.2. Soques de *Drosophila melanogaster* utilitzades en el present treball.

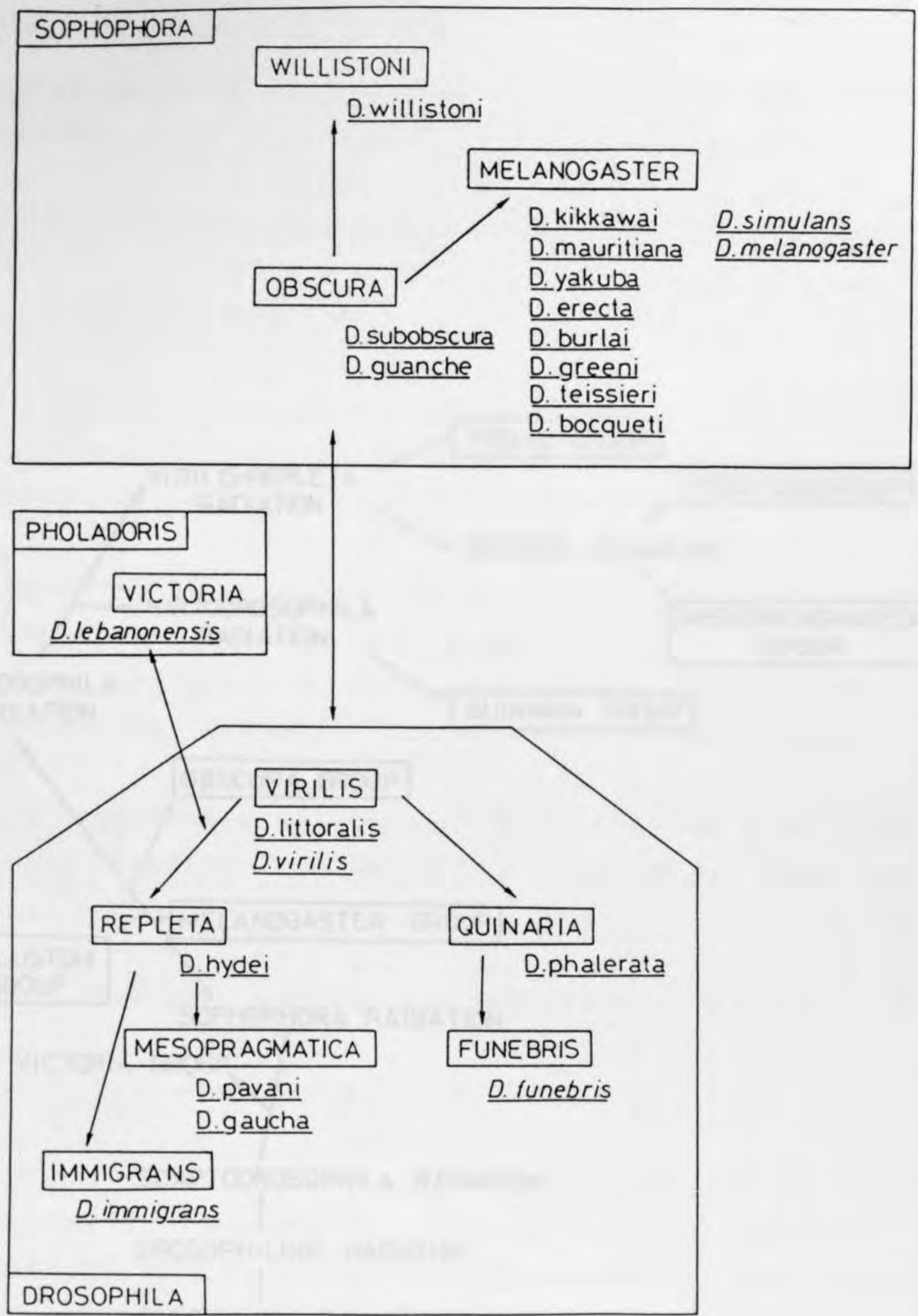


FIGURA 2.1. Esquema de la filogènia del gènere Drosophila segons Patterson-Stone (1952). S'hi troben assenyalades les espècies amb les quals s'ha treballat, i, encursiva, les que havien estat estudiades en el Depart. de Genètica.

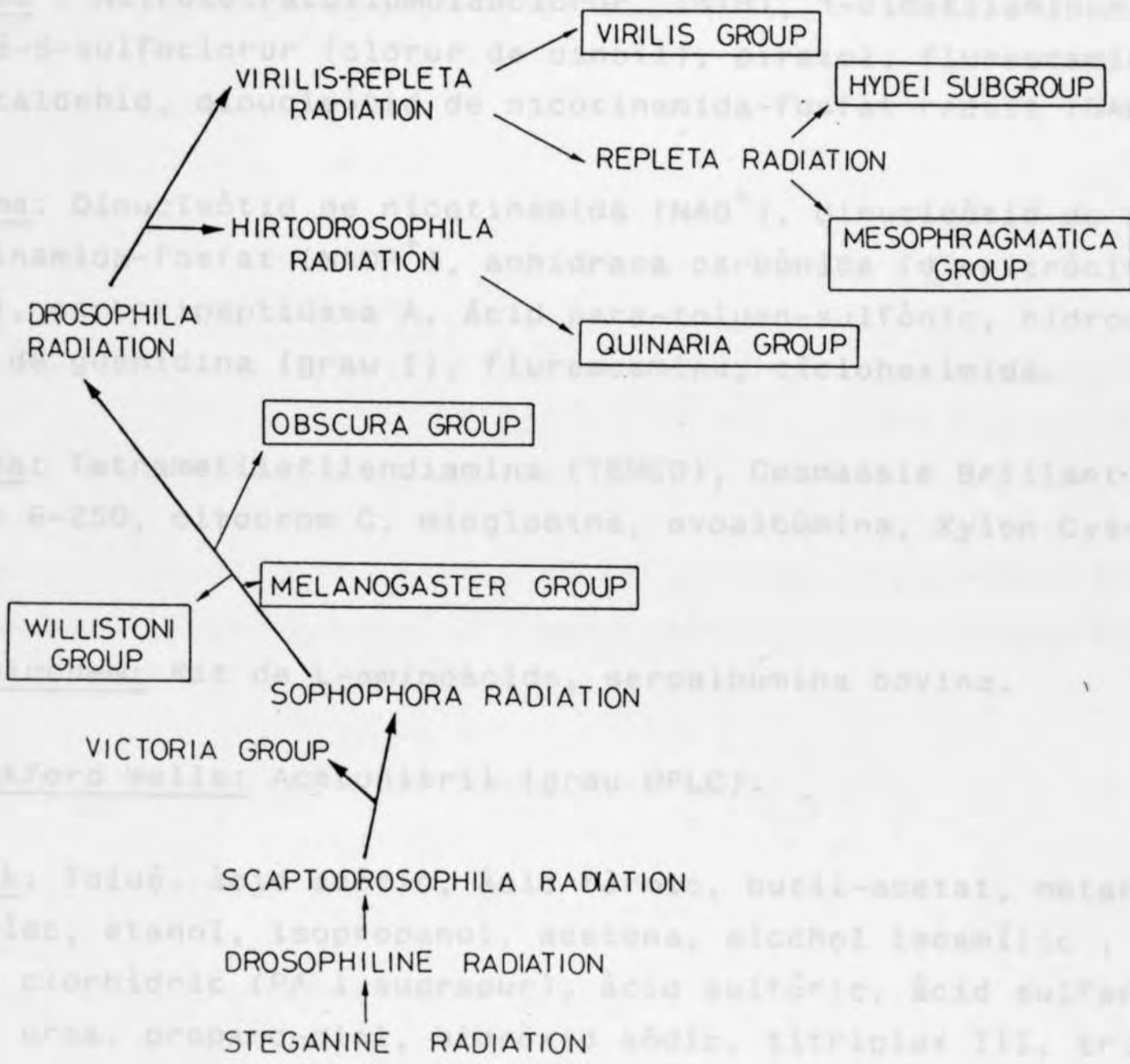


FIGURA 2.2. Esquema de la filogènia del gènere Drosophila segons Throckmorton (1975). S'hi troben assenyalats els grups que contenen espècies amb les quals s'ha treballat.

LKB : Ampholines pH 3.5-10, 5-8, 7-9, 9-11.

UCB: Sulfat de coure II, n-propanol, n-butanol, isobutanol, ciclohexanol.

Carlo Erba: Piridina (graus RPE i ACS).

Scharlau (FEROSA): Glicina.

Fluka : Nitrotetrazoliumblauclohur (NTB), 1-dimetilaminonaf-talé-5-sulfoclorur (clorur de dansil), pirazol, flurescamina, acetaldehid, dinucleòtid de nicotinamida-fosfat reduït (NADPH).

Sigma: Dinucleòtid de nicotinamida (NAD^+), dinucleòtid de ni-cotinamida-fosfat (NADP^+), anhidrasa carbònica (d'eritròcit de bou), carboxipeptidasa A, àcid para-toluen-sulfònic, hidroclo-rur de guanidina (grau I), flurescamina, cicloheximida.

Serva: Tetrametiletildiamina (TEMED), Coomassie Brillant blue R-250, citocrom C, mioglobina, ovoalbúmina, Xylen Cya-nol.

Calbiochem: Kit de L-aminoàcids, seroalbúmina bovina.

Blackford Wells: Acetonitril (grau HPLC).

Merck: Tolué, àcid acètic, àcid fòrmic, butil-acetat, metanol, amoniac, etanol, isopropanol, acetona, alcohol isoamílic , àcid clorhídric (PA i suprapur), àcid sulfúric, àcid sulfaní-lic, urea, propano-diol, hidròxid sòdic, titriplex III, tris (hidroximetilaminometà), glicina, sacarosa, ninhidrina, àcid iodoacètic, 2-mercaptoetanol, bromo-cianur, metasulfat de fe-nacina, peròxid d'hidrogen, reactiu de fenol (Folin-Cioca-teus), àcid fosfòric, p-nitrobenzaldehid, àcid trifluoracètic.

Worthington: Tripsina.

Koch-Light Ltd.: Difenil-carbamilclorur (DPCC)

Panreac: Fosfat sòdic monobàsic, fosfat sòdic bibàsic, glicina, llana de vidre, tartrat sòdic-potàssic, eter etílic, àcid acè-tic.

BDH: Duolite DFM, 2-4-6-colidina, dinucleòtid de nicotinamida reduït (NADH), plaques de poliamida per cromatografia (15x15).

Edward Gurr: Tinció de Papanicolau (Orange G).

Visking: tub de diàlisi de "The Scientific Instrument Center"

Difco : extracte de llevat liofilitzat.

Cel.lulosa comercial.

2.1.3. APARELLS.

Columnes de Cromatografia :

Columnes Quickfit (Afora) : 1cm \varnothing x 100cm , 1.5cm \varnothing x 100cm
2.5cm \varnothing x 45 cm , 1.5cm \varnothing x 45 cm

Columna Pharmacia : 5 cm \varnothing x 100 cm.

LKB : Col.lector de fraccions Ultrorac 7000, Registrador 6520H-2, Absorcímetre U.V. Uvicord II, Bomba peristàltica Varioperpex, Equip d'electroforesi Multiphor.

Radiometer: Conductímetre CDM3, pHmetre 26.

Beckman: Espectrefotòmetre DB-G.

Varian: Espectrefotòmetre Cary-219.

Pharmacia : Formador de gradients CM-1.

Rank-Hilger: Autoanalitzador d'aminoàcids Chromaspeck.

Perkin-Elmer: Equip d'HPLC -Series 2 (columna C8 25cmx4.6mm \varnothing) amb Sigma 15 Data Station, Cromatograf de gasos Sigma 3B (Dual FID Chromatograph) amb HS6 (unitat de Head Space) i Sigma 15 Data Station.

Savant: Font d'alt voltatge Savant-8000V., tancs d'electroforesi A.V. LT-48-A.

Sorvall: Centrífuga RC2-B.

Shandon: Font d'alimentació 500V./150 A., tancs de cromatografia Chromatank.

Bomba peristàltica Degasa STA 131900.

2.2. MÈTODES.

2.2.1. MÈTODES DE CULTIU DE CULTIU DE DROSOPHILA.

2.2.1.1. CULTIU EN FLASCONS.

Les soques es mantenen en el laboratori en cambres termostatades a 17°C o 25°C. Les poblacions es conserven en flascons de vidre d'uns 150cc de capacitat, en el fons dels quals es fa gelificar medi nutritiu segons la recepta de Monclús (1964), amb la següent composició:

agar-agar (18g)		solució A en 1200 cc H ₂ O
sucre (40g)		

farina de blat de moro (260g)		solució B en 600 cc H ₂ O

Es barregen ambdues solucions i s'afegeix 3g de Nipagin (bactericida i fungicida) dissolt en 33 ml d'etanol. Cada flascó s'omple aproximadament amb 30ml de menjar, es deixa refredar, i abans de la seva utilització es complementa amb unes engrunes de llevat fresc de panificació.

2.2.1.2. CULTIU A GRAN ESCALA.

Per tal d'obtenir quantitats apreciables d'individus per a les purificacions de proteïna, es varen fundar 8 caixes de poblacions, de plàstic transparent, de dimensions 36x25x25 cm, amb adults de l'espècie escollida.

La població era alimentada periòdicament amb el mateix preparat descrit per al cultiu en flascons, però dipositat en safates de plàstic de 27x15x4cm, que s'introduïen en les caixes de poblacions per una obertura frontal, degudament protegida per impedir la sortida de les mosques i/o la infecció de la població per d'altres espècies. Abans d'ésser utilitzat, s'enriquia el menjar amb una dissolució de llevat fresc en aigua, i convenientment remogut i homogeneïtzat.

Per a la purificació de la proteïna, hom va optar per la recol·lecció de larves del tercer estadi del desenvolupament. Per a dur a terme aquesta tasca, es varen utilitzar safates de 17x17x6 cm, tipus de tapadora hermètica, on es depositava el menjar de la mateixa composició descrita. La safata era introduïda en la caixa de poblacions, destapada, durant 24-48h., Després d'aquest temps, era retirada i tapada, amb una tapadora on s'havia practicat una obertura que restava coberta amb gasa, per permetre la respiració del cultiu. D'aquesta manera s'aconseguia un conjunt de larves suficientment sincronitzades. Al cap de 10 o 15 dies de cultiu a 25°C, les larves es recollien escalfant el menjar a bany Maria - amb la qual cosa pujaven a la superfície i inundant la safata amb solució salina (8 per mil) - que provoca la flotació de les larves-. Només restava decantar la safata sobre un colador domèstic, i rentar-les amb abundant aigua destil·lada. Les larves eren conservades a -18°C fins el moment de la seva utilització.

2.2.2. RECOLLIDA I SEMBRA D'OUS.

Es preparaven vidres de rellotge de 8cm ø amb una dissolució d'agar en aigua, a la qual s'afegeix alcohol:acètic, 3:1 (3 g agar-agar, 175 ml H₂O, 6 ml alcohol acètic.) Es deixa gelificar l'agar, i, més tard, amb una fulla d'afaitar, es retira la superfície de l'agar per tal de fer-la més rugosa i permetre que les femelles hi depositin els ous. Els vidres preparats d'aquesta ma-

nera, i amb una mica de llevat fresc en el centre, s'introdueixen en una capseta de plàstic especial per a la posta, de 13x9x5.5cm, on hi ha els adults. Després de 24h es recull el vidre, i els ous se sembren, recuperant-los de la superfície de l'agar amb una espàtula fina i incloent-los en medi de cultiu habitual, dins dels flascons ja descrits.

2.2.3. DETERMINACIÓ DE LES DOSI LETALS 50% (LC50).

Es va adoptar una modificació del mètode descrit per David (1974).

Per als experiments de mortaldat en front etanol i isopropanol, se sembraven ous de les diferents espècies de *Drosophila* en pots de menjar fresc, a rao de 100 ous en cada un, per assegurar les mateixes condicions de creixement a tots els individus de les diferents espècies. Per a comprovar la seva resistència, es posaven grups de 10 adults en tubs de vidre, de 3cm de diàmetre per 10 cm d'alt en el fons del qual hi havia cel.lulosa empapada amb una dissolució de sacarosa al 2% i l'alcohol a provar, a la concentració desitjada. De cada concentració es varen fer tres tubs de rèplica com a mínim, a part dels tubs control sense alcohols. El vial es tapava hermèticament amb dues o tres capes de Parafilm. Cada dia es comptabilitzaven les mosques que havien mort, durant quatre dies seguits. Amb aquestes dades es pot calcular el percentatge de mortaldat que produeix cada una de les concentracions d'alcohol, per cada dia de l'experiment, i interpolar-ne la dosi letal al 50%, que representa aquella concentració d'alcohol que provoca la mort del 50% d'individus en un temps determinat d'exposició.

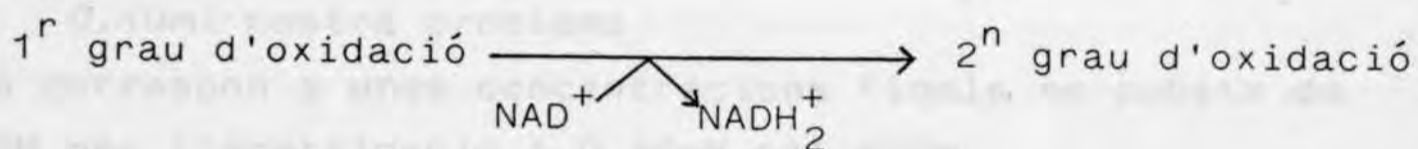
Per a la determinació dels efectes que provoca en les activitats enzimàtiques i concentracions d'alcohol interna i externa, l'exposició d'adults a etanol i isopropanol, hom va utilitzar el mateix tipus de vial i mode d'alimentació que els descrits anteriorment, amb la dife-

rència que els individus es retiraven al temps precís per a la seva homogenització, i la cel.lulosa es conservava per a les determinacions cromatogràfiques.

2.2.4. LECTURES ESPECTROFOTOMÈTRIQUES.

L'activitat dels enzims NAD^+ i NADP^+ -depenents es quantifica mesurant el canvi d'absorció a 340nm que és provocat pel pas de la forma oxidada a la reduïda des esmentats coenzims, o viceversa.

Lectura d'activitat alcohol-deshidrogenasa.



El pas de NAD^+ a NADH provoca un increment en l'absorció a 340nm. Com que hom coneix el coeficient d'absorció molar del NAD^+ a aquesta longitud d'ona (6.2×10^{-3}), i la Unitat d'activitat alcoholdehidrogenàsica és definida com la quantitat d'enzim necessari per reduir 1 mol de NAD^+ per minut a 25°C , les unitats totals d'enzim en una mostra es mesuren calculant la velocitat inicial de la reacció a l'espectrofotòmetre i aplicant la fórmula:

$$\text{unitats act./ml mostra} = \frac{\text{abs. 340nm/min} \times \text{volum total}}{6.2 \times \text{volum de } \text{NAD}^+}$$

Per a la determinació experimental, es feia servir el següent sistema:

0.75ml tampó Tris-HCl, 20mM, pH 8.6

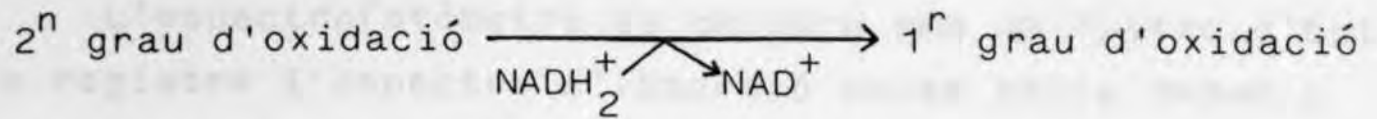
0.15ml solució NAD^+ , 15mM, en tampó Tris

0.15ml solució isopropanol, 0.96M, en tampó Tris

0.15ml mostra problema

Les concentracions finals en la cubeta eren de 1.88mM pel NAD^+ i 0.12M per l'isopropanol.

Lectura d'activitat alcohol-deshidrogenasa inversa.



Per a quantificar l'activitat inversa de l'ADH es mesura el decreixement d'absorbància a 340nm, i es calcula l'activitat de la mateixa manera que per a la reacció directa. La reacció es llegeix en el sistema següent:

0.99ml tampó Tris-HCl, 20mM, pH 8.6

0.01ml solució NADH, 3.93mM, en tampó Tris.

0.10ml solució acetaldehid o acetona 0.96M, en tampó Tris

0.10ml mostra problema

Això correspon a unes concentracions finals en cubeta de 0.12M per l'acetaldehid i 0.49mM pel NADH.

Lectura d'activitat aldo-ceto-reductasa.

Per a la detecció d'aquesta activitat, descrita per Turner i Tipton (1972), s'aplica el mateix esquema anterior, ja que, encara que s'introdueixi NADPH com a coenzim els piridin-fosfats mostren la mateixa corba d'absorció que els no fosfatats. El sistema de lectura era:

0.80ml tampó fosfat monosòdic-bisòdic, 0.1M, pH 7.0

0.15ml solució acetaldehid o acetona 0.96M, en tampó

0.15ml solució NADPH, 75 μM , en tampó

0.10ml mostra problema.

Les concentracions finals en la cubeta equivalien a 9.37 μM de NADPH i 0.12M pel substrat.

Les lectures espectrofotomètriques s'han realitzat en els Espectrofotòmetres Beckman DB-G -pels estudis "in vitro" de l'enzim- i Varian-Cary 219 per a les mesures del metabolisme dels alcohols i els seus productes d'oxidació.

2.2.5. DETERMINACIÓ DE L'ESPECTRE D'ABSORCIÓ MOLAR.

L'espectrofotòmetre es calibra amb un filtre d'holmi i es registra l'espectre d'absorció molar entre 340nm i 260nm, utilitzant com a blanc el tampó Tris-HCl, 0.02M, pH 8.6, tampó en el qual es troba dissolta la proteïna. Amb l'aplicació de la relació:

$$A_{280\text{nm}} = E_{280\text{nm}} \times c \times l$$

on A_{280} = absorció registrada a aquesta longitud d'ona

c = concentració en mols/l de proteïna en la mostra

l = longitud atravesada pel feix de llum

es pot determinar el paràmetre:

E_{280} = extinció molar de la proteïna a 280nm

Una vegada establert aquest paràmetre, per mesura directa de l'absorció d'una mostra a 280nm, se'n pot calcular la concentració de proteïna.

2.2.6. DETERMINACIÓ DE PROTEÏNA EN SOLUCIÓ.

(Mètode de Lowry, 1951). Per a aquest mètode es confeccionen dues solucions:

solució I: Reactiu de Coure-Tartrat.

A 25ml de solució de carbonat sòdic al 10% en sosa 0.5M s'afegeixen 2.5ml de solució de sulfat de coure II en tartrat potàssic a l'1% (50 mg/ml).

solució II: Reactiu de Folin-Ciocalteus.

S'utilitza en dissolució 1:11 en H_2O destil.lada

L'esquema de la valoració és el següent:

-S'incuba durant 10min 1ml de mostra problema més 1ml de solució I.

-S'afegeixen 3ml de solució B, i s'incuba 30 min més.

-Es llegeix l'absorció a 650 nm.

Per a la quantificació de la proteïna d'unes mostres problema, s'ha de calcular paral.lelament la recta de regressió entre unes dissolucions patró de proteïna a diferents concentracions i les absorbàncies respectives a 650nm. En el nostre cas es va utilitzar un banc de dilucions d'albúmina sèrica bovina (BSA) en aigua de 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 mg/ml.

2.2.7. ELECTROFORESI EN MIDÓ.

Les electroforesi en midó es varen realitzar segons la recepta següent:

Gel: midó al 10% en tampó Tris-HCl, 0.05M, pH 8.6

Electrodes : tampó Tris-HCl, 0.25M, pH 8.6.

L'electroforesi trancorria durant 3-4h. a 350V.

Després d'aquest temps ,es procedia a la tinció del gel segons les tècniques exposades a continuació:

Tinció per activitat ADH. (Grell, 1965)

- 40mg NAD⁺
- 15ml isopropanol
- 20mg NitrotetrazoliumBlue (NTB)
- 5mg 5-Metilfenaziniummetilsulfat (PMS)

en 100ml de tampó del gel.

Incubació....1h a 37°C

Tinció per octanol-DH.

- 60mg NAD⁺
- 0.1g MgCl₂
- 40mg NTB
- 5mg PMS
- 1.2ml n-octanol
- 0.4ml Tween

en 100ml de tampó del gel

Incubació2h a 37°C.

Tinció per activitat reductàsica.

Mètode de Turner-Tipton (1972) per a les aldo-ceto-reductases de mamífer. Abans de tenyir el gel, es renta amb tampó Glicina-NaOH, 0.1M, pH 8.9. La mescla de tinció és la següent:

- 40mg NADP⁺
- 7.38 ml 1,2,propano-diol
- 40mg NTB
- 10mg PMS

en 100ml de tampó de rentat.

Incubació ... 3-4h a 37°C.

El fet que reporten Turner i Tipton, consistent en la reversibilitat augmentada de la reacció catalitzada per la reductasa quan actua sobre propano-diol com a substrat, permet la tinció directa dels gels amb NTB i PMS, que detecten la presència de coenzim reduït. D'altra manera, s'ha de recórrer a tècniques de tinció negativa, com les descrites per Duley i Holmes (1982), que resulten sempre molt més enutjoses.

2.2.8. ELECTROFORESI EN POLIACRILAMIDA-SDS.

Es segueix la tècnica descrita per King i Laemmli (1971), amb algunes modificacions, i adaptada per a l'electroforesi en placa mitjançant un aparell dissenyat en aquest mateix departament pel Dr. Baguñà.

La presència del detergent dodecil-sulfat sòdic en l'electroforesi permet la visualització de les subunitats constituents de les proteïnes, i el càlcul del seu pes molecular, ja que existeix una correlació inversa entre la seva grandària (PM) i la distància recorreguda en el gel. (Dunker i Rueckert, 1969). S'utilitzen dues classes de gels: el gel concentrador- primera fase del recorregut de la mostra- i el gel separador -segona fase, predominant- del recorregut de la mostra. Les composicions dels gels són les següents:
Gel concentrador: gel d'acrilamida:bis-acrilamida, 3%:0.08% amb un 1% SDS.

2 ml acrilamida:bis-acrilamida, 30%:0.8%
 2.5 ml tampó Tris-HCl 0.6M, pH 6.8
 15 ml H₂O destil.lada
 200 µl Persulfat amònic al 10%
 0.2 ml SDS 10%
 10 µl TEMED

Gel separador: gel d'acrilamida:bis-acrilamida, 12.5%:0.33% amb un 1% SDS.

20 ml acrilamida:bis-acrilamida, 30%:0.8%
 10 ml tampó Tris-HCl, 1.87M, pH 8.8
 17 ml H₂O destil.lada
 140 µl Persulfat amònic 10%
 0.5 ml SDS 10%

El tampó de les cubetes és el mateix que en el mètode original tampó Tris-Glicina, 0.025M, amb un 0.1% SDS, de composició:

3 g Tris
14.4g Glicina
20ml SDS 5%
1ml 2-mercaptoetanol

fins a 1l. H₂O destil.lada.

Les mostres, després de dessecades, eren redissoltes en un tampó especial, Tris-HCl 0.0625M, amb 3% SDS, escalfades 10min a 75°C, i aplicades en el gel.

Tampó de les mostres:

7.57 g Tris
610 ml SDS 5%
50 ml 2-mercaptoetanol
200 ml glicerol

fins a 1l. H₂O destil.lada

Les proteïnes de pes molecular conegut que es varen utilitzar com a patrons per el.laborar la recta de regressió pes molecular/distància de migració són dissolucions d'1mg/ml de:

ovoalbúmina	pm 68750
albúmina sèrica	45000
mioglobina	31000
citocrom C	17800
anh.carbònica	12300

El marcador utilitzat durant l'electroforesi era el blau de bromofenol. La prova es feia córrer a un miliamperatge de 10mA (30-40V), fins que el marcador penetrava en el gel separador, moment en el qual,era augmentat a 20mA (120V). Quan el marcador atenyia l'extrem inferior del gel, la prova es donava per conclosa (normalment unes 7h.)

La tinció a la qual es sotmetia el gel era per proteïna total. Primerament, es fixava amb metanol:àcid acètic:aigua (5:1:5) , durant 15min a 37°C. Es tenyia amb Coomassie Blue al 0.1% , 15min a 37°C, i es destenyia amb una solució d'àcid acètic al 7% i metanol al 5% en aigua.

Una varietat d'electroforesi en SDS és aquella que es realitza amb gels amb un gradient en la concentració d'acrilamida paral·lel a la direcció de la mostra. En el nostre cas es varen utilitzar gradients d'un 9% a un 27%. La composició dels gels era la següent:

tampó gel separador 27.7 g Tris + 10ml SDS 5%
a 100 ml H₂O (pH 8.6 -HCl)

tampó gel concentrador ... 6 g Tris + 8ml SDS 5%
a 100 ml H₂O (pH 8.6 -HCl)

gel separador:

	<u>9%</u>	<u>27%</u>
tampó gel	3 ml	3 ml
H ₂ O	8.25ml	---
acrilamida 40%	3.75ml	12 ml
bis-acril. 3%	1.50ml	1.50ml
TEMED	10 μ l	10 μ l
Persulfat amònic (10mg/ml)	250 μ l	250 μ l

gel concentrador:

tampó gel	5 ml
acrilamida 40%	1.25ml
bis-acril. 3%	4 ml
H ₂ O	9.7ml
TEMED	20 μ l
Persulfat amònic (10mg/ml)	500 μ l

2.2.9. GELS D'ELECTROENFOCAMENT.

El mètode d'electroforesi en gradient de pH (electroenfoament), fou descrit per Karlsson i col. (1973). Per a les nostres proves s'ha utilitzat l'aparell Multiphor 2117 de LKB, i els anfolins de la mateixa marca comercial.

En els gels d'electroenfoament, la mostra proteica resta immobilitzada en el punt on el gel té un pH equiva-

lent al seu pI - valor al qual presenta càrrega elèctrica nul·la, i per tant no migra dins d'un camp elèctric-. A més a més d'obtenir la caracterització dels pI de les proteïnes problema, una tinció del gel per proteïna total pot donar idea del grau de puresa d'una preparació.

En el nostre cas, s'ha treballat amb gels d'acrilamida:bis-acrilamida 4.78% : 0.14%, i un gradient de 3.5 a 10 d'unitats de pH d'un extrem a l'altre del gel. La composició era la següent:

10 ml solució acrilamida:bisacrilamida, 29.1%:0.9% p/v
 18 ml H₂O destil·lada
 3.75 g sacarosa
 1.4ml Ampholine 3.5-10
 0.2ml Ampholine 9-11
 0.1ml Ampholine 4-6
 0.1ml Ampholine 5-7

150 µl de Persulfat Amònic (10%)

La solució es desgasifica abans de construir el gel, que acostuma a tenir una gruixària de 0.8mm. Les mostres s'apliquen a la superfície del gel, empapades en paper Whatman 3MM de dimensions 4x6mm, i es retiren al cap de 30min, quan tota la mostra ha penetrat en la matriu del gel. L'electrode positiu s'aplica sobre paper humitejat amb medi àcid (àcid fosfòric 1M) i el negatiu sobre medi bàsic (NaOH 1M). El voltatge inicial és de 300V (30mA) i al final de la prova ha pujat fins uns 500V i el miliamperatge ha caigut a uns 5mA -el miliamperatge decau una vegada aconseguit l'electroenfocament dels anfolins-. Els estàndards utilitzats per a aquesta prova són dissolucions de 2mg/ml de mioglobina i citocrom. Hom col·loca la primera prop de l'ànode i la segona prop del càtode. Els sistemes de tinció utilitzats han estat:

- tinció per activitat ADH (equivalent al sistema descrit pels gels de midó).
- tinció per proteïna total (equivalent al descrit pels gels de SDS).

Per calcular la recta de regressió pH/distància de migració, hom llegeix el pH del gel a intervals de 0.5cm amb uns electrodes de superfície.

2.2.10. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.

2.2.10.1. FILTRACIÓ EN GEL.

Les columnes de filtració en gel ofereixen un sistema totalment inert respecte els productes filtrats, de manera que s'obté una elució diferencial basada únicament en la grandària de cada una de les molècules que constitueixen la mostra. Les microesferes dels diferents tipus de gels formen la fase estacionària de la cromatografia i es disposen de tal manera que deixen uns porus de diàmetre regular. Les molècules grans, que no hi poden penetrar s'elueixen abans que les més petites, que resten entretingudes dins la matriu del gel. Les aplicacions idònies d'aquest tipus de cromatografia són la desalinitzacions de les mostres, la separació de cofactors o inhibidors dels enzims, o la separació de macromolècules de reactius que s'hagin utilitzat anteriorment.

Sephadex

El Sephadex és un gel obtingut per una reacció d'entrecreuament del dextrà i l'epiclorhidrina. El compost resultant té molts grups hidroxil situats en la part externa de les molècules, fet que confereix al Sephadex una gran hidrofilitat. En la pràctica, això suposa que el gel s'infla fàcilment, tant en H_2O com en solucions salines. Els diferents tipus de Sephadex difereixen en el volum de les seves esferes, i per tant, en el diàmetre del porus que deixen lliure en la matriu. S'han utilitzat els següents tipus de Sephadex (s'indica a continuació el rang de pes molecular per als quals són adequats):

Sephadex	G-10	fins 700
Sephadex	G-25M	1000-1500
Sephadex	G-25SF	" "
Sephadex	G-75SF	3000-70000

Sephadex G-10

S'ha utilitzat per a la desalinització de les últimes fraccions de la mescla de digestió triptica de la proteïna ADH. Es tracta com el G-25.

Sephadex G-25M

S'ha utilitzat en la purificació de l'ADH de D.hydei i en la seva carboximetilació. El gel s'infla durant 3h a 20°C -o 1h a 90°C-, seguint una proporció aproximada de 12 a 15 ml per g de gel. Una vegada inflat, se separen per decantació les partícules més fines, que queden en suspensió en el líquid, i el gel es desgasifica abans d'omplir la columna corresponent. En la purificació de la proteïna, el Sephadex G-25 s'infla en tampó fosfats (monosòdic-bisòdic) 2mM, pH7.0, i la columna utilitzada tenia unes dimensions de 5cm \varnothing per 80cm de longitud. En la carboximetilació de la proteïna, el gel s'infla amb àcid acètic al 50% i la columna utilitzada tenia unes dimensions de 1.5cm \varnothing per 40cm de longitud. En tot cas, una vegada plena i equilibrada la columna amb el gel desitjat, es renta amb un o dos volums del mateix tampó abans d'introduir-hi la mostra.

Sephadex G-25SF

S'ha utilitzat en la separació dels diferents pèptids i reactius de la hidròlisi triptica de la proteïna. El gel s'ha inflat amb àcid fòrmic al 5%, i s'ha usat en forma de columnes d'1cm \varnothing i 1 m de longitud - tres columnes d'aquest tipus que connectades amb sèrie equivalen a una columna de tres metres de longitud. El G-25SF té un temps i volum d'inflat iguals al del G-25M.

Sephadex G-75SF

S'ha utilitzat en la determinació del pes molecular de l'enzim nadiu en les diferents espècies de Drosophila.

El gel s'infla en tampó Tris-HCl 0.02M, pH 8.6, durant 24h a temperatura ambient, a rao d'uns 15ml per gram de gel sec. La columna utilitzada era d'1cm de \varnothing i 1m de longitud.

Sephacryl

El Sephacryl és un gel obtingut per una unió covalent entre un alil-dextrà i NN'metilenbisacrilamida. Per la seva composició, resulta ideal per a ésser utilitzat amb solvents aquosos, presentant un grau de resolució molt més fi que el Sephadex.

Sephacryl S200

S'ha utilitzat en l'últim pas del procés de purificació de l'enzim ADH, per a separar la proteïna pura de les sals i NAD^+ remanents en la mostra dels passos anteriors de la purificació. Aquest gel és ideal per al fraccionament de proteïnes entre 5000 i 250000d de pes molecular. A diferència del Sephadex, el Sephacryl ja ve inflat, i només cal resuspendre'l en tampó Tris-HCl 0.02M, pH 8.6, desgasificar-lo i omplir la columna. La columna de Sephacryl tenia unes dimensions de 1.5cm \varnothing per 1m de longitud.

2.2.10.2. BESCANVI IÒNIC.

La base de les columnes de bescanvi iònic rau en la utilització d'una matriu inert on s'hi han unit covalentment grups amb càrrega positiva o negativa, que donen lloc respectivament a columnes de bescanvi aniònic i catiònic. El tipus de matriu utilitzada determina les característiques mecàniques i el comportament front a les mostres biològiques. La separació per bescanvi iònic s'obté gràcies a l'adsorció reversible del producte a la columna i elució posterior amb un eluent que canviï l'equilibri elèctric dels sistema.

CM Sepharosa-CL-6B.

És un bescanviador catiònic (ofereix càrregues

negatives lliures en la superfície del gel), mercès a grups carboximetil ($-OCH_2COO^-$) units a una matriu d'agarosa i 2,3-dibromopropanol. El gel ve ja preinflat, de manera que el procés s'ha de completar deixant-lo durant 2h en tampó fosfats 10mM. Les condicions de pH del tampó han d'ésser estudiades per tal d'assegurar una adequada càrrega elèctrica de la proteïna. L'enzim ADH de Drosophila hydei presenta una banda més intensa corresponent a un pI proper a 9. Aixó significaria que a un pH inferior a aquest valor, la proteïna estarà carregada positivament i per tant restarà adherida a un bescanvador catiònic. Hom va creure oportú de treballar a un pH de 7.0. L'elució de la mostra de la columna es va fer amb un gradient lineal de 0 a 1M de NaCl, de manera que els ions Na^+ substitueixen progressivament les molècules de la proteïna en la columna. Una vegada eluïda la mostra, la columna torna a ésser reequilibrada directament amb el tampó inicial. La columna de CM Sepharosa-CL-6B utilitzada tenia unes dimensions de 2.5cm de \varnothing per 15cm de longitud.

2.2.10.3. COLUMNA D'AFINITAT.

El principi d'afinitat biològica ha suposat una metodologia bàsica en la purificació de les molècules biològicament actives, tals com enzims, anticossos, àcids nucleics o vitamines, caracteritzades totes elles per unir-se a molècules complementàries específiques. Aquest tipus de cromatografia es basa en unir a una matriu inert anàlegs estructurals de les molècules diana del compost que hom vol purificar, de manera que s'hi uneixin específicament i puguin ésser després eluïdes utilitzant el veritable receptor biològic, envers el qual mostren, evidentment, un grau d'afinitat superior.

Blue-Sepharosa CL 6B.

La Blue-Sepharosa CL 6B conté units a la Sepharosa grups de Cibacron-Blue P3G-A, un anàleg estructural dels coenzims que contenen un grup adenil en la molècula (NAD^+ i $NADP^+$). Per tant, es particularment indicat per

a la purificació d'enzims NAD^+ i NADP^+ depenents, encara que també uneixi inespecíficament proteïnes estructurals (albúmina), lipoproteïnes, interferons i factors plasmàtics de coagulació. A l'especificitat de la unió al gel, s'ha d'afegir l'especificitat de la substància amb la qual hom elueix la mostra.

La Blue-Sepharosa s'ha d'inflar prèviament amb H_2O destil.lada, i després amb tampó Tris-HCl 20mM, pH 7.5 a rao d'uns 20ml de tampó per gram de gel sec. La columna utilitzada era de 2.5cm de \varnothing i 10cm de longitud. L'elució es realitzava amb una solució de NAD^+ 1mM en el mateix tampó en el qual es trobava equilibrada la columna. Per tal de regenerar el gel després de l'elució, hom procedia a un pols de tampó bàsic seguit d'un d'àcid, per a tornar a ésser reequilibrada amb el tampó inicial. Els tampons eren els següents:

-10 volums de columna amb tampó Tris-HCl 0.1M amb NaCl 0.5M a pH 8.5.

-10 volums de columna amb tampó Acetat Sòdic 0.1M amb NaCl 0.5M, a pH 4.5.

-Reequilibrat amb Tris-HCl, 20mM, pH 7.5.

2.2.11. DIÀLISI.

El tub de diàlisi utilitzat, de diàmetre variable segons el volum de mostra a tractar, es bull durant 10min en una solució 1mM d'EDTA i es renta en H_2O destil.lada.

2.2.12. PREPARACIÓ DE LA MOSTRA PER ANÀLISI D'AMINOÀCIDS.

2.2.12.1. HIDRÒLISI ÀCIDA.

Hom parteix d'un volum conegut de dissolució proteica (o de pèptid) dessecada o liofilitzada en un tub Pirex. S'afegeixen 0.5ml de HCl 6M suprapur i es tanca el tub al buit per evitar l'oxidació de la mostra. La hidròlisi té lloc a 105°C , durant 24, 48 o 72h. Després d'aquest temps s'obre el tub, es desseca el seu contingut, i hom redissol directament en el tampó adequat per a l'anàlisi d'amino-

àcids.

2.2.12.2. OXIDACIÓ DE LA PROTEÏNA.

Mètode de Hirs (1956) ,basat en l'oxidació per àcid perfòrmic. Aquest ha d'ésser naixent, per conservar tot el seu poder oxidant. Hom el prepara mitjançant l'addició de 0.5ml de peròxid d'hidrogen (H_2O_2) 30% a 9.5ml d'àcid fòrmic, i la incubació de la barreja durant 2h a temperatura ambient. S'afegeix a un tub amb proteïna, 0.1ml de reactiu, es deixa reaccionar 1h a $0^\circ C$ dins la nevera i es desseca sobre $NaOH/H_2SO_4$ en un dessecador al buit. Posteriorment es procedeix segons l'apartat anterior.

2.2.12.3. DETERMINACIÓ DEL TRIPTÒFAN.

Per a la quantificació del triptòfan, aminoàcid molt làbil que resulta sistemàticament destruït per la hidròlisi àcida, hom ha aplicat el mètode de Liu i Chang , adaptat per al sistema de tampons de l'autoanalitzador utilitzat. Al tub amb la proteïna dessecada, hom afegeix 0.1ml de solució 3N d'àcid para-toluen-sulfònic en hidroclozur de triptamina al 0.2%. Es tanca el tub al buit i es permet la hidròlisi a $110^\circ C$ durant 24h. Passat aquest temps s'obre el tub i s'afegeix 0.2ml de $LiOH$ 1M i 0.2ml d' H_2O . Es filtra a través d'una membrana Millipore de 0.22 de ϕ per tal de clarificar la mostra, ja que s'introdueix directament en l'autoanalitzador.

2.2.12.4. ANÀLISI QUANTITATIVA D'AMINOÀCIDS.

L'autoanalitzador utilitzat ha estat un Chromaspeck (Rank Hilger). Les condicions d'anàlisi eren les següents:

columna : 35cm longitud i 30cm ϕ
a $40-60^\circ C$ de temperatura i $56 N/m^2$ de pressió

resina : MK-1 de la casa Rank Hilger (resina catiònica forta de partícules de $6\mu m$ de ϕ , de poliestirè sulfonat al 8%.

L'elució dels pèptids s'aconsegueix per un gradient continu de pH, amb ions liti com a bescanviadors. El sistema de detecció utilitzat és per fluorescència, fet que permet la detecció d'aminoàcids a nivell nanomolar. La derivatització post-columna consisteix en la formació d'un compost emissor: ortoftaldehid-2-mercaptoetanol-aminoàcid.

El tractament de les mostres per a la seva anàlisi era el següent: la mostra hidrolitzada i dessecada era redissolta directament en HCl 0.05N per ésser introduïda en l'analitzador, tot afegint una quantitat coneguda de nor-leucina com a standard intern. En el tractament de la mostra per anàlisi de triptòfan, el NaOH del mètode inicial era substituït per LiOH, ja que el Chromaspeck treballa amb ions liti.

Els càlculs de les quantitats d'aminoàcids presents en la mostra es realitzen a partir de la concentració coneguda d'standard intern en la mostra (50 M). Per a calcular els factors de resposta dels diferents aminoàcids s'analitzaren standard on tots els components eren presents a la mateixa concentració de la N-leucina :

$$RRF_x = \frac{\text{àrea N-leu (st)}}{\text{àrea AA}_x \text{ (st)}}$$

Després , en cada mostra problema, s'aplica la relació:

$$\text{Conc. AA}_x = \frac{\text{àrea AA}_x \times RRF_x \times \text{conc.N-leu}}{\text{àrea N-leu}}$$

RRF_x = factor de resposta de l'aminoàcid x

Si la concentració de N-leu s'expressa com a tal, obtindrem la quantificació dels aminoàcids en la mostra també en els mateixos termes de concentració. Es podria substituir la concentració de N-leu per quantitat absoluta de N-leu, obtenint també aleshores la quantificació absoluta de l'aminoàcid injectat per a l'anàlisi.

El mètode general de quantificació d'aminoàcids es basa en la hidròlisi exhaustiva de la proteïna. El valor òptim per a la majoria d'aminoàcids és la mitjana dels valors obtinguts amb hidròlisis de 24, 48 i 72h. Els aminoàcids treonina, serina i tirosina, sofreixen hidròlisi parcial durant el tractament amb HCl 6N, i el triptòfan, total. Per als tres casos esmentats, hom pot practicar una de les dues correccions següents:

- extrapolació dels resultats a temps 0.
- increment en un 10% per a la serina i un 5% per treonina i tirosina.

Els aminoàcids valina i isoleucina, si es troben en posició contigua, formen dipèptids molt estables, que no es trenquen després de les condicions normals d'hidròlisi. Per això, el valor per a aquests aminoàcids s'obté extrapolant els resultats a temps infinit.

L'asparagina i la glutamina no són detectables per a aquest sistema, i els seus valors són adicionats respectivament als de l'àcid aspàrtic i glutàmic.

En les mostres oxidades hom quantifica la cisteïna com a àcid cisteic i la metionina com a metionina sulfona.

2.2.13. DETERMINACIÓ DE L'EXTREM C-TERMINAL.

Se segueix el mètode de Thatcher (1977), basat en la digestió controlada de la proteïna per carboxipeptidasa A, preparada segons Ambler (1972).

Preparació de la carboxipeptidasa.

Hom dilueix la carboxipeptidasa A comercial en H₂O destil·lada en la proporció adequada per obtenir una solució de 2 mg/ml, que hom centrifuga a 2000rpm durant 5 min. El precipitat es resuspèn en 0.1ml de NaHCO₃ 1% i s'afegeix progressivament NaOH 1N fins aconseguir la total redissolu-

ció de la proteïna. S'ajusta el pH final a 8-9 amb HCl 0.1M i la dissolució s'enrasa a 1ml amb acetat d'N-etil-morfoline 0.2M, pH 8.6.

Digestió de la mostra.

Hom desseca de 20 a 30 nmols de proteïna en 5 tubs independents. Més tard es redissol en 50 μ l d'acetat d'N-etil-morfoline 0.2M, pH 8.6 i a cada un dels tubs s'afegeix una quantitat creixent de carboxipeptidasa A preparada com s'ha descrit en l'apartat anterior: 0.5, 10, 25 i 50 μ l de dissolució (2mg/ml de carboxipeptidasa). S'incuba 1h a 37°C i després es para la reacció baixant el pH amb àcid acètic glacial (fins un pH de 3 aproximadament). Es centrifuga a 5000rpm durant 10 min, es recull el sobrenedant i es desseca per a ésser sotmès directament a anàlisi d'aminoàcids, ja que hom hi localitza els aminoàcids alliberats per acció de la carboxipeptidasa. Per a la determinació de la seqüència C-terminal, hom compara els resultats al llarg del temps i els aminoàcids que mostren concentració creixent són els de l'extrem carboxi-terminal, en l'ordre de nM d'aminoàcid alliberat.

2.2.14. DETERMINACIÓ DE L'EXTREM N-TERMINAL.

El marcatge de l'extrem amino-terminal de la proteïna es realitza segons el mètode de Gray (1967). El procés és exactament el mateix tant si la mostra consisteix en una proteïna completa, com si es tracta de pèptids procedents de digestió triptica de la molècula.

Un equivalent a 10nM de proteïna o pèptid dessecats, es renten amb 10 μ l de NaHCO_3 i es dessequen successivament. Posteriorment, s'afegeixen 10 μ l d' H_2O i 10 μ l de solució de clorur de dansil (3mg/ml en acetona). En tub es tapa amb Parafilm i s'incuba durant 1h a 37°C o 3h a temperatura ambient, protegit de la llum. La pèrdua de la coloració groguenca de la mostra indica que la reacció ha acabat. A continuació es desseca, es sotmet a hidròlisi

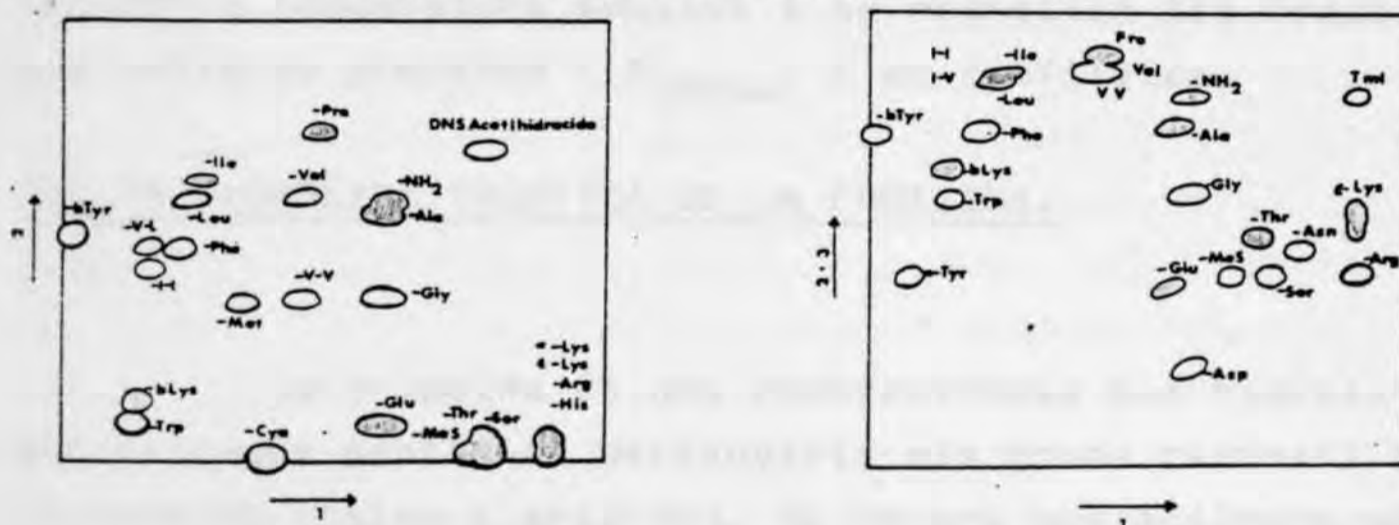
àcida (HCl6M, 105°C) durant 12h en una campaneta Durham tancada a la flama, per evitar el secat. Una vegada transcorregut aquest temps, s'obre el tub, es desseca sobre sosa i es redissol en 5 μ l d'etanol absolut per a l'aplicació en plaques de poliamida. Les plaques de poliamida utilitzades tenen unes dimensions de 5 x 5cm. La mostra s'aplica en un angle, en un punt equidistant d'ambdós marges, i la placa es sotmet a cromatografia de 3 dimensions:

- 1ª/ Àcid fòrmic al 5%.
- 2ª/ Toluè:àcid acètic (9:1, en volum)
- 3ª/ Butil-acetat:metanol:àcid acètic (30:20:1, v.)

La segona dimensió es corre perpendicular a la primera, i la tercera sobre la segona.

Hom observa els derivats dansilats dels aminoàcids a la llum ultraviolada. En una cara de la placa s'ha aplicat només mostra problema, i en l'altra cara, a la vegada que mostra problema, s'aplica una solució standard d'aminoàcids dansilats (treonina, histidina, prolina, alanina, isoleucina, àcid glutàmic i lisina 1mM).

L'esquema de detecció és el següent:



2.2.15. CARBOXIMETILACIÓ DE LA PROTEÏNA.

Hom segueix el mètode de Crestfield (1963).

La carboximetilació és un procés per assegurar el trencament dels ponts disulfur que estableixen l'estructura terciària de la proteïna, de manera que resulta bàsic abans de qual-

sevol hidròlisi per assegurar que tota la seqüència aminoacídica resulta accessible en el mateix grau a l'acció de l'enzim hidrolític.

Hom redissol la proteïna, liofilitzada prèviament, a rao de 4 o 5mg/ml en la solució desnaturalitzant següent:

0.36M Tris

0.002M EDTA

6M Hidroclorur de guanidinaajustada a pH 8.6

en un tub de rosca protegit de la llum. S'hi afegeix 10ml de 2-mercaptoetanol i hom bombolleja N_2 gas sobre i a través de la dissolució durant 5 min. per tal de mantenir una atmosfera reductora dins del tub. Es deixa reposar 4h a 33°C. Després s'afegeix 0.2ml de solució d'àcid iodoacètic 0.268 g/ml en NaOH 1M, acabada de fer, protegida de la llum i tractada amb N_2 . Es permet la incubació 30 min a 4°C i 2h a 37°C. Per tal de separa les sals i el iodoacètic remanent de la proteïna carboximetilada, hom passa la mostra per una columna de filtració en gel de Sephadex G-25 (40cm x 1.5cm \emptyset), equilibrada amb àcid acètic al 50% i tapada amb paper de plata per tal de protegir-la de la llum. S'elueix amb àcid acètic 50% a temperatura ambient i es reuneixen les fraccions que contenen proteïna (A_{280nm}) i es liofilitza.

2.2.16 HIDRÒLISI TRÍPTICA DE LA PROTEÏNA.

La tripsina és una endopeptidasa que hidrolitza els enllaços peptídics pertanyents als grups carboxil dels aminoàcids lisina i arginina, de manera que allibera pèptids amb un residu C-terminal lisina o arginina. En teoria, hom recupera tants pèptids més un com arginines i lisines hi hagi en la molècula. Sempre hi ha, però, interferències que modifiquen aquest rendiment ideal, com és el trencament pseudotríptic dels enllaços tirosina-treonina, o la resistència a la hidròlisi del lisina-prolina o arginina-prolina. Malgrat això, la tripsina és l'endopeptidasa que presenta major grau d'especificitat i per això s'ha triat per a la realització de mapes peptídics.

Tractament de la tripsina.

La tripsina comercial conté sempre contaminacions de quimotripsina, de manera que s'esdevé necessari un tractament inhibitor d'aquest enzim si no es vol tenir una col·lecció de pèptids corresponents a ambdues activitats hidrolítiques. Per a preparar la tripsina es dissol en Tris-HCl-CaCl₂ 0.1M, pH 8.0, a raó de 10 mg/ml. Paral·lelament es prepara una solució de DPCC (difeníl-carbonil-cloride) amb 10mg en 1.7ml d'acetona, i s'afegeix 5 µl d'aquesta solució per mililitre de solució de tripsina. S'incuba 90min a temperatura ambient. Si la mostra resta tènue, s'ha de centrifugar i recollir el sobrenedant. Hom pot conservar aquesta solució congelada fins a la seva utilització, moment en el qual s'ha de diluir a 1mg/ml mitjançant acetat amònic 0.2M, pH 8.5.

Digestió triptica de la proteïna.

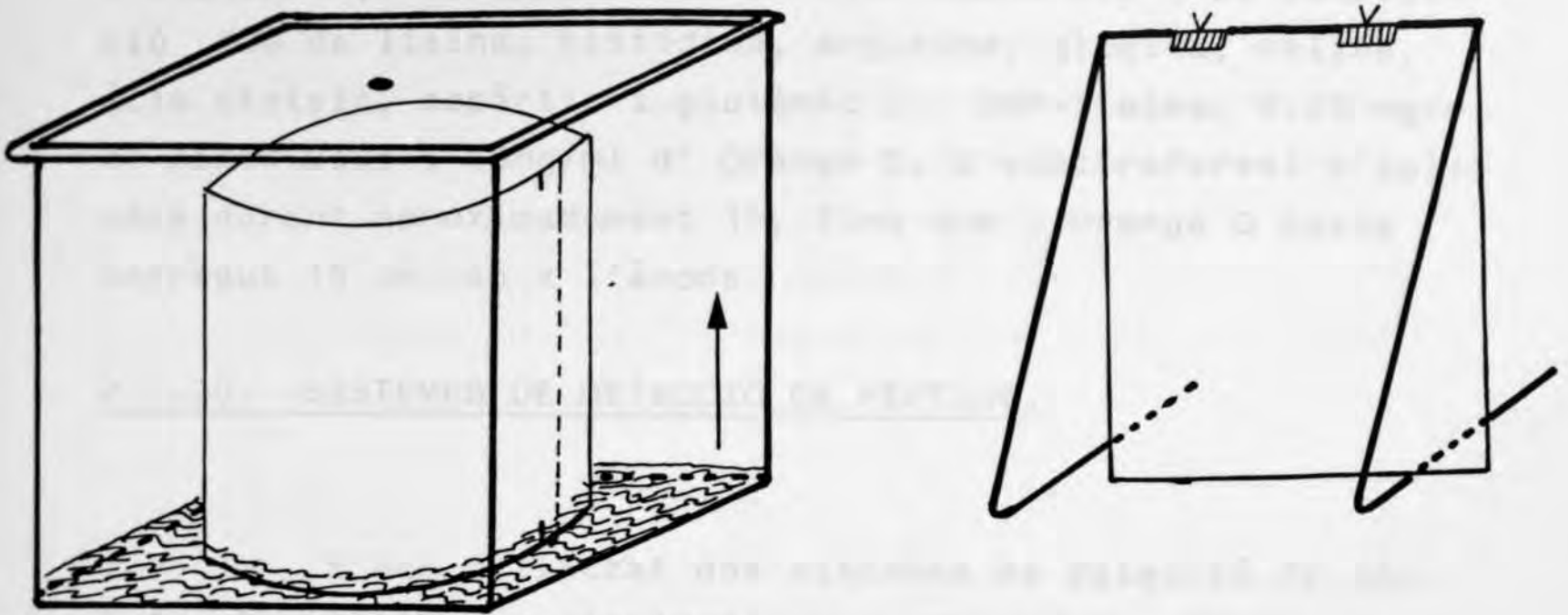
Per digerir la proteïna carboximetilada, es prepara en dissolució de 5 mg/ml en també Tris-HCl 0.1M/Urea 8M, pH 8-9. La solució d'urea -abans d'afegir-hi el Tris- és desionitzada amb cristalls de DUOLITE (desionitzador aniònic i catiònic) i filtrada a través de llana de vidre. Una vegada redissolta la proteïna, s'afegeix Tris-HCl 0.1M fins a fer la solució 2M d'urea. La tripsina s'aplica segons una relació 15:1 proteïna:tripsina. S'incuba la reacció 4h a 37° i es liofilitza, per a redissoldre després en solament 1ml d'àcid fòrmic al 5%, que serà aplicat a una columna de filtració en gel (Sephadex G-25 SF) d'1m x 1cm Ø si és analítica, i 3m x 1cm Ø si és preparativa. S'elueix amb àcid fòrmic 5% i es llegeixen les fraccions que contenen pèptid per absorbància a 280nm. Amb la columna d'1m s'aconsegueix la separació de la urea i el Tris dels pèptids triptics, mentre que amb la de 3m s'atany un cert grau de fraccionament dels pèptids (segons criteris de grandària i hidrofobicitat).

2.2.17. DIGESTIÓ AMB BROMUR DE CIANÒGEN.

Es segueix el mètode de Gross (1967). La prova del BrCN és específica per a la detecció de residus de metionina presents en una cadena peptídica, ja que aquest compost hidrolitza pel grup carboxil de la metionina, tot transformant aquest residu a homoserina o homoserina-lactona. Per al tractament de la proteïna, es redissol a rao d'1mg/ml en àcid fòrmic al 70% i aquesta mostra es tracta amb 2 mg de BrCN en atmosfera reductora (fluxe de N₂) durant 24h a temperatura ambient. Una vegada transcorregut aquest interval, es dilueix fins a un 5% d'àcid fòrmic i es liofilitza la mostra. Per a la detecció dels pèptids obtinguts, es realitza una electroforesi en SDS i gradient de poliacrilamida, per tal de poder visualitzar en una longitud reduïda, un interval més ampli de pesos moleculars.

2.2.18. CROMATOGRAFIA EN PAPER.

El sistema de cromatografia en paper que s'ha utilitzat va ésser descrit per Laver (1974). El solvent de la cromatografia és la barreja alcohol isoamílic:piridina:aigua en proporció 35:35:30 (v), i la prova és ascendent, repetint dues vegades el mateix procés en la mateixa direcció. Com que els fulls de paper Whatman són de dimensions excessives per a ésser sotmesos a cromatografia estesos dins dels tancs de 30 x 30 x 30cm de que es disposava, el paper va ésser enrotllat com indica la figura. En el fons del tanc es procurava que l'alçada del solvent no sobrepassés mai 1cm. Si la cromatografia formava part del procés preparatiu, el full de paper es penjava d'un suport d'acer inoxidable, especialment dissenyat per a aquest ús. El temps de la prova era d'unes 9h (distància correguda pel front de 28cm), de manera que es donava per acabada quan el front arribava a 0.5cm del marge superior del paper.



2.2.19. ELECTROFORESI D' ALT VOLTATGE.

Per a la primera dimensió dels mapes peptídics, s'ha aplicat electroforesi d'alt voltatge (3000V) a pH 6.5. A aquest pH, hom obté una bona separació dels aminoàcids bàsics (histidina, arginina i lisina) i els aminoàcids (àcids cisteic, aspàrtic i glutàmic), mentre que el conjunt d'aminoàcids neutres, no carregat, es desplacen junts. Els pèptids es distribueixen segons la seva càrrega en un esquema paral·lel al mencionat. El tampó utilitzat per a l'electroforesi presentava la següent composició: piridina:àcid acètic:aigua (25:1:225, v) amb el pH ajustat a 6.5 amb piridina. Els tancs d'electroforesi s'acabaven d'omplir amb el dissolvent 150-200E de Campsa que formava una fase discontinua amb el tampó de la part inferior i oferia un medi inert per a la prova.

La mostra, dessecada, es redissolia en piridina al 50%, i era aplicada a un paper Whatman 3MM, de manera com més puntual millor. El punt d'aplicació de la mostra en el paper depèn del pH al qual es realitza l'electroforesi. A pH 6.5, s'aplica a 25cm de l'extrem que corres-



pondrà a l'ànode. Com a marcadors d'aquest sistema s'ha utilitzat el Xilen-Blue, l'Orange G i l' ϵ -DNP-lisina. Com a standards, ha emprat la barreja "Wondermix", de composició 5mM de lisina, histidina, arginina, glicina, valina, àcid cisteic, aspàrtic i glutàmic i DNP-lisina; 0.25 mg/ml de Xilen Blue i 10mg/ml d' Orange G. L'electroforesi s'aplicava durant aproximadament 1h, fins que l'Orange G havia corregut 15 cm cap a l'ànode.

2.2.20. SISTEMES DE DETECCIÓ DE PÈPTIDS.

S'han utilitzat dos sistemes de detecció de pèptids: la tinció per ninhidrina i la tinció per fluorescamina. També s'ha aplicat la tinció de Pauli com a detecció específica dels pèptids contenint histidina o tripsina.

Ninhidrina.

La tinció dels pèptids amb ninhidrina és una tinció inespecífica, que presenta l'inconvenient d'una sensibilitat no massa acusada. Hom ha utilitzat una solució de ninhidrina el 0.2% en acetona, a la qual s'afegeixen unes gotes de col.lidina:àcid acètic (1:2) per a fixar la coloració. El paper on s'ha realitzat l'electroforesi, un vegada sec, es submergeix en la preparació de ninhidrina i es deixa assecar a l'aire. Després s'escalfa durant 15-20min a 105°C, de manera que apareixen les taques dels aminoàcids o pèptids, cada un d'ells amb una tonalitat característica. Aquesta tinció és irreversible, de manera que no es poden recuperar els pèptids per a posterior caracterització.

Fluorescamina .

La fluorescamina és un compost que s'enllaça als grups amino lliures d'una aminoàcid o pèptid. Presenta una gran sensibilitat de detecció (1nmol de pèptid)

fet pel qual és molt més aconsellable que la ninhidrina. Hom prepara una dissolució de fluorescamina en acetona - 0.15 mg/ml-, en la qual se submergeix el mapa. Es deixa assecar a l'aire i els pèptids es detecten a la llum ultraviolada. Si hom desitja una posterior caracterització de l'extrem N-terminal dels pèptids després de la seva elució, s'ha de tenyir molt suaument-millor amb un spray- i deixar aparèixer el màxim de fluorescència unes hores més tard, per tal de conservar part del pèptid amb l'extrem amino no bloquejat.

Tinció de Pauli.

El sistema de tinció de Pauli (Dent, 1947) detecta pèptids que contenen histidina -coloració rosàcia- i que contenen tirosina -coloració marronosa-. Els reactius emprats són els següents:

solució I: Barreja d' iguals volums d'àcid sulfanílic a l'1% en HCl 1M i Na NO₂ al 5%. Conservar a la nevera una vegada preparada.

solució II: Solució de Na₂CO₃ al 15% p/v.

El mapa peptíctic es pulveritza successivament amb la solució I i la solució II. La tinció de Pauli és irreversible i es pot sobreposar a la de ninhidrina o fluorescamina.

2.2.21. MAPES PEPTÍDICS ANALÍTICS I PREPARATIUS.

Tant pels mapes analítics com preparatius, hom va seguir un mateix esquema:

1^a dimensió: electroforesi a 3000V, pH 6.5

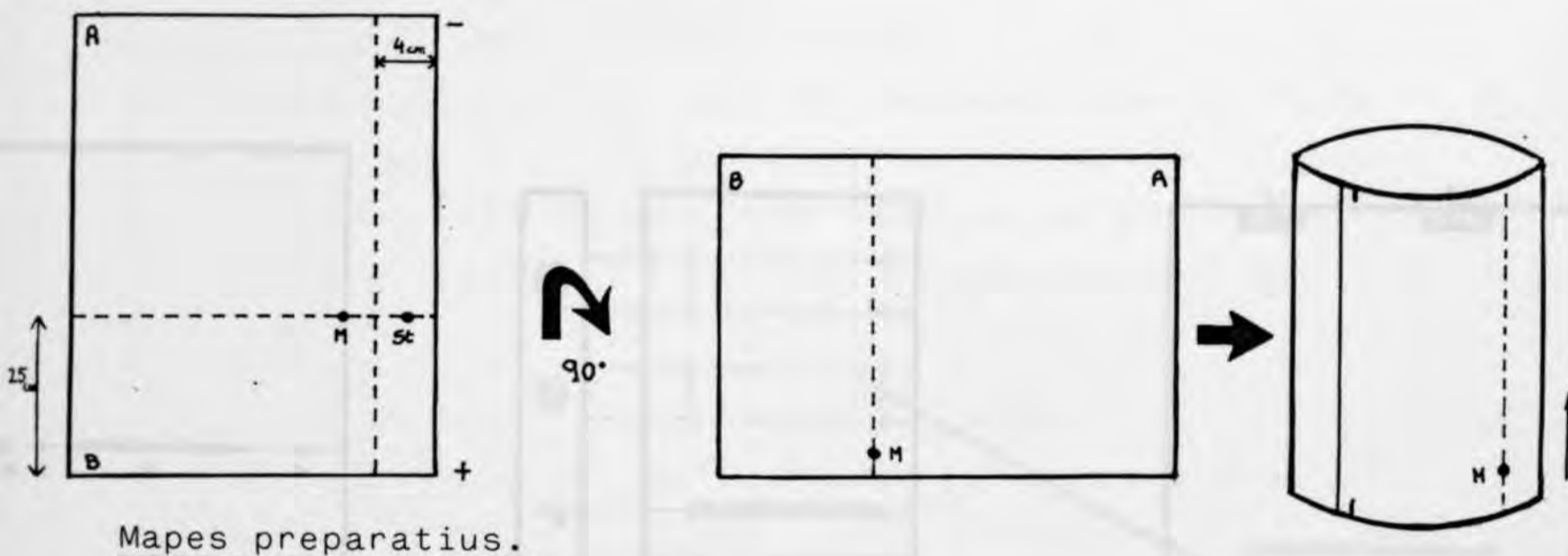
2^a dimensió: cromatografia ascendent, segons 2.2.18.

3^a dimensió: com 2^a.

Mapes analítics.

En els mapes analítics, la mostra consistent en la proteïna digerida, s'aplica en un full de paper Whatman 3MM (57cm x 46 cm), a 15 cm de l'ànode i a pocs cm d'un

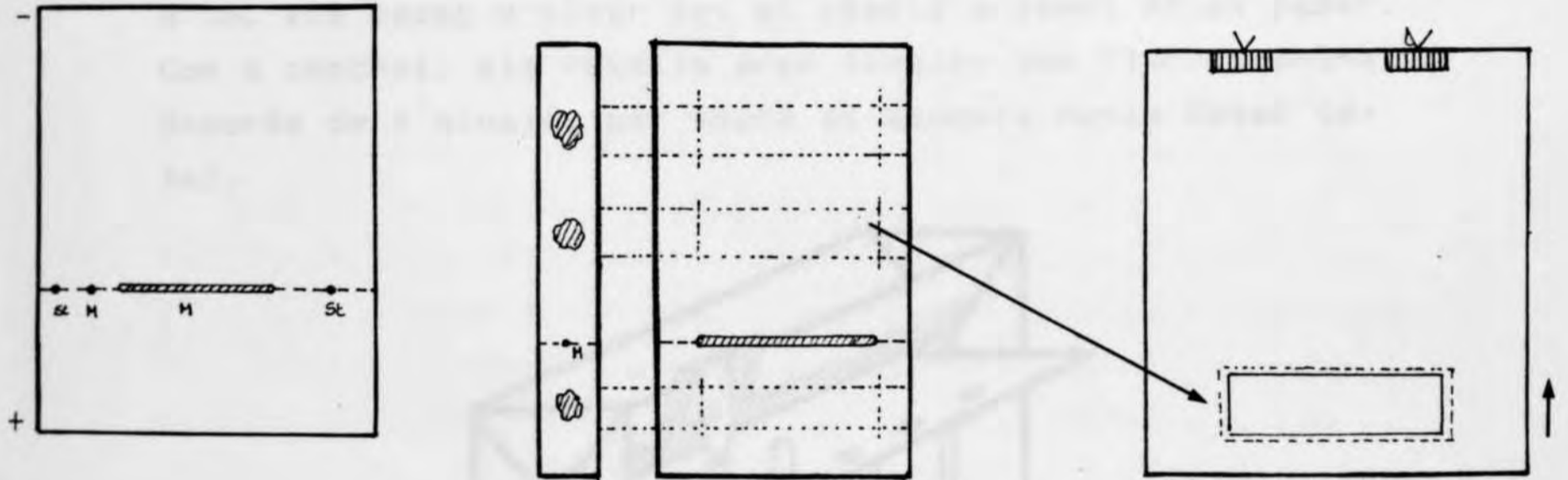
dels marges del paper (vegeu esquema). Una vegada acabada l'electroforesi, es retalla i tenyeix una tira que compregui els standards, per a tenir una idea i referència de com ha corregut l'electroforesi. La resta del full es gira 90° es cargola sobre si mateixa, fixant-la amb clips, i es sotmet a dues tandes de cromatografia ascendent. Els pèptids es detecten per fluorescamina a U.V., i s'aplica després una tinció de Pauli.



Una vegada caracteritzat cada pèptid a partir dels mapes analítics es procedeix a fer mapes preparatius amb la totalitat de la proteïna digerida amb tripsina. Aquest procés té com a finalitat l'obtenció de cada un dels pèptids en estat pur.

Per a l'electroforesi, s'aplica a banda i banda d'un paper Whatman 3MM, una mostra d'standards de referència, en un dels extrems una mostra puntual del digerit tríptic, i en la part central del full, la totalitat de la mostra, procurant que no formi una banda que excedeixi els 0.5cm de gruix (s'han de fer aplicacions successives, deixant assecar la mostra entre una i altra). Es corre l'electroforesi com en el cas analític. Es tenyeix la tira dels standards i la tira de la mostra puntual. Amb aquesta referència es determina l'emplaçament de cada pèptid en la part preparativa, i es retalla la tira corresponent. Per a córrer les 2^a i 3^a dimensions, s'ha de cosir cada una d'aquestes tires en un full de paper Whatman de dimensions adequades al tanc de cromatografia. Des-

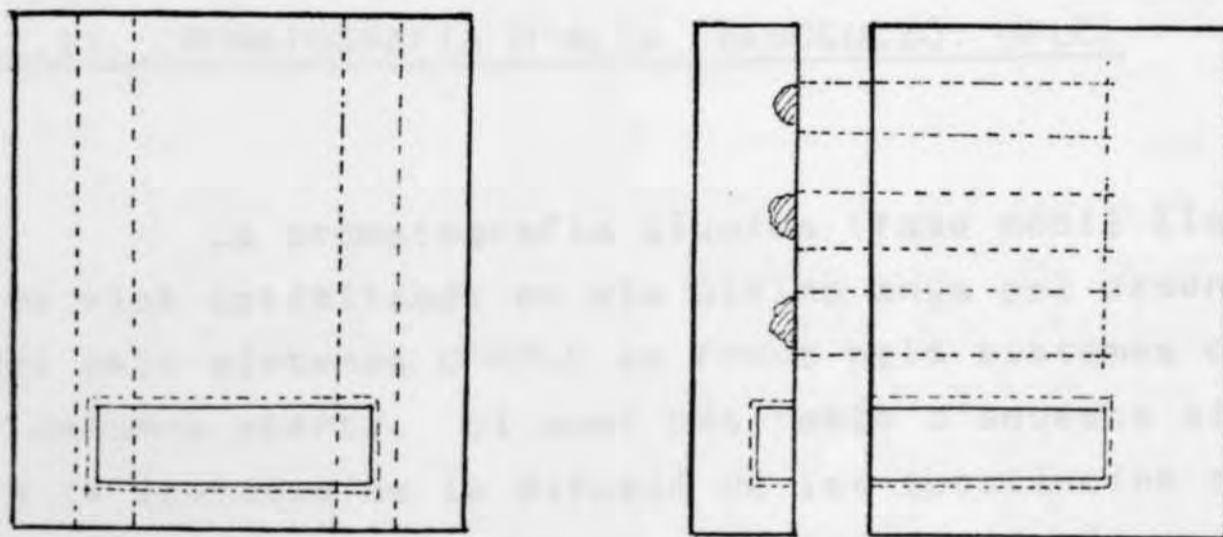
prés de la cromatografia, es retalla cada un dels extrems per on ha corregut la mostra per tenyir-lo i localitzar els pèptids corresponents. Es retalla cada una de les tires on s'ha localitzat pèptid i es procedeix a la seva elució.



ELECTROFORESI pH 6.5

DETECCIÓ

COSIT EN UN FULL NOU

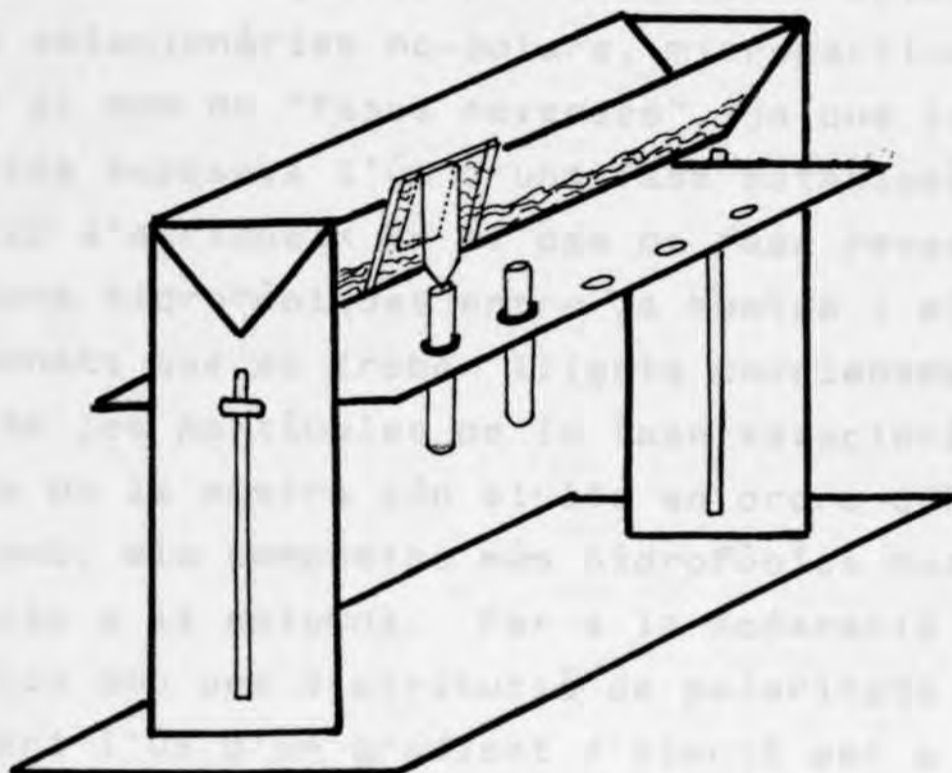


CROMATOGRAFIA

DETECCIÓ

2.2.22. ELUCIÓ DE PÈPTIDS.

Una vegada localitzat un pèptid sobre el paper, es pot recuperar sotmetent-lo a elució amb un solvent adequat. El sistema emprat en aquest treball es basa en el mètode de Ingram (1963) i es pot veure il·lustrat més avall. Hom va treballar amb els següents solvents: amoníac 0.1N, àcid acètic al 10% i piridina al 50%, segons dificultat creixent de solubilitat. Es va considerar que un volum d'1ml era capaç d'eluir tot el pèptid present en el paper. Com a control, els retalls eren tenyits amb fluorescamina després de l'elució, per veure si aquesta havia estat total.



2.2.23. CROMATOGRÀFIA D'ALTA RESOLUCIÓ: HPLC.

La cromatografia líquida (fase mòbil líquida) s'ha vist optimitzada en els últims anys pel desenvolupament dels sistemes d'HPLC en front dels sistemes clàssics de columna oberta. El punt més feble d'aquests sistemes era la lentitud de la difusió de les substàncies en la fase líquida, que retardava molt tot el procés i suposava moltes vegades un nivell molt baix de resolució en les preparacions i recuperacions de les mostres. El desenvolupament de la cromatografia líquida passava per la utilització de partícules de gel de diàmetre més reduït

fet que comportava automàticament una elevació de les pressions de la columna i una reducció del caudal a través del sistema. A la vegada, es necessitaven detectors capaços de treballar amb volums mínims de mostra. Totes aquestes qüestions varen quedar resoltes amb l'establiment de les tècniques d'HPLC, caracteritzades per:

- columnes de mida reduïda: diàmetre de 2 a 5mm i longitud de 5 a 50 cm.
- partícules de diàmetre de 5 a 50 μm .
- pressions d'entrada elevades
- fluxe controlat de la fase mòbil.

Ja des dels primers anys, l'HPLC va ésser aplicada també a la separació de proteïnes i pèptids. Per a aquest tipus de mostra, la bibliografia presenta com a òptim l'ús de les fases estacionàries no-polars, microparticulades, que han rebut el nom de "fases reverses", ja que la cromatografia clàssica suposava l'ús d'una fase estacionària polar. La retenció s'atribueix en el cas de fase reversa a les interaccions hidrofòbiques entre la mostra i els radicals hidrocarbonats que es troben lligats covalentment a la superfície de les partícules de la fase estacionària. Els components de la mostra són eluits en ordre d'hidrofobicitat creixent: els compostos més hidrofòbics mostren major afinitat cap a la columna. Per a la separació de pèptids i aminoàcids amb una distribució de polaritats molt àmplia és necessari l'ús d'un gradient d'elució per a optimitzar la separació, on la polaritat/apolaritat de la fase mòbil variï paral·lelament amb el contingut de solvent inorgànic/orgànic de l'eluent. En la cromatografia de fase reversa, l'eluent més comunament utilitzat és una barreja de dissolvent apolar (acetonitril, metanol,...) en aigua, la qual actua com a dissolvent polar. Ja que els compostos queden units a la columna per la seva hidrofobicitat, en augmentar el percentatge de fase orgànica (apolar), es disminuiran els temps de retenció. L'elecció del component apolar de la fase mòbil depèn de diversos criteris, com poden ésser la solubilitat de la mostra, la viscositat de la fase

mòbil o la longitud d'ona a la qual ha de treballar el detector. Si hom ha de treballar a un espectre d'U.V. menor a 230nm, s'ha de triar un compost que no absorbeixi a aquesta longitud d'ona, ja que, d'altra manera, en eluir amb gradient, la deriva de la línia de base seria excessiva -com succeix amb el metanol-. Com que les longituds d'ona aconsellables per a la detecció de pèptids són precisament aquestes, hom va treballar amb acetonitril, invisible fins i tot a 210nm, i preferible també per la seva baixa viscositat, la qual cosa permet de treballar a pressions de cap de columna més baixes i optimitzar així la resolució. Normalment, també és aconsellable disminuir el grau d'ionització que puguin presentar les mostres hidrosolubles, ja que aquestes càrregues suposarien cues en els pics d'elució dels compostos corresponents. Això s'aconsegueix amb l'addició d'una petita quantitat d'un àcid (àcid acètic o trifluoracètic, perclòric o fosfòric) al solvent polar -concentració no superior a l'1%-.

Descripció de l'equip utilitzat.

L'equip d'HPLC utilitzat era un Series 2 Liquid Chromatograph, Perkin Elmer. Consta de dues bombes excèntriques d'alta pressió, un sistema de gradients lineals programables d'elució i un sistema de regulació de fluxe a entrada de columna. L'equip es completa amb :

- forn de columna LC 100 Column Oven
- espectrofotòmetre visible-U.V. LC 75
- registrador-integrador Sigma 15 (Data System).

La columna utilitzada era una C-8, de fase reversa, on les partícules que formen la matriu eren de 10 μm (partícules de sílica amb grups funcionals octacarbonats) i de dimensions 25 cm de longitud i 4.6mm de \varnothing -analítica-.

Les condicions de la cromatografia varen ésser:

Fluxe de columna: 1.5ml/min

Temperatura : 20°C

Detecció : 230nm

Dissolvent I : Aigua+0.05% d'àcid trifluoracètic.

Dissolvent II: Acetonitril.

Gradient de 10% d'I a 80% de I en temps variables.

Les mostres varen ésser dissoltes en acetonitril al 20% en H₂O-TFA 0.05% (2 µl), i en el moment de la seva recollida, que es feia manual a la sortida del detector, es neutralitzava amb amoníac 0.1N de pH 7.0.

Hom no fa aquí cap consideració als mètodes d'anàlisi quantitativa en HPLC, ja que els presents estudis s'han centrat només en la separació i identificació qualitativa dels pèptids.

2.2.24. CROMATOGRAFIA DE GASOS.

La cromatografia de gaos és una tècnica de separació de compostos gasosos que data de 1905 (Ramsey). Es basa en la distribució de la mostra entre dues fases, una de les quals, l'estacionària, ofereix una gran superfície al llarg de la qual es fracciona la mostra, que viatja com a fase gasosa i mòbil. La fase estacionària pot ésser líquida (cromatografia gas-líquid) o sòlida (cromatografia gas-sòlid). Encara que aquesta darrera va ésser la primera en la història, diversos avenços han fet que la cromatografia de gasos -gas-líquid- imposés el seu ús en una multiplicitat d'aplicacions. En aquest cas, la fase estacionària està estesa com una capa molt fina sobre un suport inert sòlid, i la base de la separació és el coeficient de repartició de cada component en aquest líquid, fet que es tradueix en diferents temps d'expulsió de la columna, o sia, diferents temps de retenció. Aquest és el paràmetre que caracteritza cada un dels compostos d'un cromatograma.

Un sistema bàsic de cromatografia de gasos consta de:

- un gas inert, transportador de la fase mòbil
- un sistema d'injecció de mostra
- una columna de separació
- un sistema de detecció-registre.

Tant l'injector com la columna i el detector estan termos-tats a voluntat. Per aconseguir una bona separació de components i resposta del sistema, hom pot modificar diferents variables de cada un dels components esmentats. Es detalla resumidament a continuació quines són les condicions emprades en aquest treball.

Gas transportador:

El gas emprat ha d'ésser inert respecte als components de la mostra, de baixa difusió gasosa i que no causi interferències en el sistema de detecció. Encara que la velocitat del gas transportador pot ésser variada a voluntat, i de fet, és una de les variables a considerar, cada tipus de columna comptarà amb un òptim de rendiment. En el present cas s'ha utilitzat N_2 com a gas propulsor, a una velocitat de 30 ml/min.

Sistema d'injecció de mostra:

Es poden diferenciar dos tipus de cromatografia de gasos segons el mètode de tractament i injecció de la mostra. En cromatografia de gasos tradicional, hom introdueix un volum conegut de mostra, en estat líquid, mitjançant una microxeringa. En el mateix instant de la injecció, es produeix la vaporització de les substàncies, a una temperatura controlada (i variable) i aquestes entren immediatament i progressiva en la columna de separació. En el mètode de cromatografia de gasos per Head Space (HS, o espai de "cap") hom no quantifica el total de la mostra vaporitzada, sinó que s'analitza la fase gasosa que, a una determinada temperatura es troba en equi-

libri amb la mostra -líquida o sòlida-i només és aquesta fase gasosa que penetra en la columna de detecció. La base d'aquest tipus d'anàlisi és la següent: Hom introdueix la mostra en un recipient hermètic, normalment un vial tapat amb un sèptum perforable. El volum d'aquest recipient no ha d'ésser excessiu respecte el de la mostra, ja que això podria suposar la seva total evaporació, i també augmentaria molt els temps de pressurització i anàlisi. El recipient es sotmet a una temperatura constant, controlable. Hom assumeix que, per una temperatura determinada i en condicions constants, la fase gasosa d'un component de la mostra en equilibri amb la seva fase líquida o sòlida és també constant. Una vegada escalfada la mostra, hom la sotmet a "pressurització", és a dir, s'introdueix el gas transportador en el vial durant un temps també controlat. Gràcies a això, quan s'obre la vàlvula d'accés a la columna, la fase gasosa de la mostra hi penetra en un interval de temps molt reduït. A partir d'aquest punt, el sistema de cromatografia per HS coincideix amb el de la cromatografia clàssica per injecció.

El sistema per HS comporta dos avantatges fonamentals. Un és la major precisió i rapidesa en la detecció, ja que la mostra ateny el cap de columna en un mateix instant i en la seva totalitat, mentre que en el sistema clàssic l'entrada és progressiva, d'acord amb el front del gas propulsor. L'altre avantatge és bàsicament metodològic i fa referència a la possibilitat d'anàlisi de mostres sense haver de recórrer a cap tipus de tractament d'extracció, que de vegades podria suposar un procés molt llarg i complex, i potser i tot resultaria impossible si les quantitats de productes a quantificar es troben a nivells molt baixos en la mostra problema. Altres casos d'aplicació ideal del HS són aquelles mostres que es descomponen a la temperatura d'injecció, o bé, que donarien productes de dissociació que no eren presents originàriament.

En el nostre cas, la disponibilitat d'ús d'un cromatógraf Perkin-Elmer-Head-Space ha permès l'anàlisi directa de mostres consistents en:

- homogenat d'individus de Drosophila
- cel·luloses empapades en solucions de diferents alcohols que serveixen de medi nutritiu a les mosques.

Les condicions experimentals amb què es treballava eren de 60°C de temperatura de pressurització i 150°C de temperatura d'injecció.

Columna de separació:

Existeixen actualment en el mercat infinitat de columnes de cromatografia de gasos, farcides amb diferents materials per optimitzar l'anàlisi de qualsevol tipus de substàncies. Les columnes són d'acer inoxidable, empaquetades de forma enrotllada per permetre grans longituds de fase estacionària. La temperatura a la qual hom treballa ve fixada, dins d'uns límits òptims, pel tipus de suport sòlid i la fase estacionària propis de la columna. Hom pot treballar a temperatura constant o efectuar un programa de variacions de temperatura al llarg del temps d'anàlisi, fet que pot millorar notablement la resolució dels pics més tardans. En el nostre cas s'ha treballat amb una columna CARBOWAX 1500, a temperatura de 75°C. El Carbowax és un polímer tipus $\text{OH}(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n\text{H}$ de naturalesa polar, amb una temperatura màxima de treball de 200°C.

Detector:

Hi ha també diferents tipus de detector. En el present cas s'ha treballat amb un detector de tipus FID (flame ionization detector) o detector d'ionització de flama. El FID es basa en el fet que la conductivitat elèctrica d'un gas és directament proporcional a la concentració de partícules carregades en el gas. El gas que flueix de la columna és barrejat amb H_2 i és cremat en una atmosfera d' O_2 o d'aire. Els ions i electrons formats en la

flama rebaixen la resistència total entre els electrodes de detecció, i això és registrat mitjançant un amplificador de senyal degudament acoplat al circuit de detecció. En el nostre cas, els fluxes d'aire i hidrogen eren de 35 i 20ml/min respectivament, i la temperatura de detecció de 150°C.

Quadre resum de les condicions d'anàlisi.

Columna	:	Carbowax 1500
Temp. pressurització mostra:	:	60°C
Temps de pressurització	:	4 min
Temp. d'injecció	:	150°C
Temp. de columna	:	75°C
Temp. de detecció	:	150°C
Fluxes		
N ₂	:	30 ml/min
H ₂	:	20 ml/min
aire	:	35 ml/min

Tractament de la mostra:

El tractament de la mostra i la seva conservació fins el moment de l'anàlisi és molt important en la cromatografia de gasos, ja que s'acostuma a treballar amb components molt volàtils i una mala manipulació alteraria significativament els resultats. Hom ha de tenir molta cura amb el tractament hermètic dels vials de mostra, ja que seran sotmesos a pressions considerables. En el nostre cas, totes les mostres eren manipulades a 4°C, per tal de minimitzar l'evaporació al màxim. Les cel.luloses que havien servit de suport a les dissolucions d'alcohols i exposades a l'acció de les mosques dins de tubs d'experimentació eren introduïdes directament en vials de C.G. tot afegint 0.2ml de tert-butanol 1%, usat com a standard intern. En el cas d'homogenat d'individus, una quantitat de 0.5ml s'introduïa en el vial i s'hi afegien 0.1ml de tert-butanol 1%. Els vials eren tancats immediatament i conservats a -40° fins al moment de l'anàlisi.

Quantificació dels resultats.

Hi ha quatre possibles mètodes de quantificació en les anàlisis per cromatografia de gasos:

- (1) per normalització d'àrea
- (2) per correcció d'àrea (standard extern)
- (3) per calibració absoluta
- (4) per calibració indirecta (standard intern)

En el nostre cas, s'han realitzat les anàlisis en presència d'un standard intern. Aquest mètode simplifica els treballs ja que no són necessàries quantitats constants de mostres, i variacions en la sensibilitat de l'aparell no alteren els resultats. Com ja s'ha indicat, l'standard intern usat ha estat el tert-butanol, ja que compleix els requisits d'un bon standard intern:

- (i) no presenta interferència d'elució amb d'altres pics de la mostra.
- (ii) s'elueix en la mateixa zona del cromatograma que els pics interessants
- (iii) és present en la mostra a una concentració similar a la dels problemes
- (iv) és inert respecte els productes de la mostra

Bases de quantificació :

En l'anàlisi cromatogràfica per Head Space, hom mesura l'àrea del pic del registrador, i s'assumeix que és proporcional a la pressió parcial de vapor (p_i) d'aquell component en la mostra.

$$A_i \sim p_i \quad \text{-----} \quad A_i = k p_i$$

En un sistema de mescla ideal de gasos, la fórmula seguiria la llei de Raoult:

$$p_i = p_{oi} x_i$$

p_{oi} és la pressió de vapor del component i pur

x_i és la fracció molar del component i en la barreja

però en un sistema real:

$$p_i = p_{oi} x_i \gamma_i$$

on γ_i és un factor modificador que indica la desviació respecte la llei de Raoult. Aquest coeficient no només depèn de la natura del component (i) i d'altres components de la barreja, sinó també de les fraccions molars de tots ells. En menor extensió, depèn també de la temperatura i de la pressió a la qual s'efectua l'anàlisi. En condicions de baixa concentració de components, com les que acostumen a ésser de treball en C.G., γ_i és constant i per tant el producte $k p_{oi} \gamma_i$ també ho és. Per tal de conèixer aquest factor de proporcionalitat, hom construeix una corba de calibrat àrea pic i / àrea pic st contra concentració de i / concentració de st . i s'observa la regió de linearitat de la resposta del detector. A partir del que s'ha indicat, hom conclou que:

$$x_i = \frac{A_i}{k p_{oi} \gamma_i} \quad x_i = K A_i$$

on K és constant, i inclou la pressió parcial del gas pur (p_{oi}) i el factor modificador γ_i . Hom conclou, doncs que la resposta del detector varia en proporció directa a la concentració de i . Per tant, les concentracions dels components en la mostra standard han d'ésser tals que es mantinguin dins de la zona de resposta lineal del detector.

Per a la quantificació directa del component aplicarem la fórmula següent:

$$C_i = K \frac{RF_i A_i P_s}{RF_{st} A_{st} P}$$

K és un factor de conversió d'unitats. Si $K=1$, les unitats de C_i seran les mateixes amb què expressem la concentració o quantitat d'standard intern.

RF_i és el factor de resposta del component i

RF_{st} és el factor de resposta de l'standard (1)

A_i és l'àrea pel component i

A_{st} és l'àrea de l'standard intern

P_s és la quantitat o concentració d'standard intern

P és la quantitat de la mostra

Així doncs:

$$C_i = \frac{RF_i \cdot A_i}{A_{st}} \cdot \frac{P_{st}}{P}$$

Si coneixem la concentració d'standard intern, la fórmula es simplifica a

$$C_i = \frac{RF_i \cdot A_i}{A_{st}} \cdot C_{st}$$

i C_i ve donat en els mateixos termes de concentració que C_{st} . Si es coneix el pes o volum de l'standard intern, hom pot usar la fórmula en forma primitiva.

Els càlculs dels factors de resposta a partir de mostres d'standards segueixen les fórmules:

$$RF_i = \frac{[i]}{A_i} \cdot \frac{A_{st}}{st} \cdot RF_{st} \quad \text{com } RF_{st} = 1$$

$$RF_i = \frac{[i]}{A_i} \cdot \frac{A_{st}}{st}$$

Si els components de l'standard estan en la mateixa concentració, el càlcul es simplifica a

$$RF_i = \frac{A_{st}}{A_i}$$

En l'esquema 2.3. hom pot apreciar el funcionament bàsic d'un cromatògraf de "Head Space".

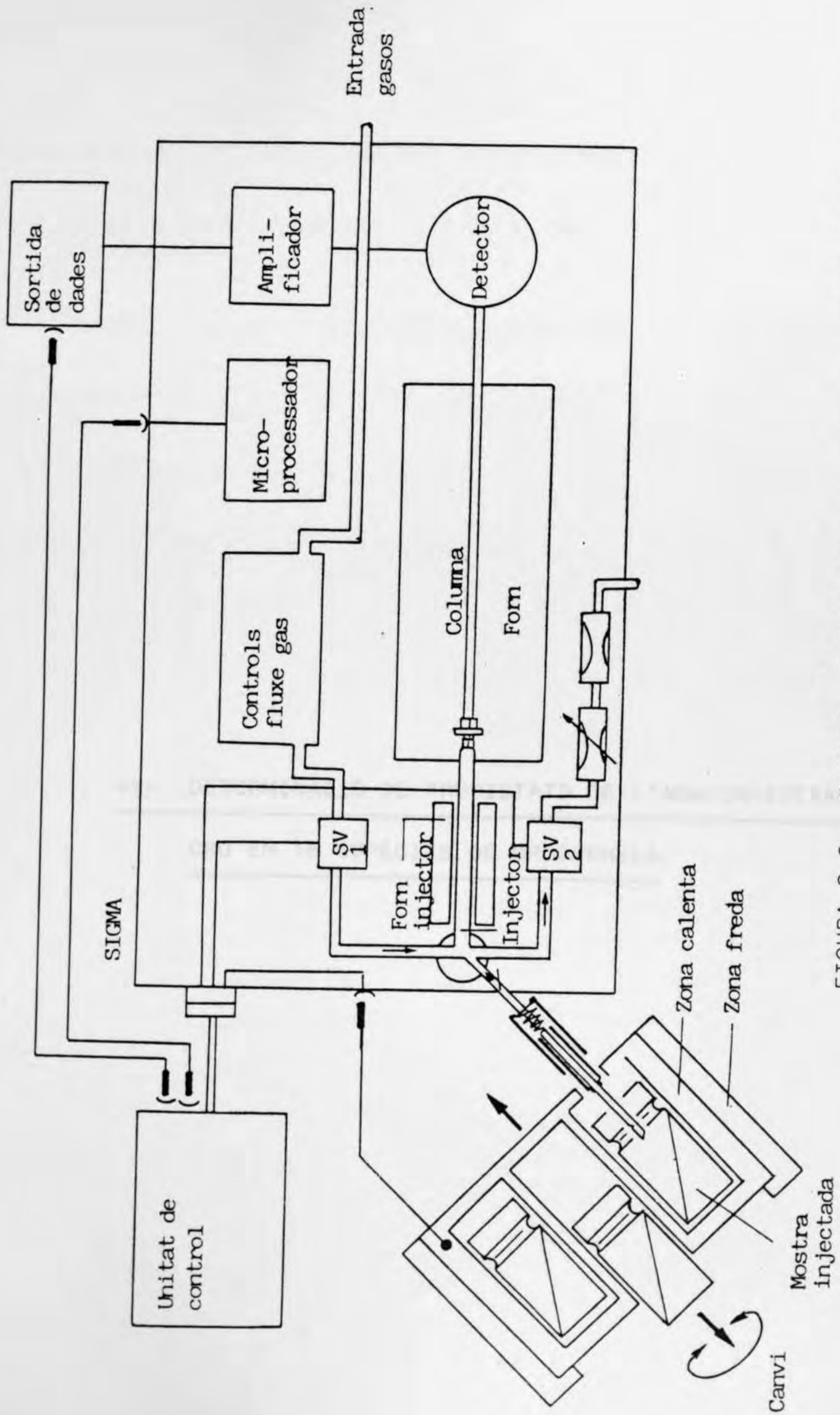


FIGURA 2.3. Esquema de funcionament d'un Cromatògraf de Gasos per Head Space. (Perkin-Elmer).

3. ESTUDIS EN EXTRACTE CRU DE LES PROPIETATS DE L'ADH EN
16 ESPÉCIES DE DROSOPHILA.

3.1. ACTIVITAT ADH AL LLARG DEL CICLE VITAL.

3.2. DETERMINACIÓ DE LA DOSI LETAL 50 PER A ETANOL I
ISOPROPANOL.

3.3. ESTABILITAT DE L'ENZIM EN EXTRACTE CRU.

3.4. DETERMINACIÓ DEL pH ÒPTIM DE L'ENZIM.

3.5. PUNT ISOLÈCTRIC DE L'ENZIM.

3.6. PES MOLECULAR DE L'ENZIM NATIU.

-3-. DETERMINACIÓ DE PROPIETATS DE L'ADH EN EXTRACTE
CRU EN 16 ESPÉCIES DE DROSOPHILA.

3. ESTUDIS EN EXTRACTE CRU DE LES PROPIETATS DE L'ADH EN 16 ESPÈCIES DE DROSOPHILA.

3.1. ACTIVITAT ADH AL LLARG DEL CICLE VITAL

3.2. DETERMINACIÓ DE LA DOSI LETAL 50 PER A ETANOL I ISOPROPANOL.

3.3. ESTABILITAT DE L'ENZIM EN EXTRACTE CRU.

3.4. DETERMINACIÓ DEL pH ÒPTIM DE L'ENZIM.

3.5. PUNT ISOELÈCTRIC DE L'ENZIM.

3.6. PES MOLECULAR DE L'ENZIM NADIU.

3.1. ACTIVITAT ADH AL LLARG DEL CICLE VITAL.

Per a dur a terme aquestes determinacions, es varen sembrar ous de cada una de les espècies (~100 ous per pot), en flascons amb menjar suplementat amb extracte de llevat liofilitzat, per evitar interferències de l'enzim ADH d'aquests microorganismes; (2ml de solució de 0.2g/ml per flascó). Els cultius es mantienien a 17°C.

Els moments de presa de mostres es varen determinar de la següent manera:

- larves , larves de tercer estadi del desenvolupament quan en el pot ja han aparegut les primeres pupes.
- pupes, pupes en forma de "pupa fosca", en el punt intermig d'aquest període del desenvolupament.
- adults, adults després de tres o quatre dies de l'emergència, quan segons Dunn(1969) presenten el màxim d'activitat d'aquest període.

Els individus s'homogenitzaren en tampó Tris-HCl, 20mM, pH 8.6, seguint un factor de dilució constant. Hom afegia una solució de sulfat de protamina al 2%, a raó de 14ml/100ml de mostra i es centrifugava 25000g durant 20min. Les lectures espectrofotomètriques d'activitat es realitzaren a 340nm amb el sobrenedant obtingut de la centrifugació esmentada. Els resultats es poden observar en la taula 3.1. i en les gràfiques 3.1(a, b i c)

D'entre les 15 espècies estudiades , 6 mostren l'anomenat model en U -dos màxims d'activitat, un en estadi larvari i l'altre en estadi adult-; i la resta tenen només un màxim en la larva de tercer estadi. D.hydei, D. willistoni, D. erecta, D. burlai, D. teissieri i D. yakuba pertanyen al primer grup esmentat, seguint l'esque-

<u>ESPÈCIES</u>	ACTIVITAT ENZIMÀTICA (U/ml)		
	LARVA	PUPA	ADULT
<u>D.hydei</u>	425.7	228.3	455.4
<u>D.subobscura</u>	415.8	232.2	125.7
<u>D.guanche</u>	415.8	319.2	232.2
<u>D.littoralis</u>	144.9	135.3	39.3
<u>D.pavani</u>	289.8	231.0	123.0
<u>D.gauchia</u>	297.0	223.0	150.0
<u>D.phalerata</u>	73.5	34.5	144.5
<u>D.willistoni</u>	154.8	116.1	193.8
<u>D.kikkawai</u>	143.7	77.1	56.7
<u>D.mauritiana</u>	304.8	163.8	164.4
<u>D.yakuba</u>	270.9	87.0	135.3
<u>D.erecta</u>	92.7	114.0	208.2
<u>D.burlai</u>	154.8	104.4	153.0
<u>D.greeni</u>	241.8	186.9	54.0
<u>D.teissieri</u>	200.1	164.4	251.4
<u>D.bocqueti</u>	187.5	97.8	51.0

TAULA 3.1. Activitat enzimàtica de l'ADH en cada un dels estadis del desenvolupament ,per a cada espècie. (Valors reals x 10³)

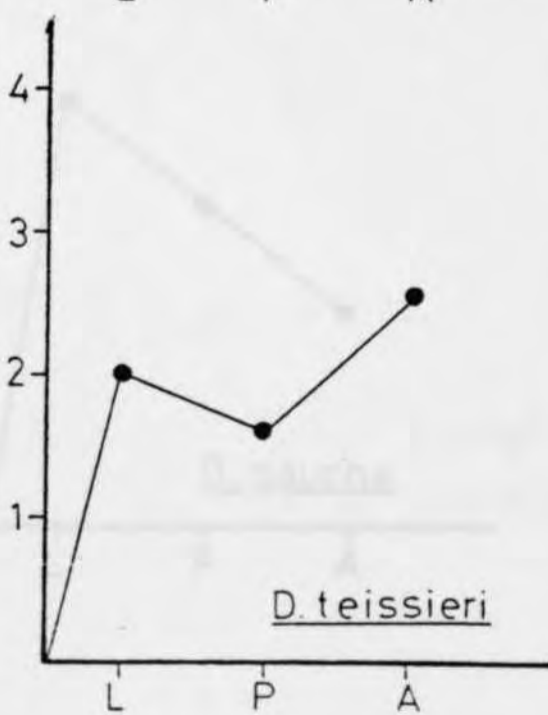
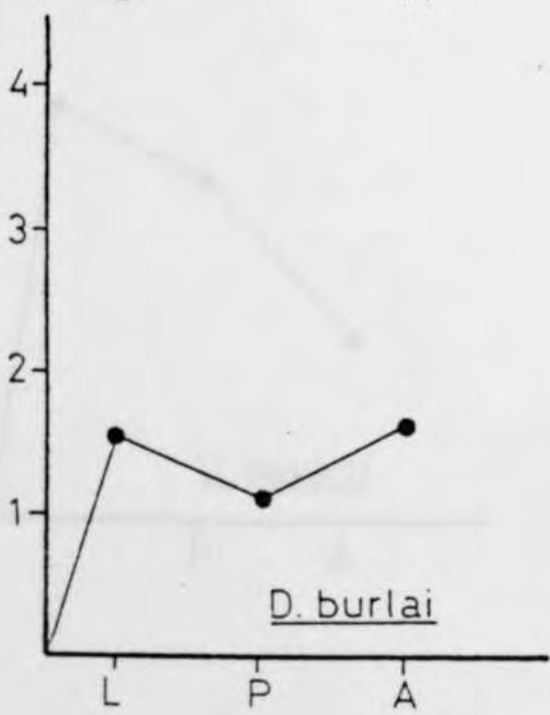
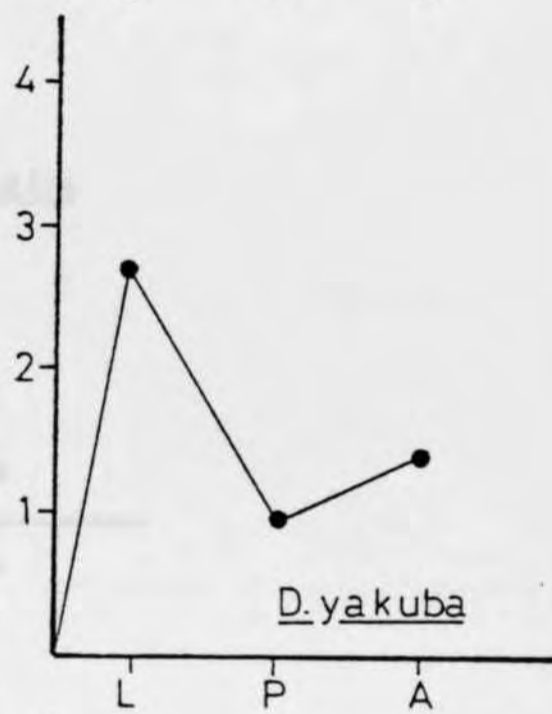
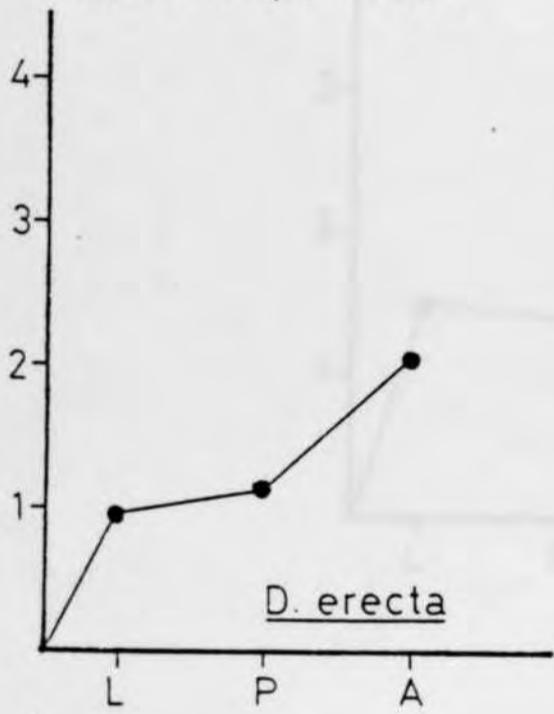
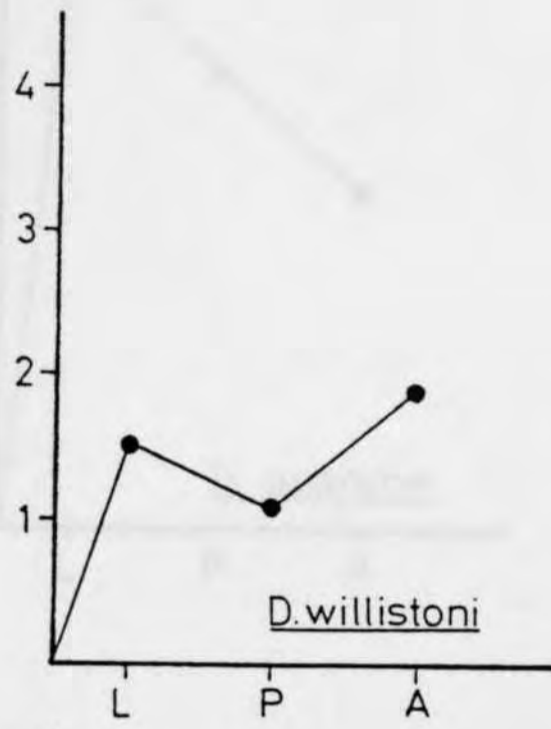
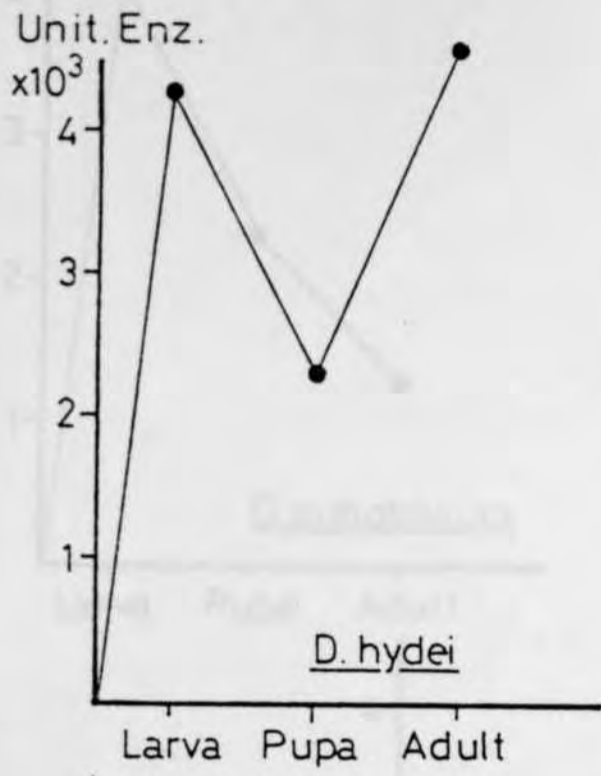


FIGURA 3.1. (a)

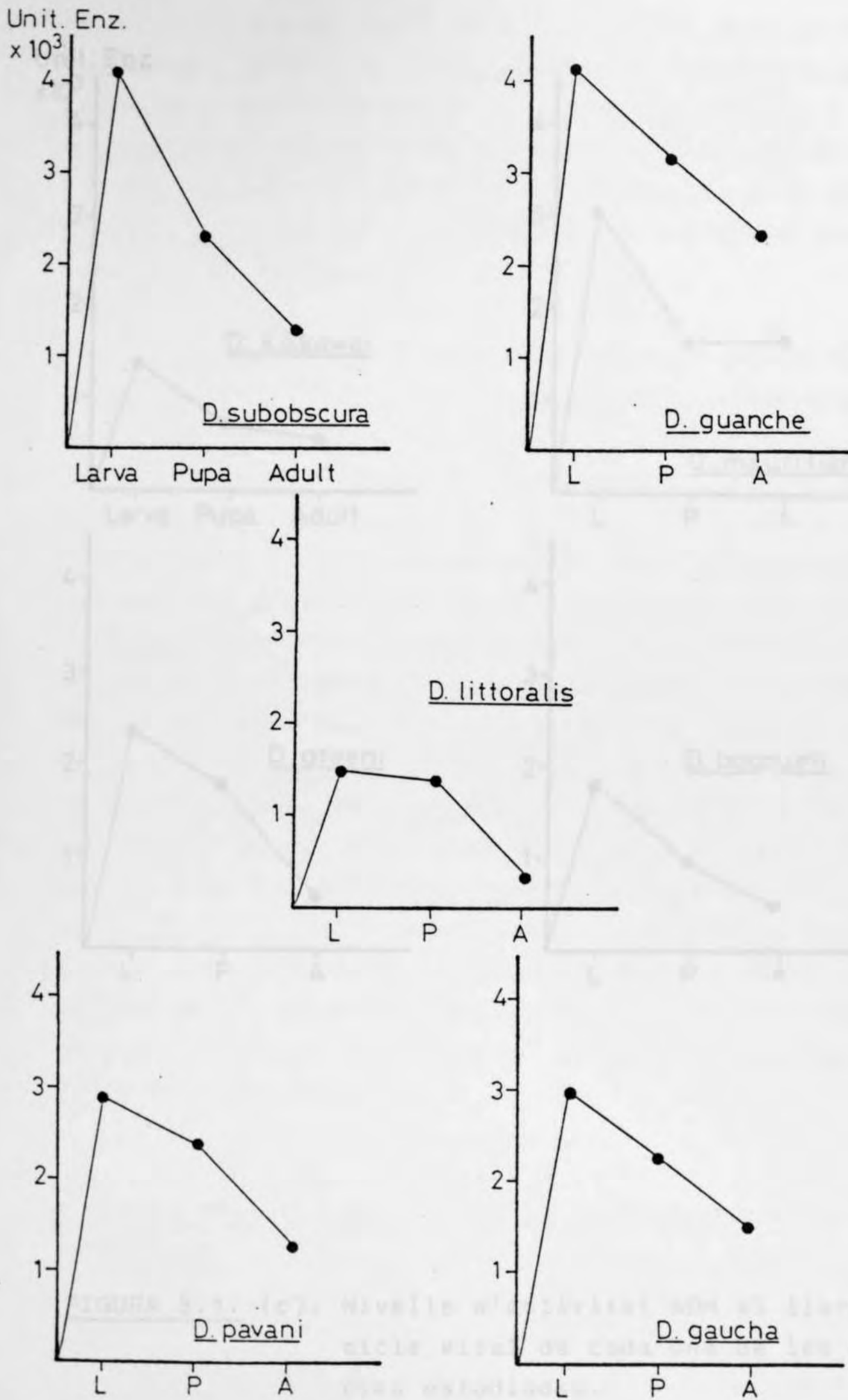


FIGURA 3.1. (b).

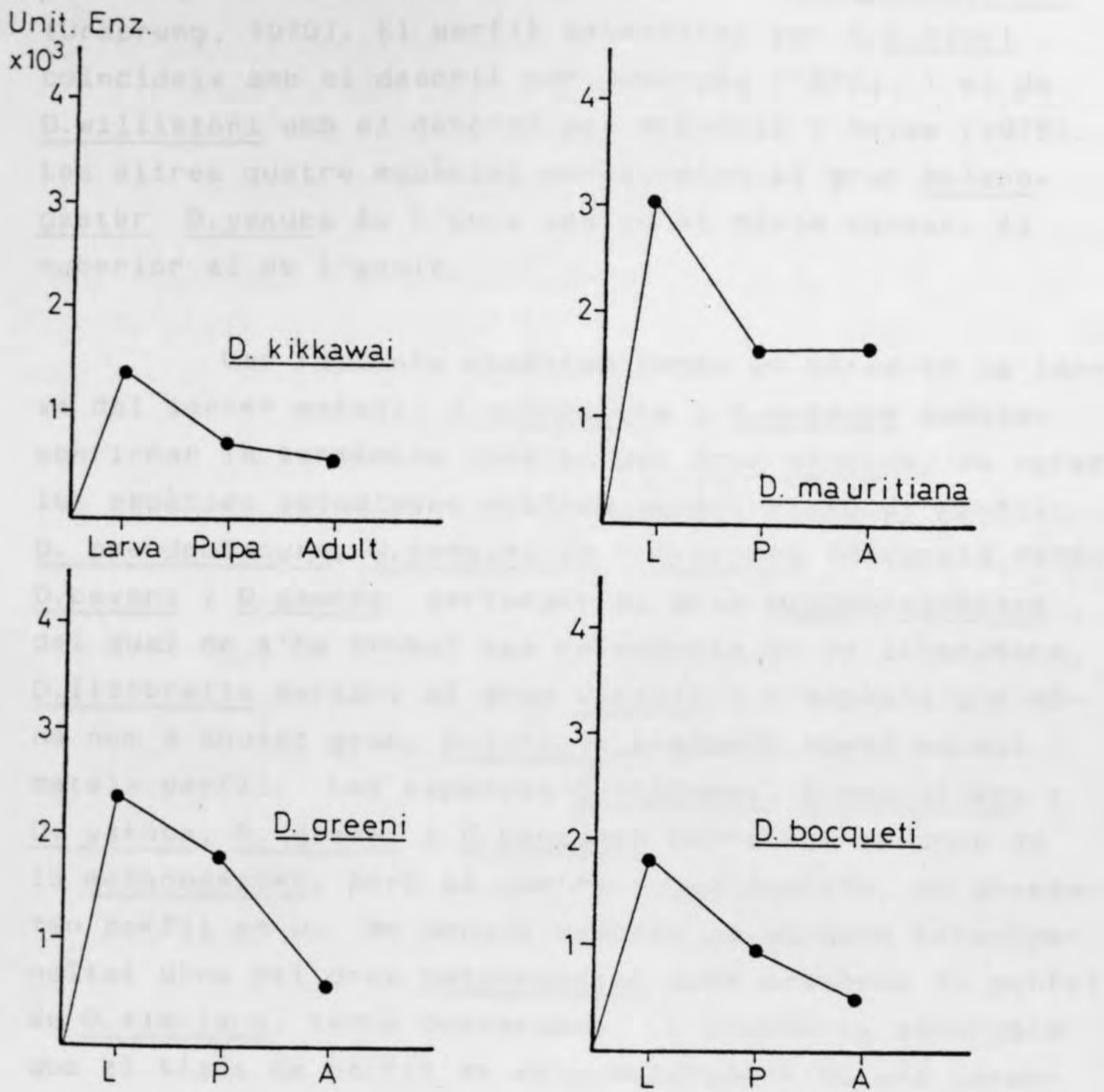


FIGURA 3.1. (c). Nivells d'activitat ADH al llarg del cycle vital de cada una de les espècies estudiades.

L=larva 3r estadi
P=pupa
A=adults (3-4 dies).

ma en U, semblant també al de l'espècie D.melanogaster. (Ursprung, 1970). El perfil determinat per a D.hydei coincideix amb el descrit per Imbersky (1972), i el de D.willistoni amb el descrit per McDonald i Avise (1976). Les altres quatre espècies corresponen al grup melanogaster D.yakuba és l'únic cas on el màxim larvari és superior al de l'adult.

Les restants espècies tenen un màxim en la larva del tercer estadi. D.subobscura i D.guanche semblen confirmar la tendència general del grup obscura, on totes les espècies estudiades mostren aquest tipus de perfil: D.pseudoobscura, D.persimilis i D.azteca (McDonald, 1976) D.pavani i D.gaucha pertanyen al grup mesophragmàtica, del qual no s'ha trobat cap referència en la literatura. D.littoralis pertany al grup virilis i l'espècie que dona nom a aquest grup, D.virilis, presenta també aquest mateix perfil. Les espècies D.kikkawai, D.mauritiana i D.yakuba, D.greeni i D.bocqueti pertanyen al grup de la melanogaster, però al contrari que aquesta, no presenten perfil en U. Mc Donald descriu ja aquesta heterogeneïtat dins del grup melanogaster quan presenta el perfil de D.simulans, també descendent. L'evidència assenyala que el tipus de perfil de desenvolupament és una característica del grup filogenètic al qual pertany cada espècie, i només en la radiació del grup melanogaster s'hi observen diferències.

3.2. DETERMINACIÓ DE LA DOSI LETAL 50 PER A ETANOL I ISOPROPANOL.

La taxa de mortalitat enfront de l'etanol i de l'isopropanol varen ésser determinades segons una modificació del mètode descrit per David (1974).

La tolerància va ésser determinada en individus adults (3 o 4 dies) de cada una de les espècies. Un nombre determinat d'ous (100 ous/pot) es sembraven en medi suplementat amb extracte de llevat liofilitzat. Quan emergien els adults, eren traspassats a medi fresc per tal de tenir individus ben nodrits abans d'exposar-los a l'alcohol. Per realitzar aquesta prova, es preparaven una sèrie de vials de vidre, de 10cm de longitud x 3cm de \varnothing , amb cel.lulosa comercial en el seu fons, que era empapada amb la solució alcohòlica adequada. A cada vial s'hi posaven 10 adults i hom el tapava hermèticament amb diverses capes de parafilm. Cada dia es comptabilitzaven les mosques mortes, fins al quart dia.

Amb etanol es varen fer 5 sèries paral.leles amb concentracions creixents: 0% (control), 1%, 3%, 5% i 7%. Per a cada sèrie hom va realitzar un mínim de tres rèpliques.

Les dosis d'isopropanol varen ésser més baixes d'acord amb l'elevada toxicitat d'aquest compost: 0%(control), 0.5%, 1%, 2% i 4%.

El medi nutritiu base era sempre una dissolució de sacarosa al 3%, per assegurar que la mortalitat no era deguda a cap efecte de desnutrició, sinó a l'efecte de l'alcohol en qüestió. El grau de tolerància d'una espècie enfront d'un substrat durant un temps determinat s'expressa com a LC_{50} o sigui, la concentració d'alcohol que provoca un 50% de mortalitat en aquell temps de tractament. En la taula 3.2. es poden observar els valors de LC_{50} durant els 4 dies de tractament per a l'etanol, i en la 3.3. per a l'isopropanol. Les gràfiques 3.2 (a-f) i 3.3.(a-f) il.lustren aquestes dades, així com la variació de LC_{50} durant els dies esmentats.

Hom comprova que l'isopropanol, a pesar d'ésser el substrat més afí per l'ADH, és molt més tòxic que l'etanol, o, el que és equivalent, és tolerat a do-

sis molt més baixes: mentre que els valors de LC_{50} (pel primer dia) i per l'etanol oscil·len entre 9.82 i 2.14, amb una mitjana de 4.81; per a l'isopropanol oscil·len entre 3.83 i 0.90, amb una mitjana de 2.05.

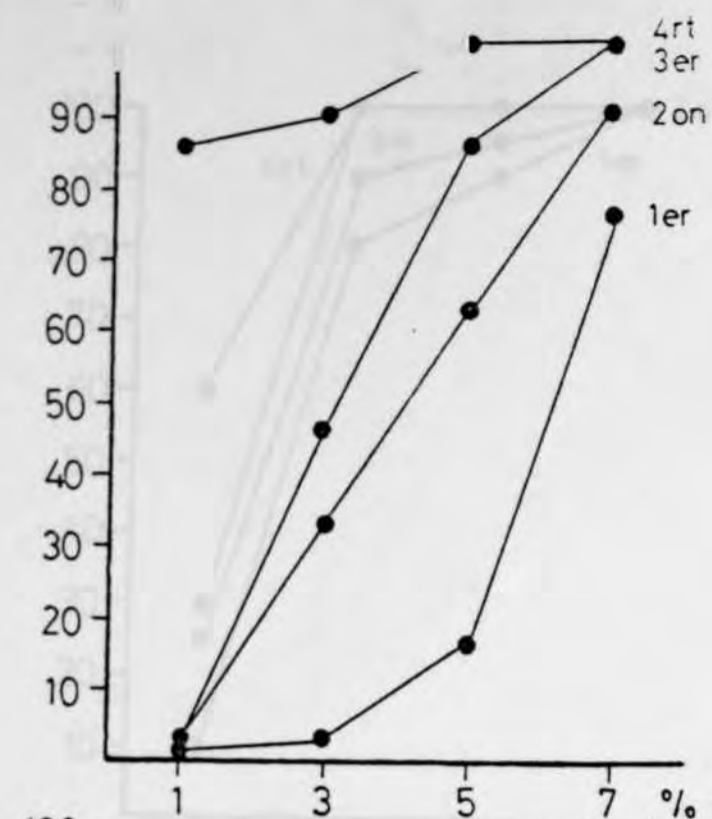
L'ordenació de les espècies de major a menor tolerància per a l'etanol no es correspon exactament amb la de l'isopropanol, fet que sembla indicar que, si bé l'ADH juga un paper important en aquesta tolerància, no hi suposa l'únic factor responsable. Tampoc resta clara la correspondència entre tolerància a un alcohol - etanol o isopropanol- i els nivells d'activitat enzimàtica per l'ADH. Està clar que D.hydei, que és una de les espècies amb activitat més elevada -vegeu taula 3.1- és també la que presenta majors LC_{50} per etanol i per isopropanol; i que les espècies amb nivells més baixos d'activitat D.phalerata, D.greeni i D.erecta, són també les de tolerància més baixa. Ara bé, cal assenyalar que:

- en les espècies intermitges de la taula no hi ha cap correspondència clara entre activitat ADH de l'adult i la tolerància.
- la relació de tolerància s'ha d'establir evidentment amb l'activitat enzimàtica de l'adult, i aquesta no guarda cap mena de relació en molts casos amb la de la larva.

Resultats paral·lels de casos de discrepància es troben sovint descrits en la literatura. David assenyala que l'activitat de l'enzim ADH no és sinó un dels molts paràmetres que poden intervenir en la tolerància d'una espècie a un determinat alcohol, i mentre no es coneguin les vies de metabolització i detoxificació que Drosophila usa en aquestes condicions, no es podrà tenir una visió clara de com interactuen els dos paràmetres

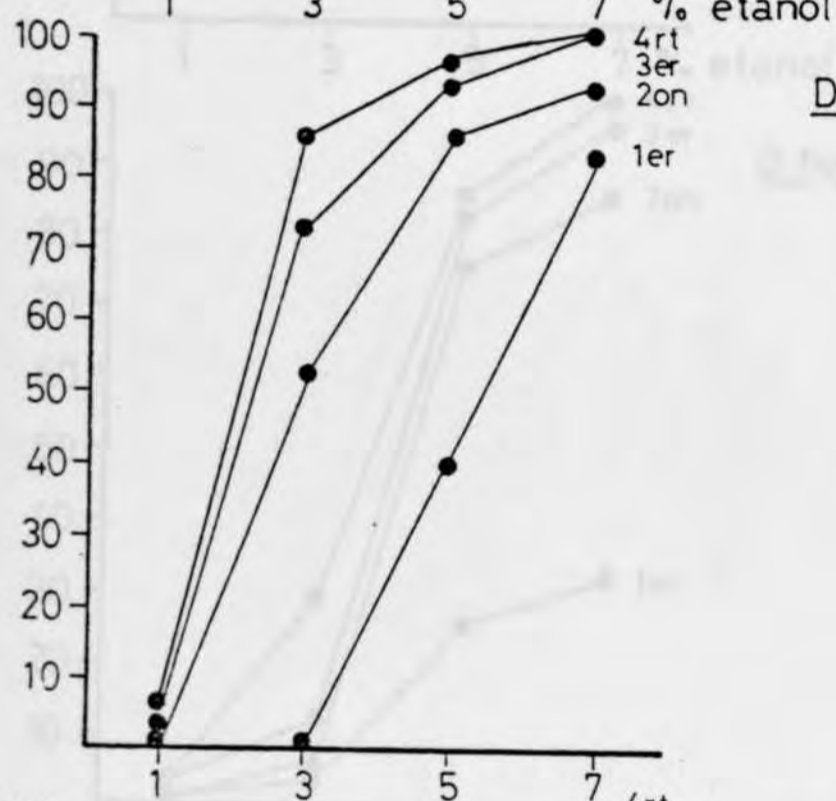
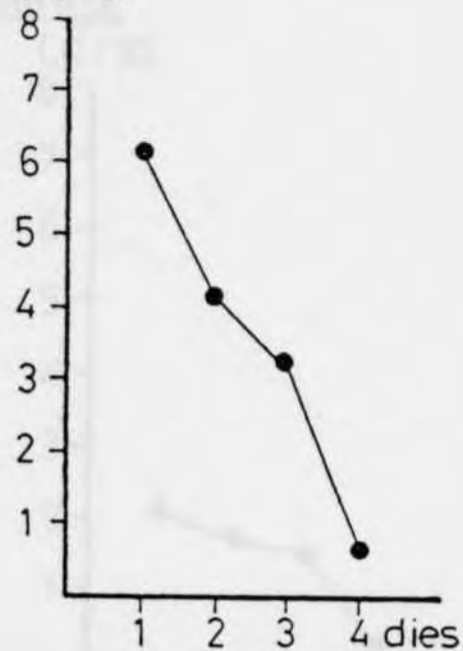
ESPÈCIES	LC/50			
	1	2	3	4 dies
<u>D.hydei</u>	9.82	4.25	4.05	3.71
<u>D.willistoni</u>	6.25	4.71	4.06	3.18
<u>D.pavani</u>	6.13	4.11	3.20	0.58
<u>D.subobscura</u>	6.11	4.03	2.39	0.89
<u>D.gaucha</u>	5.46	2.88	2.34	2.10
<u>D.bocqueti</u>	5.46	2.88	2.34	2.10
<u>D.teissieri</u>	5.34	3.35	2.88	2.56
<u>D.burlai</u>	5.00	3.68	2.78	2.14
<u>D.guanche</u>	4.86	3.97	3.00	2.19
<u>D.mauritiana</u>	4.60	3.32	3.24	2.70
<u>D.yakuba</u>	3.85	2.13	2.31	2.25
<u>D.kikkawai</u>	3.37	2.07	1.90	1.63
<u>D.erecta</u>	3.08	2.65	2.40	2.14
<u>D.littoralis</u>	2.88	2.77	2.36	2.25
<u>D.greeni</u>	2.72	1.68	1.37	1.24
<u>D.phalerata</u>	2.14	1.76	1.57	0.33
<u>D.melanogaster</u> *	22.6	16.5	16.4	7.6
<u>D.lebanonensis</u> *	32.0	28.0	20.0	--

TAULA 3.2. Tolerància a l'etanol d'adults de Drosophila.
 (* de David, 1976, 1979).

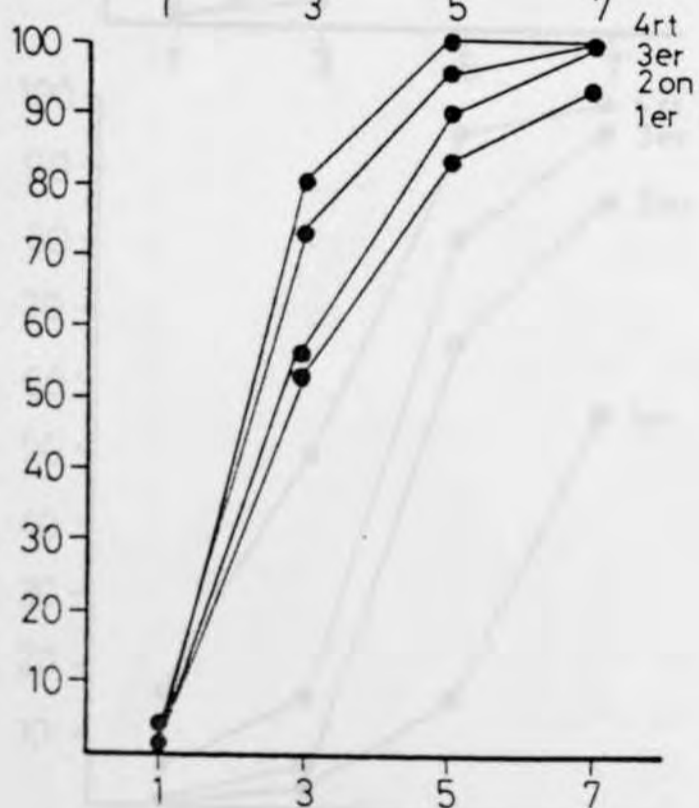
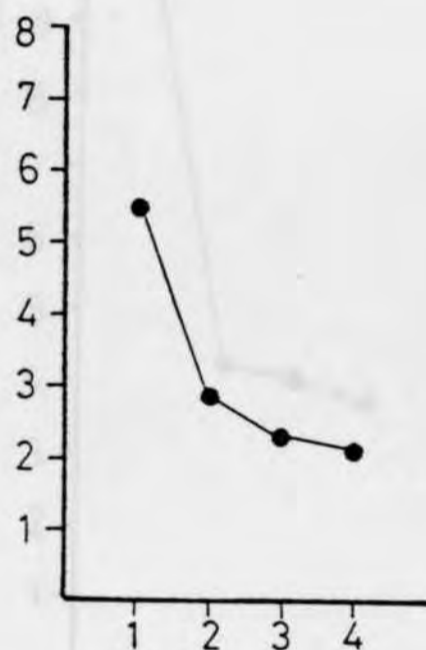


D. pavani

LC/50



D. gaucha



D. littoralis

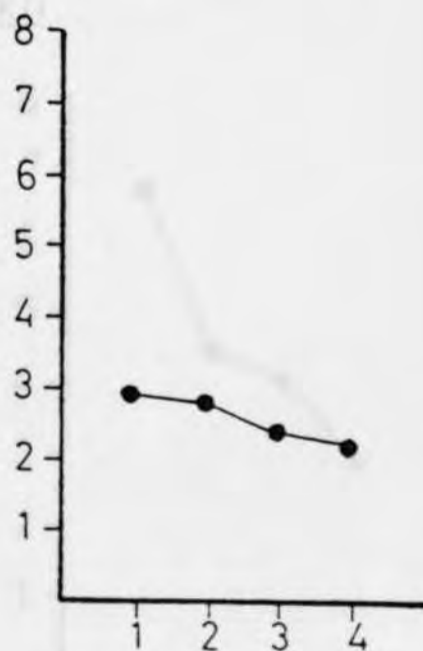


FIGURA 3.2. (a)

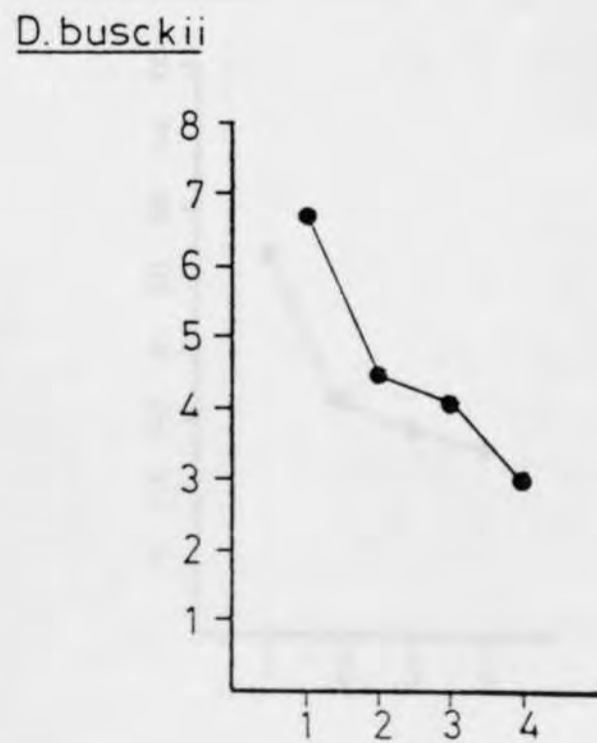
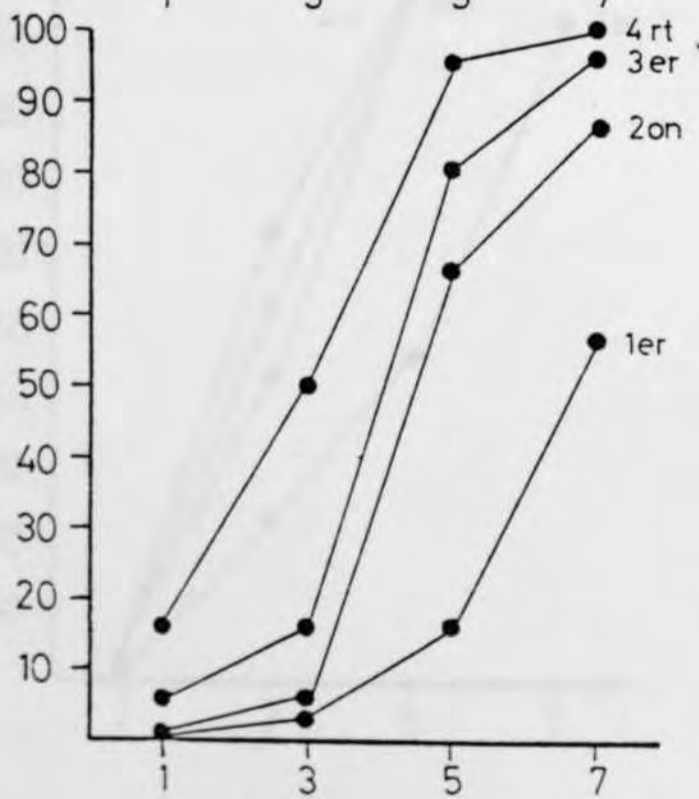
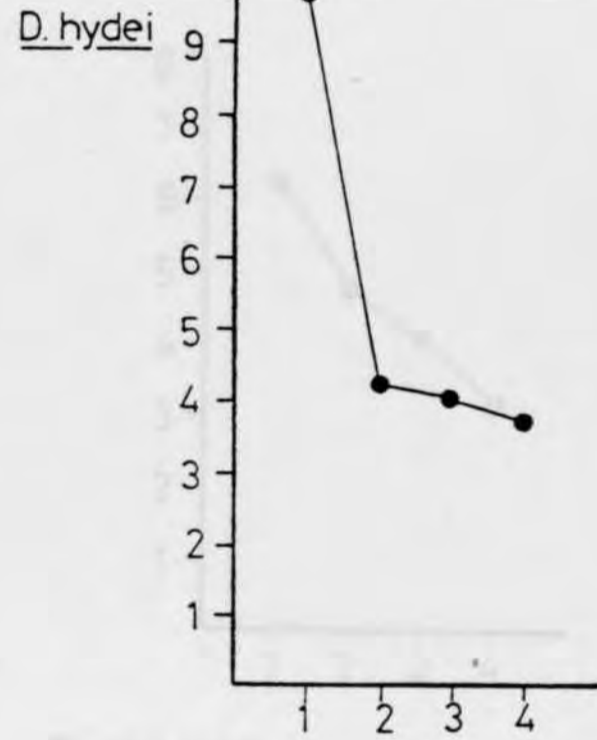
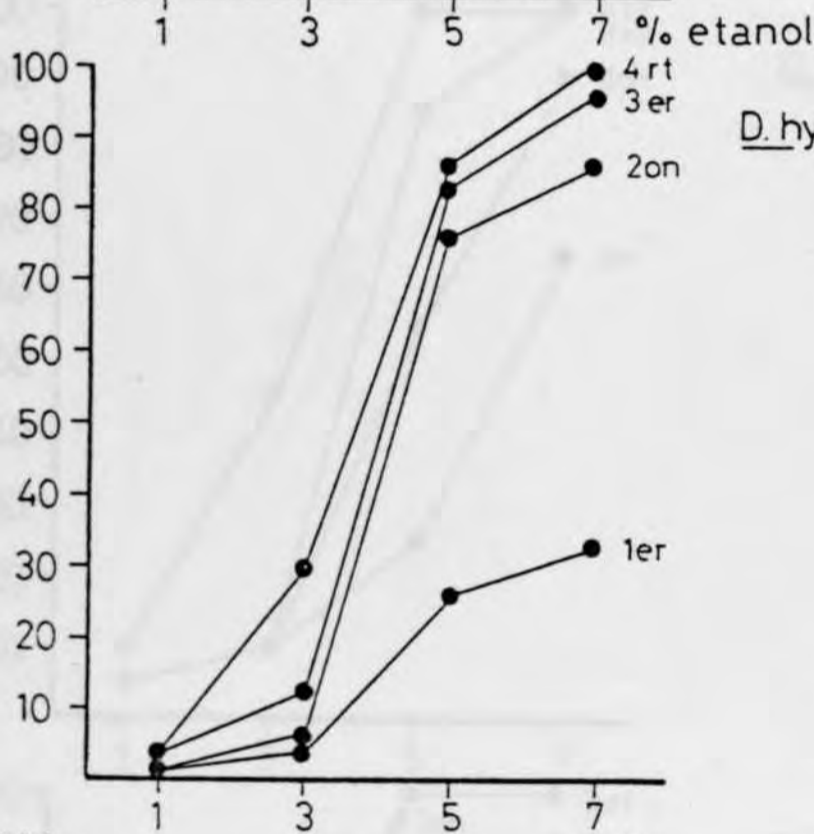
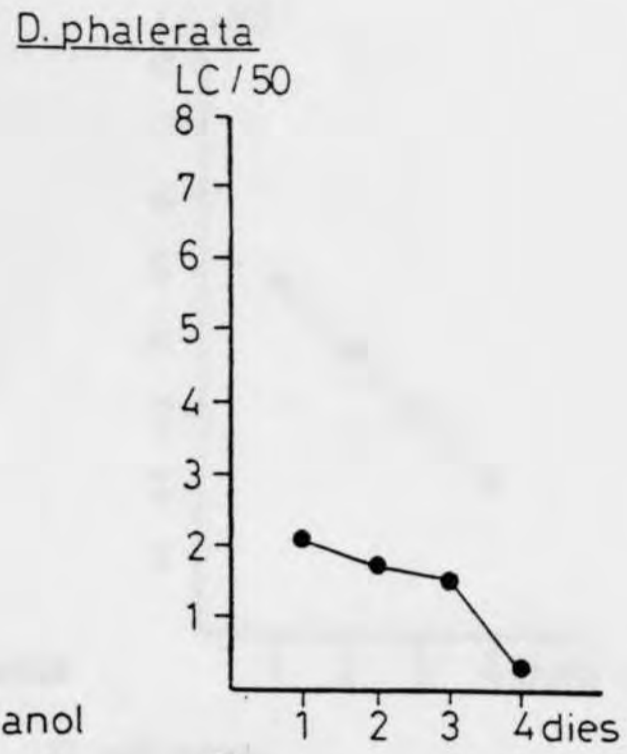
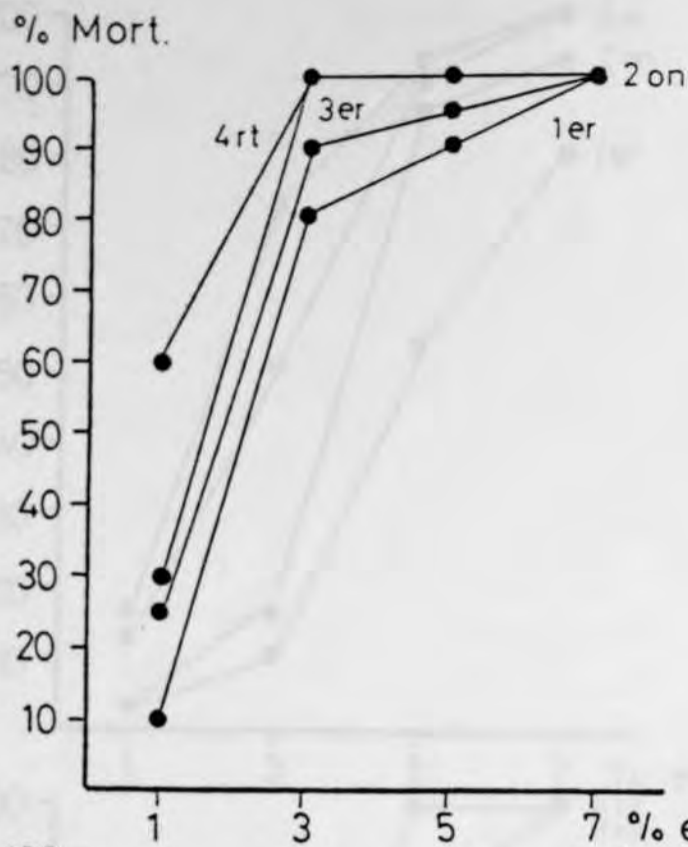


FIGURA 3.2. (b).

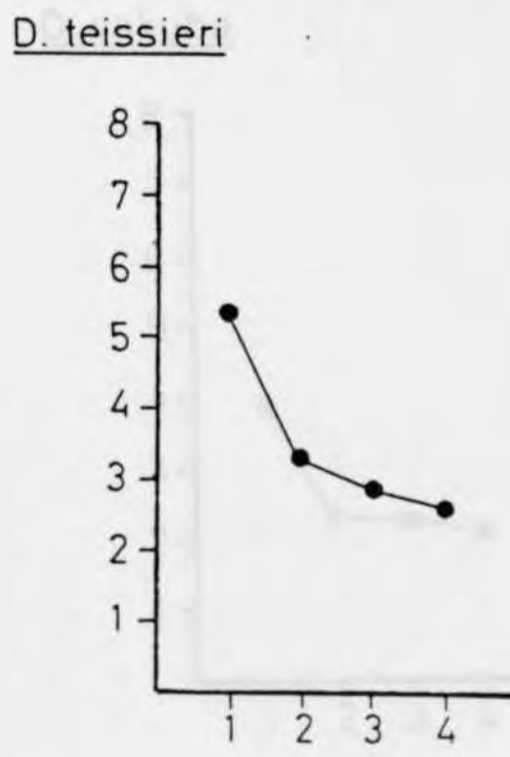
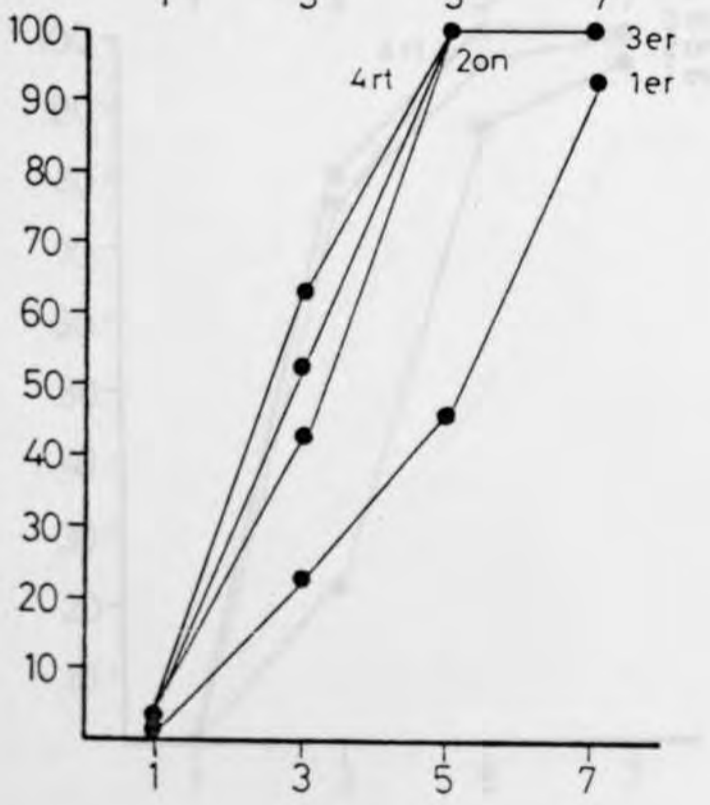
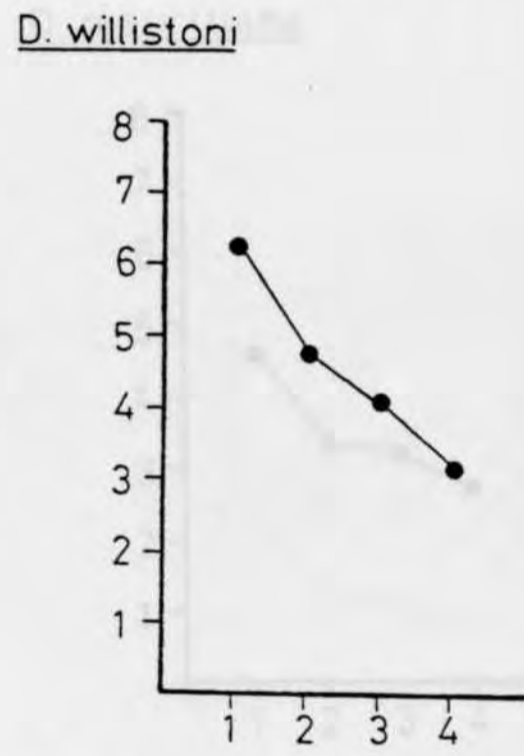
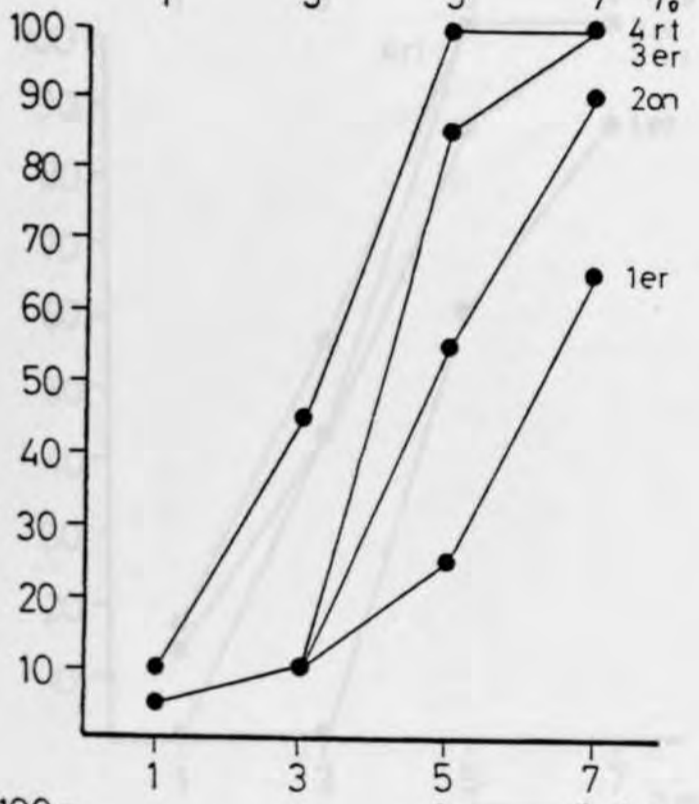
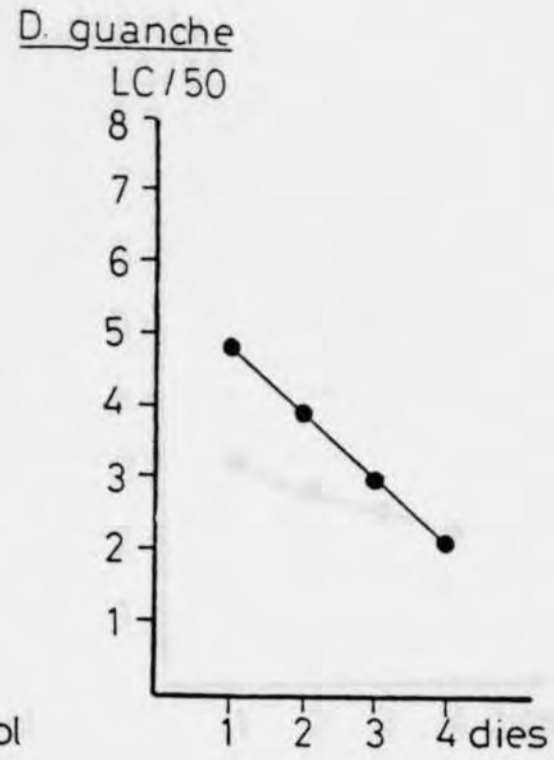
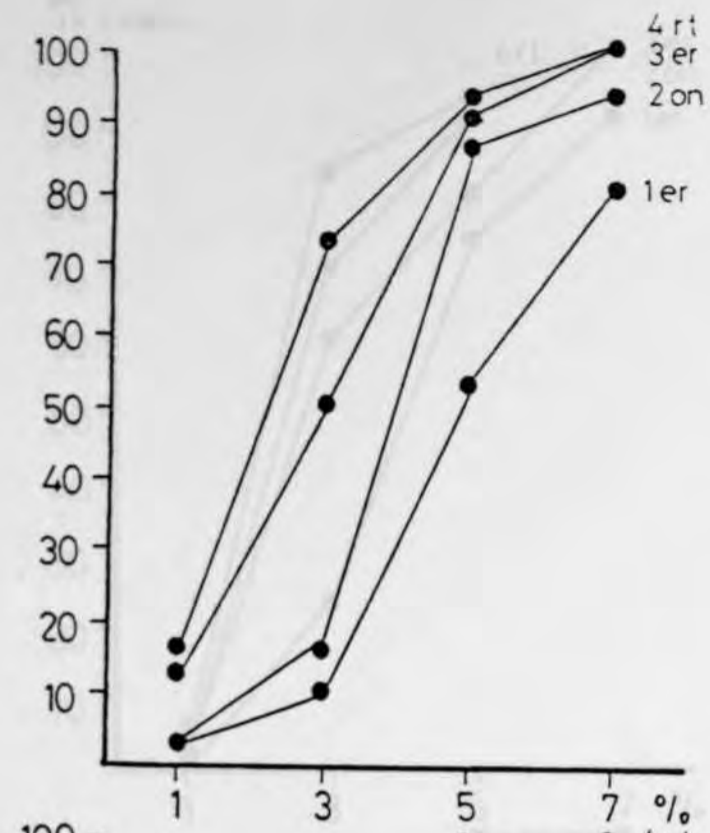


FIGURA 3.2.(c).

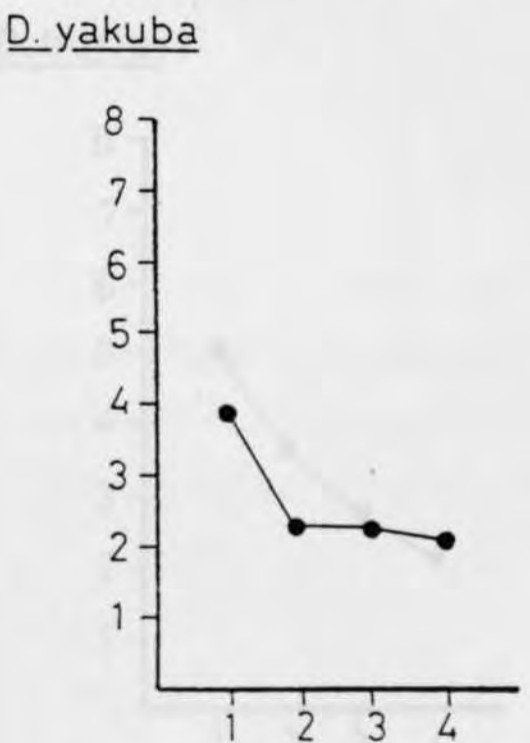
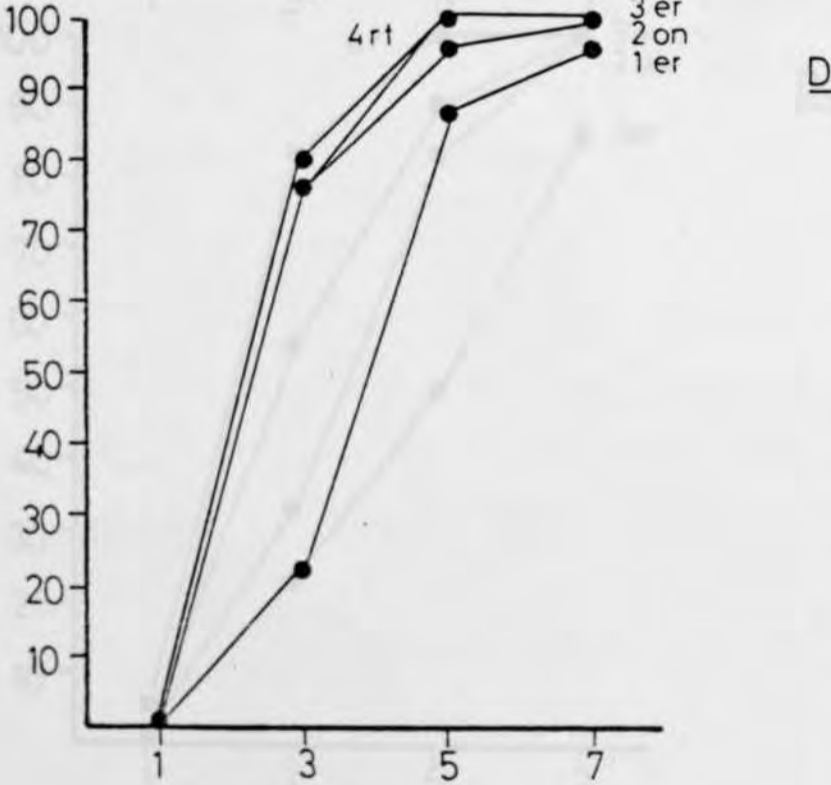
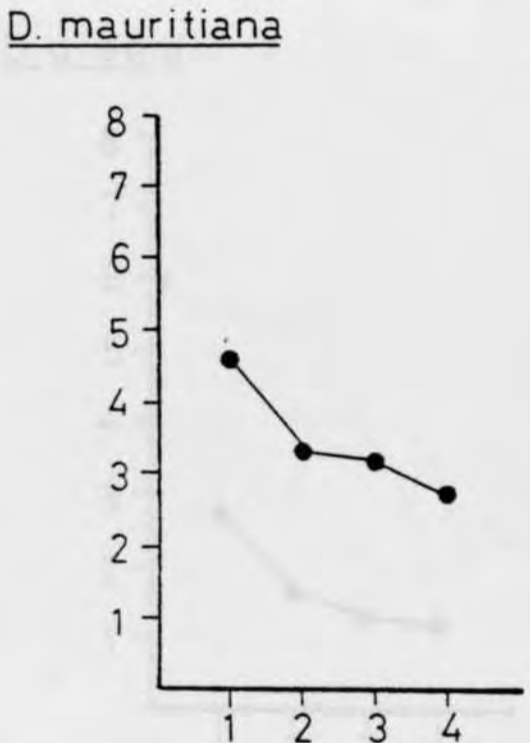
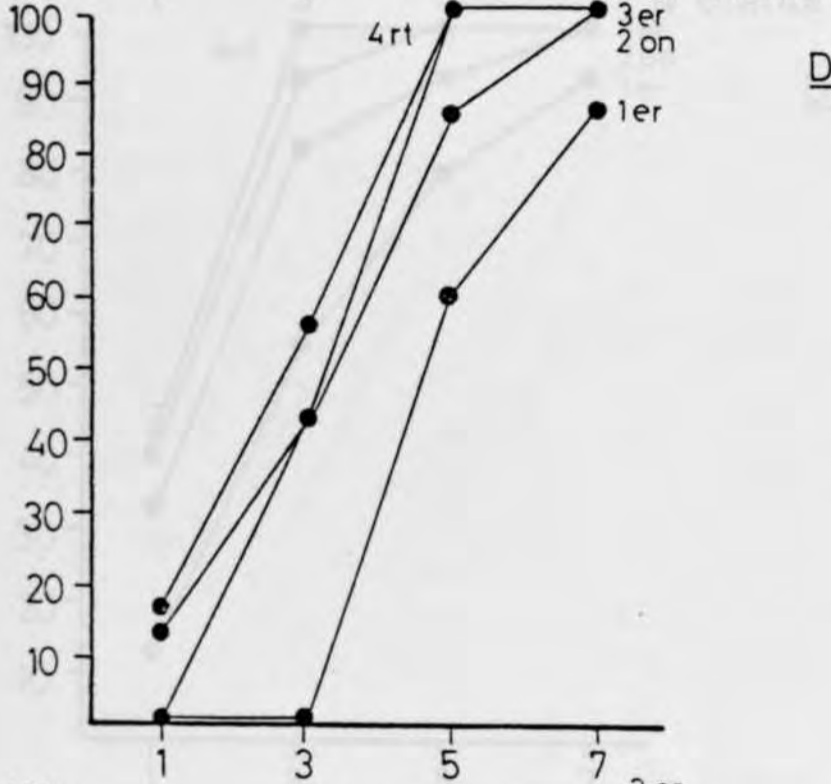
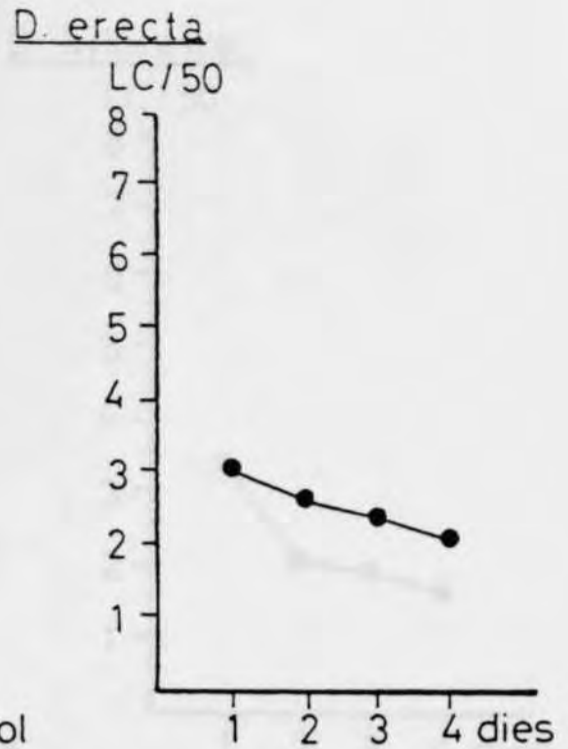
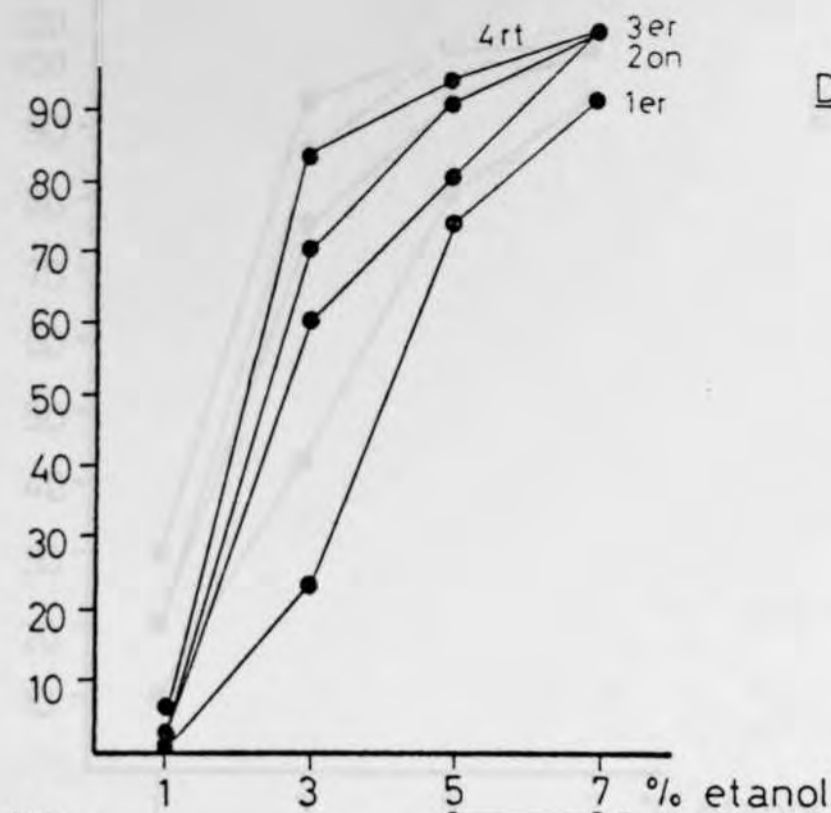
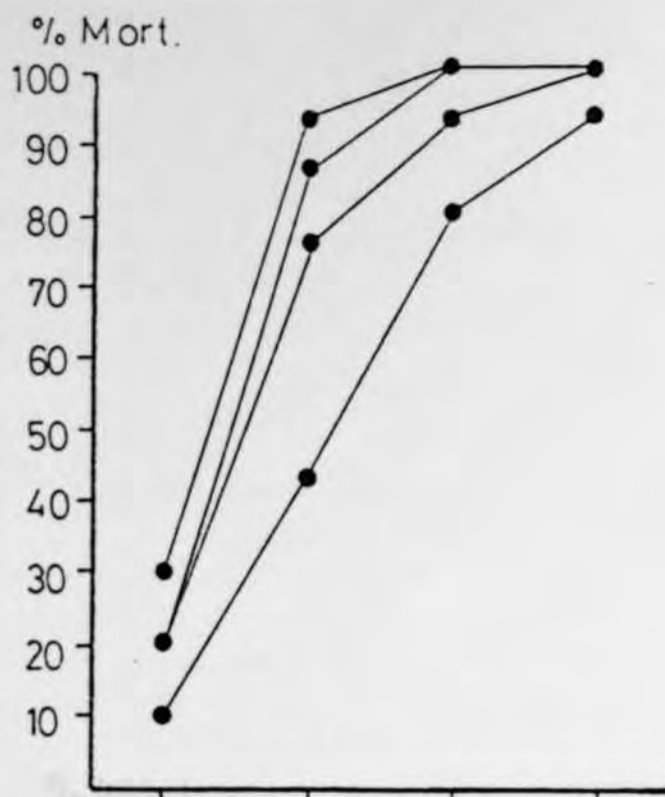
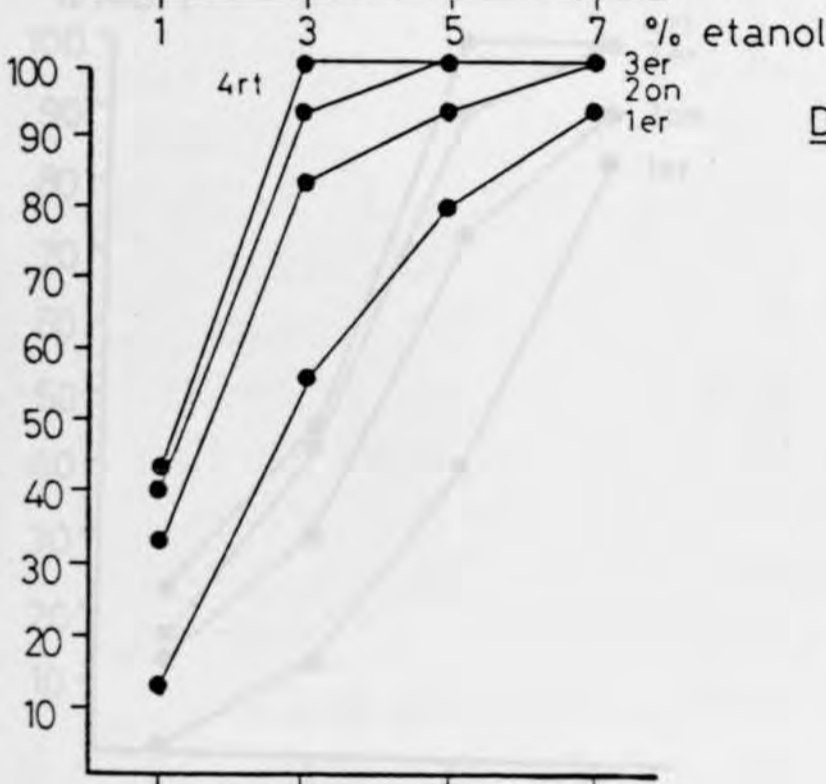
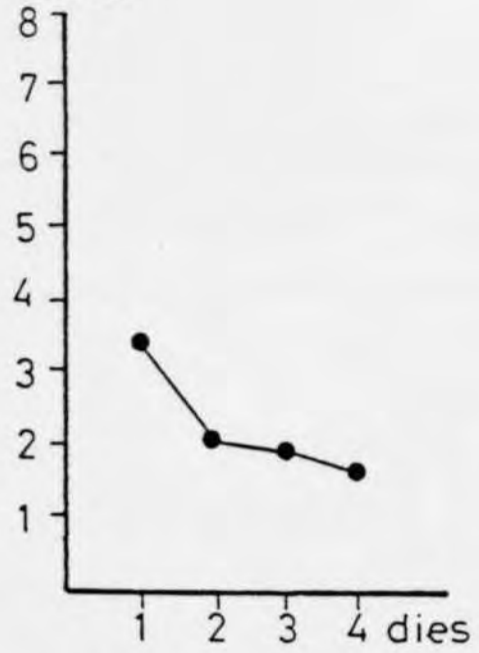


FIGURA 3.2.(d).



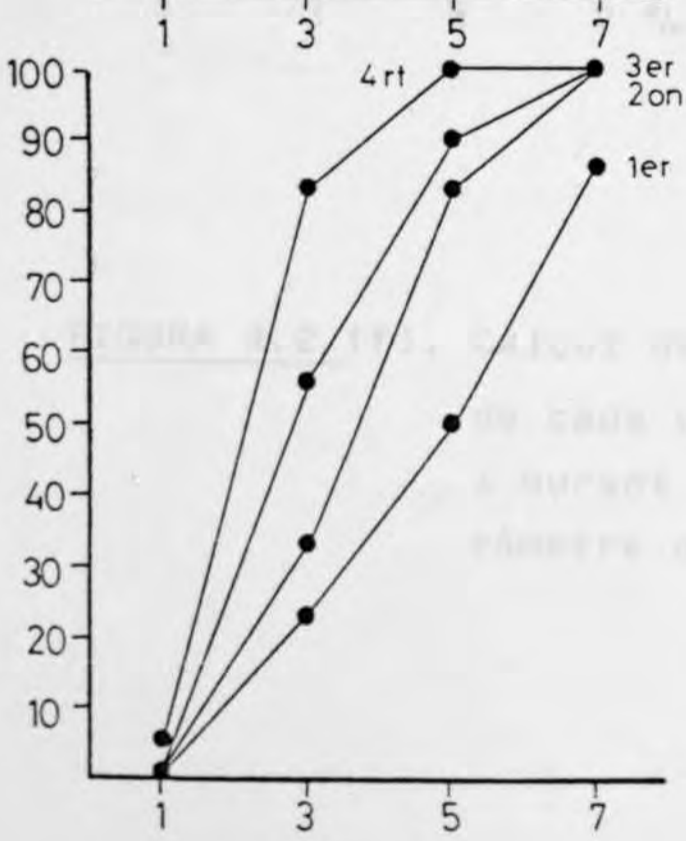
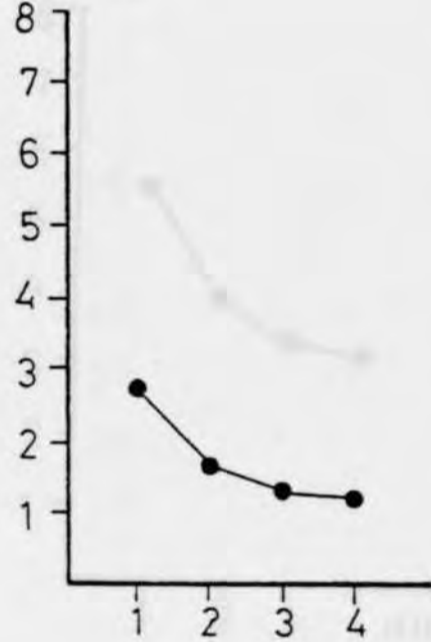
D. kikkawai

LC/50



D. greeni

LC/50



D. burlai

LC/50

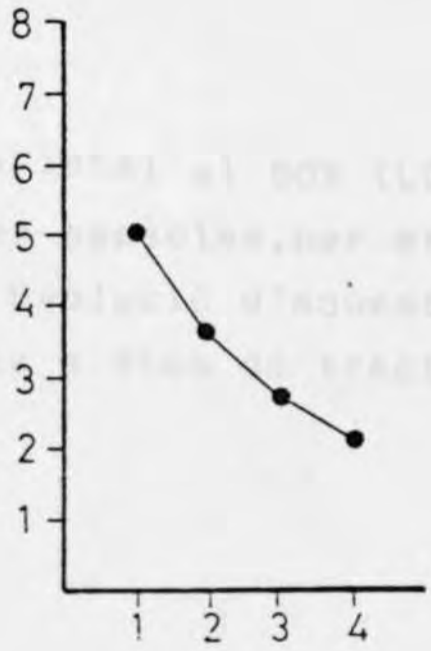


FIGURA 3.2. (e)

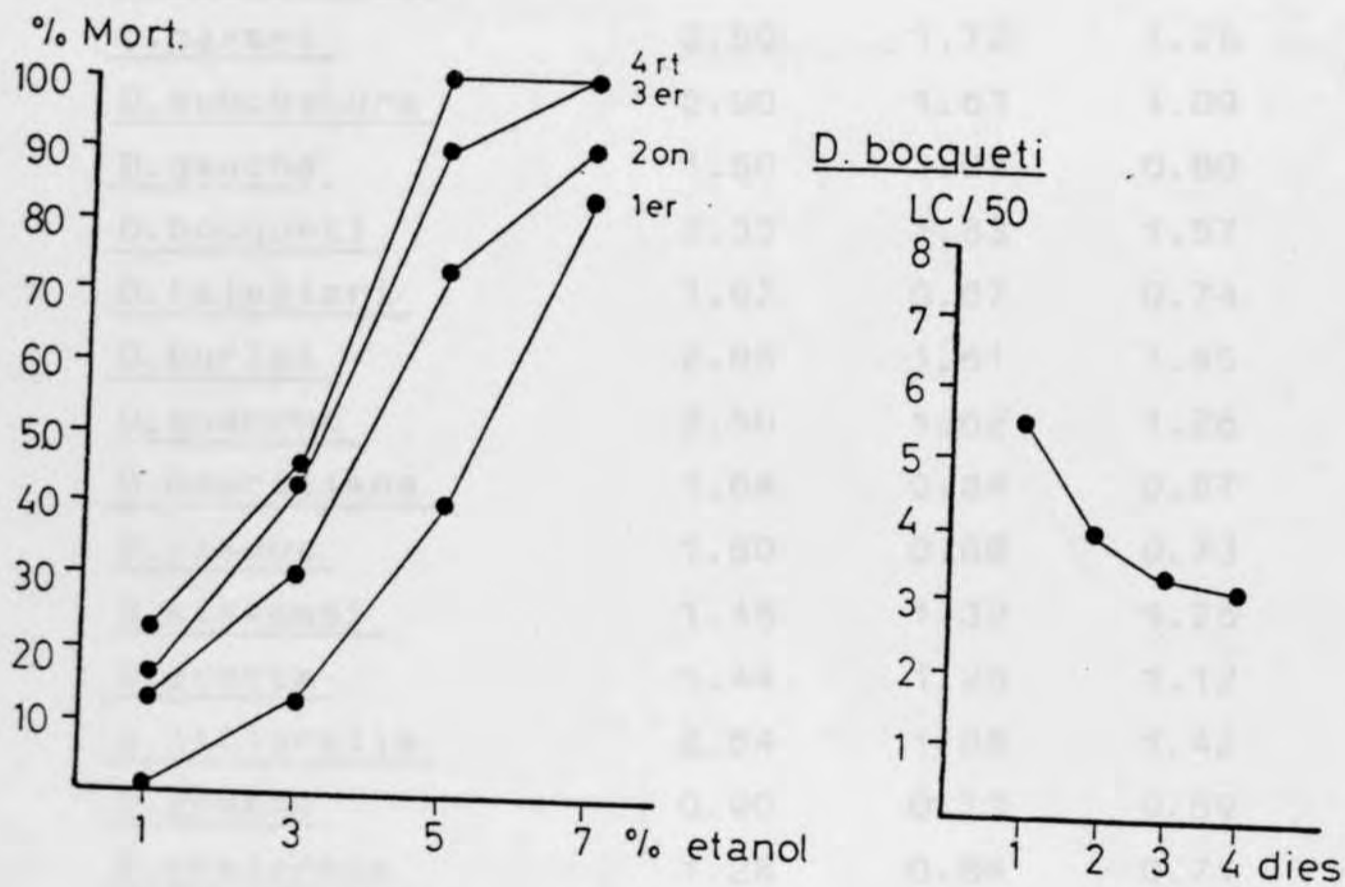


FIGURA 3.2.(f). Càlcul de la dosi letal al 50% (LC/50) de cada una de les espècies, per etanol i durant 4 dies. Evolució d'aquest paràmetre durant els 4 dies de tractament.

ESPÈCIES	LC/50			
	1	2	3	4 dies
<u>D.hydei</u>	3.83	2.00	1.64	1.50
<u>D.willistoni</u>	2.85	2.29	1.54	1.12
<u>D.pavani</u>	2.50	1.72	1.25	1.12
<u>D.subobscura</u>	2.00	1.53	1.09	0.90
<u>D.gaucha</u>	1.50	1.07	0.80	0.70
<u>D.bocqueti</u>	2.33	1.83	1.57	1.28
<u>D.teissieri</u>	1.62	0.87	0.74	0.72
<u>D.burlai</u>	2.85	1.61	1.45	1.25
<u>D.guanche</u>	2.50	1.62	1.26	1.07
<u>D.mauritiana</u>	1.64	0.84	0.67	0.64
<u>D.yakuba</u>	1.60	0.88	0.73	0.62
<u>D.kikkawai</u>	1.45	1.32	1.25	1.12
<u>D.erecta</u>	1.44	1.25	1.12	1.07
<u>D.littoralis</u>	2.64	1.86	1.42	1.32
<u>D.greeni</u>	0.90	0.73	0.69	0.56
<u>D.phalerata</u>	1.28	0.84	0.71	0.63

TAULA 3.3. Tolerància a l'isopropanol d'adults de Drosophila.

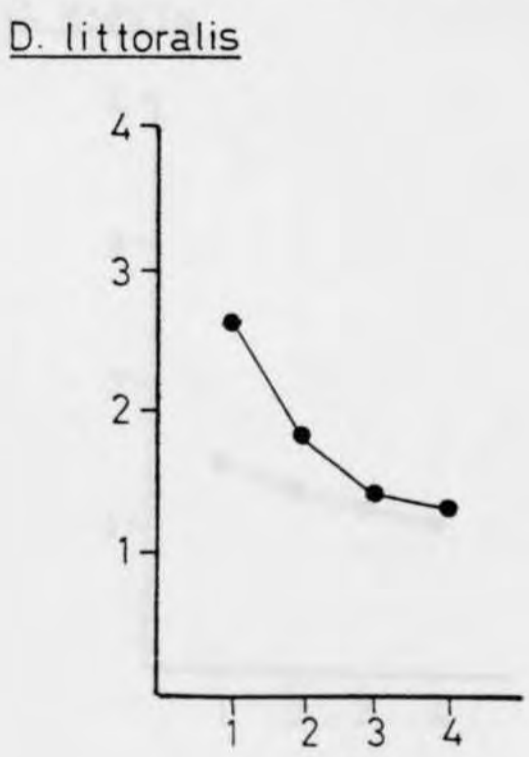
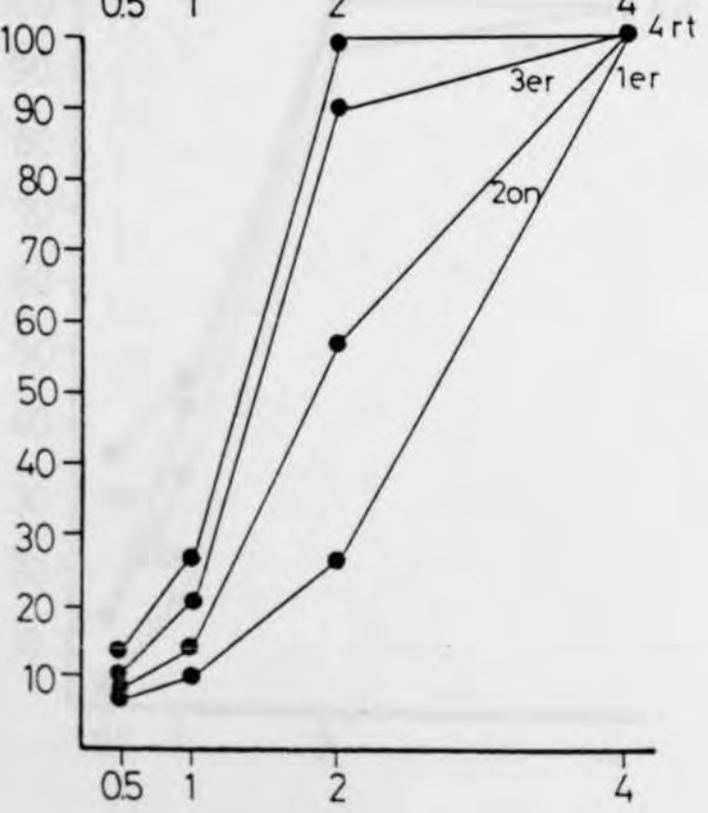
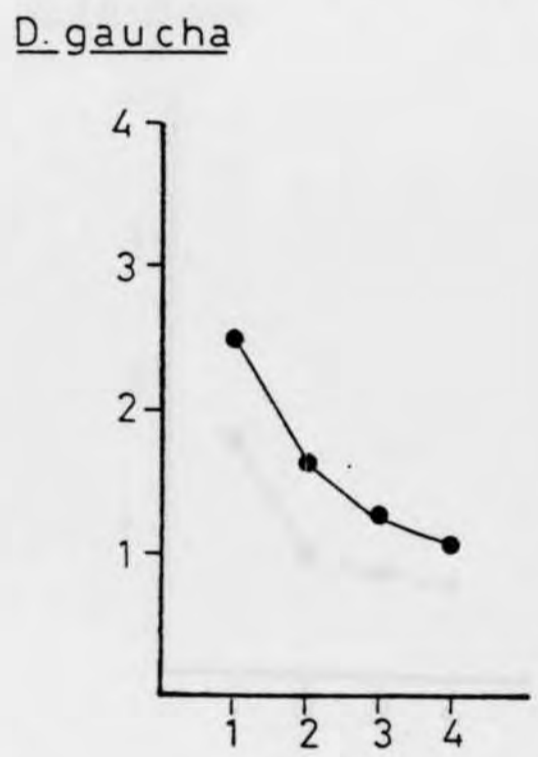
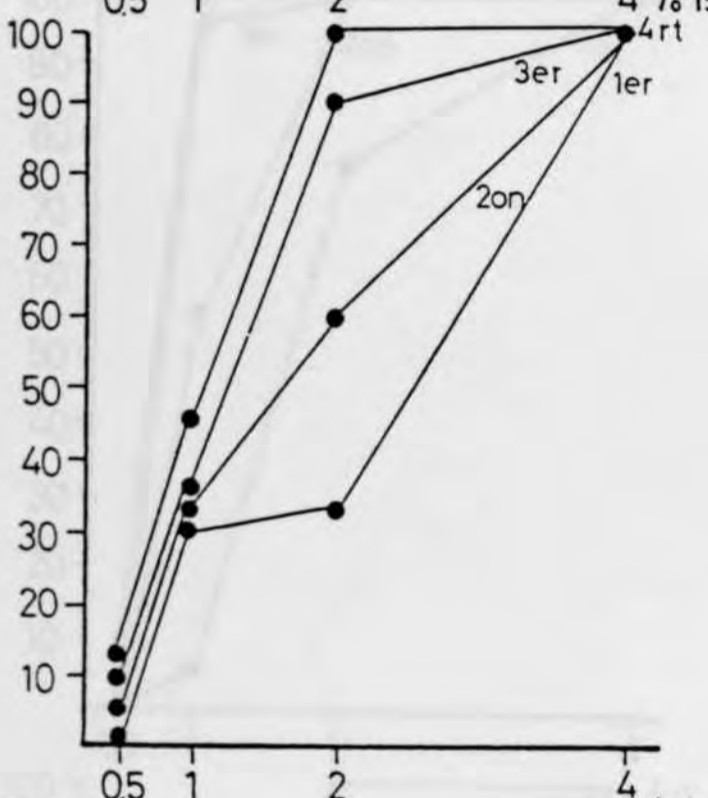
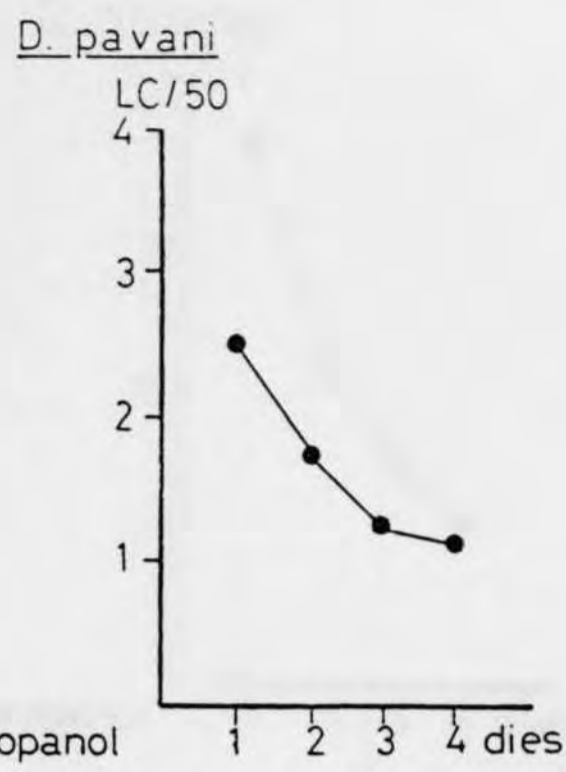
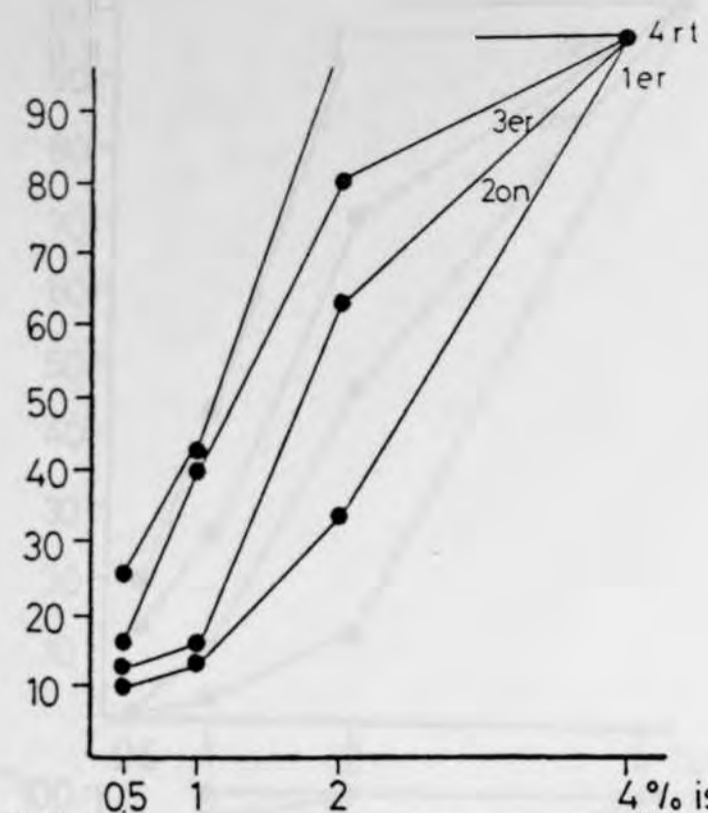


FIGURA 3.3.(a).

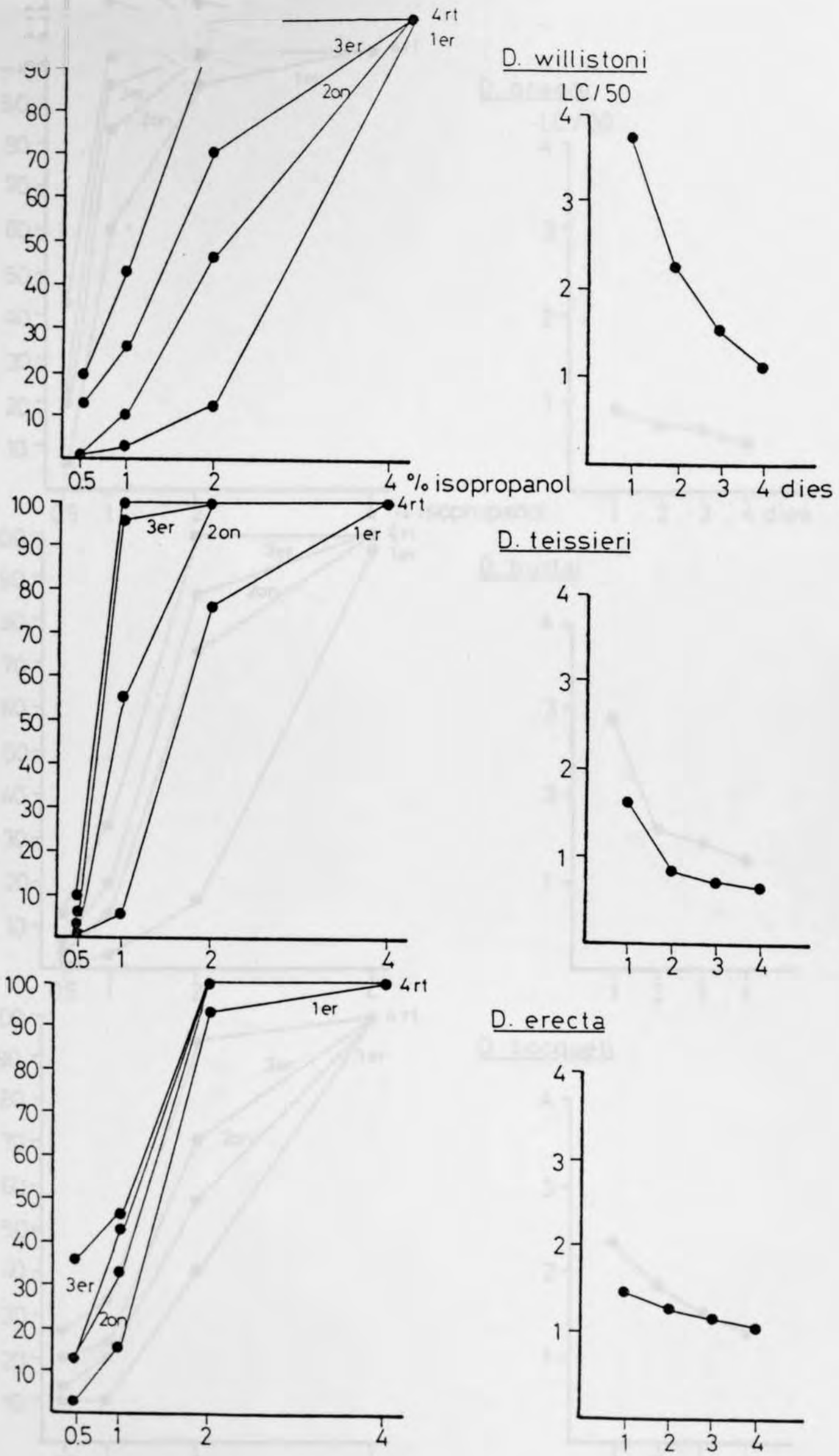
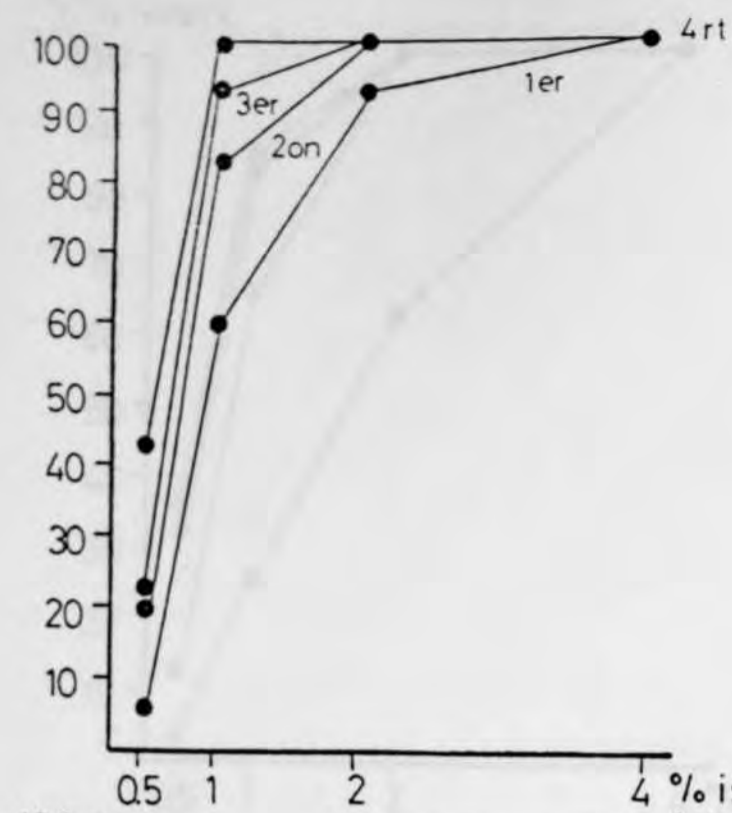
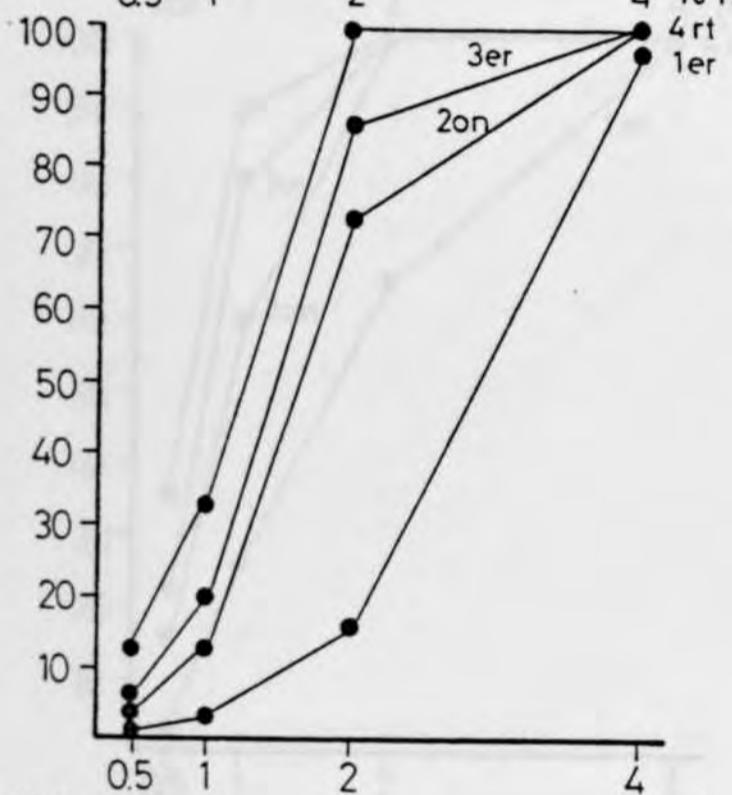
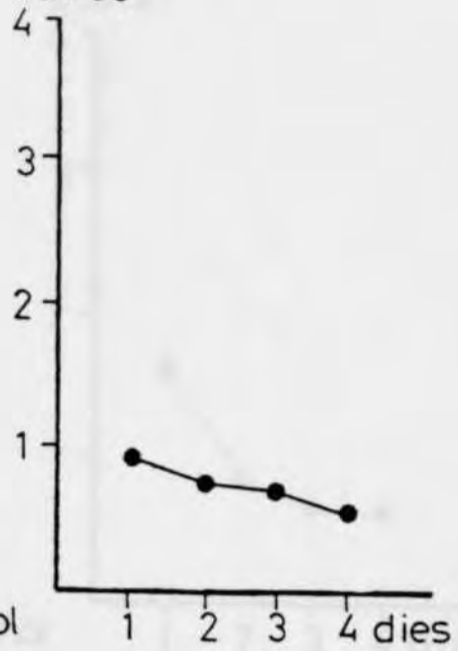


FIGURA 3.3. (b)

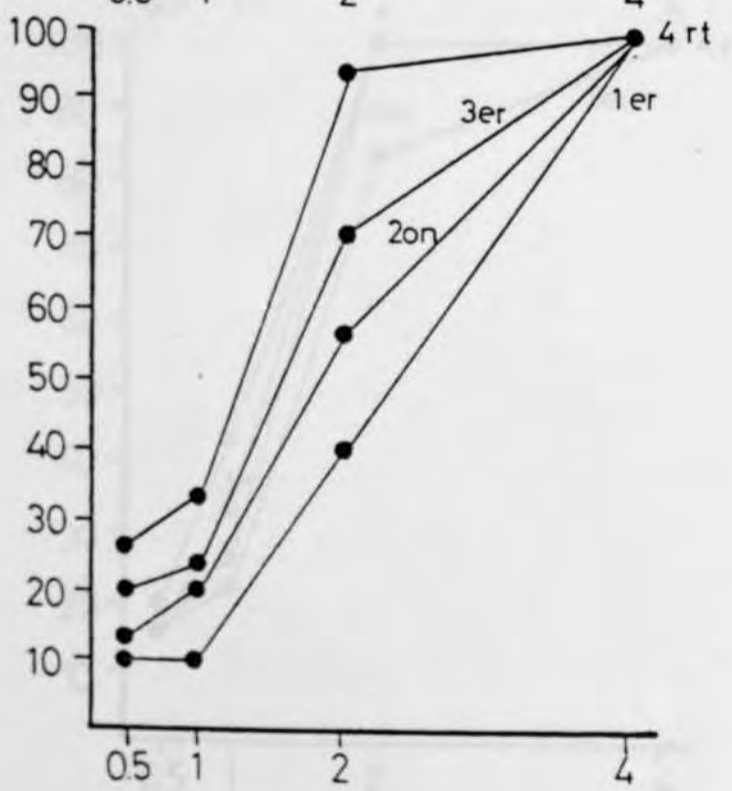
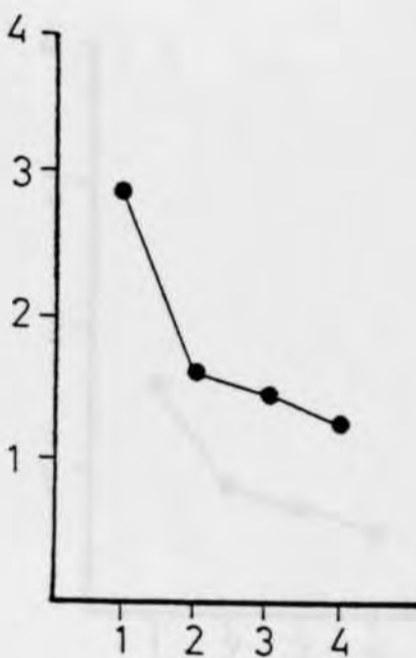


D. greeni

LC / 50



D. burlai



D. bocqueti

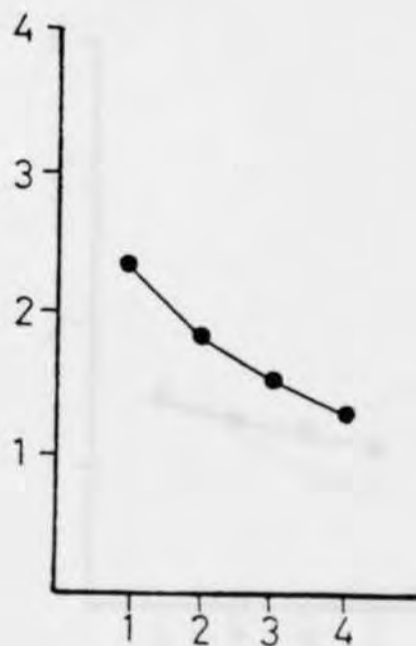
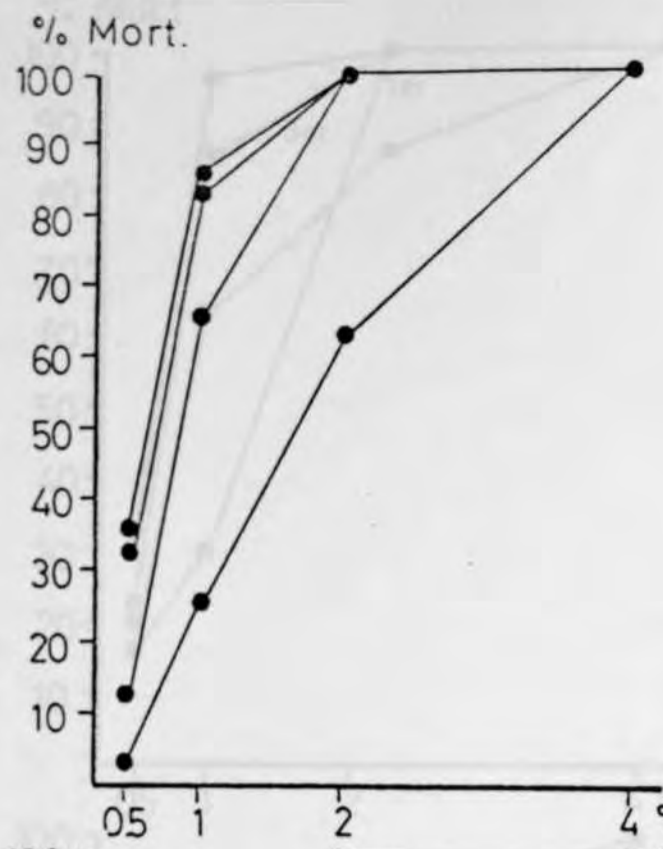
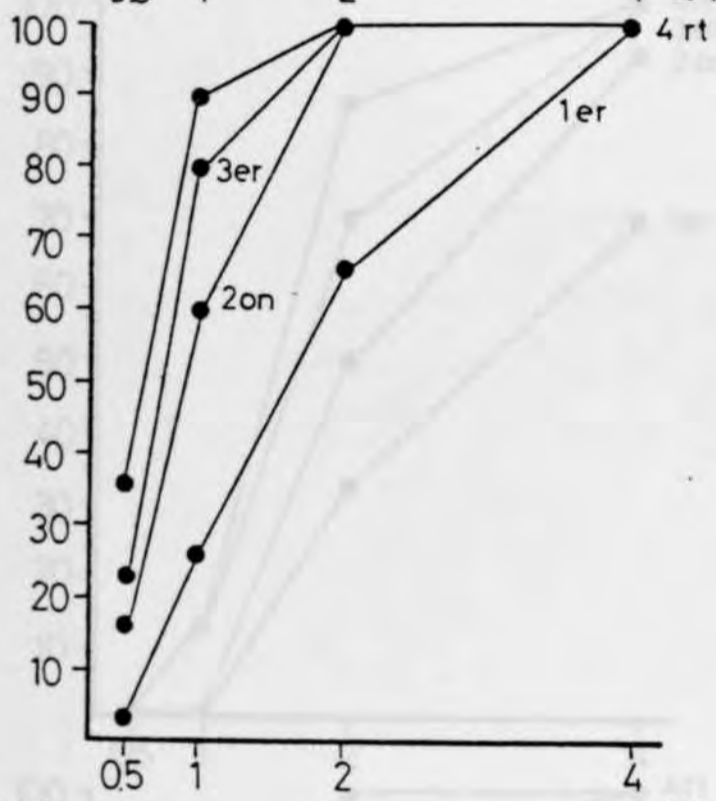
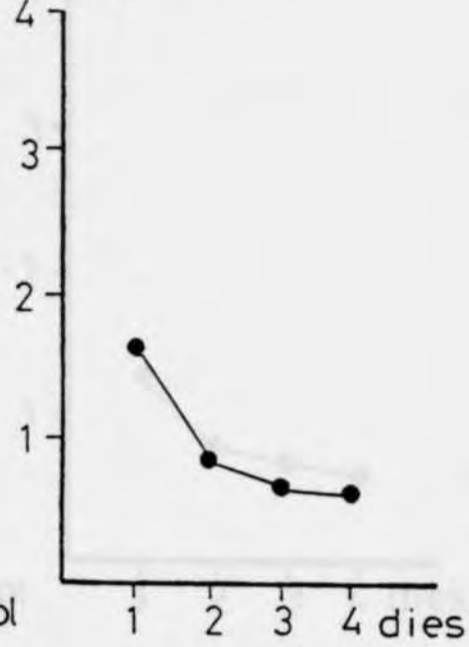


FIGURA 3.3. (c).

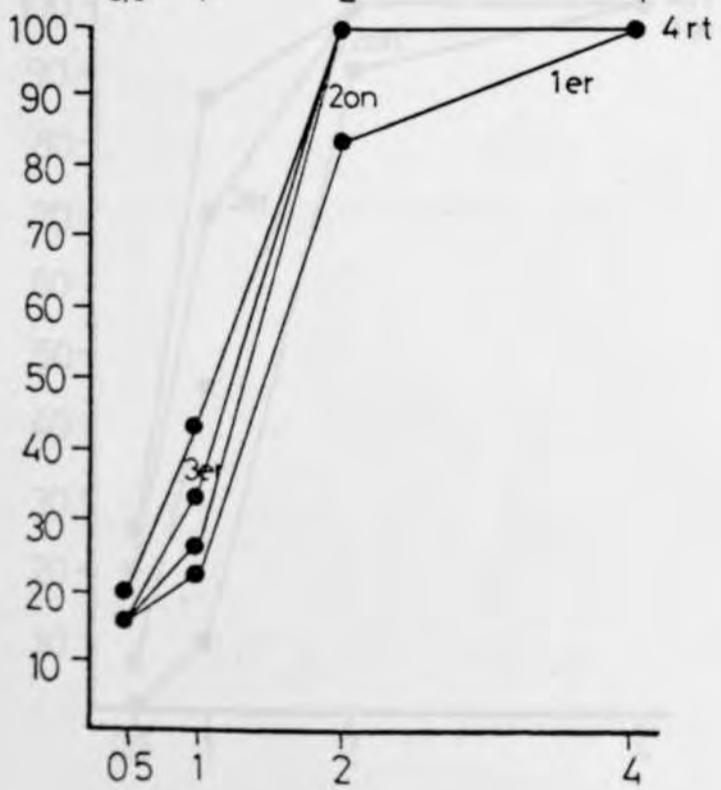
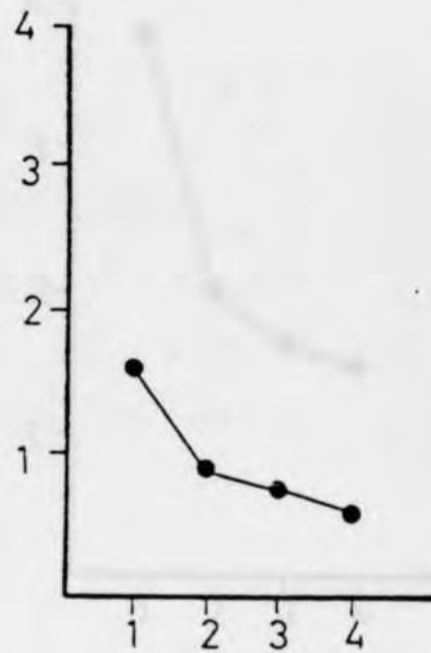


D. mauritiana

LC/50



D. yakuba



D. kikkawai

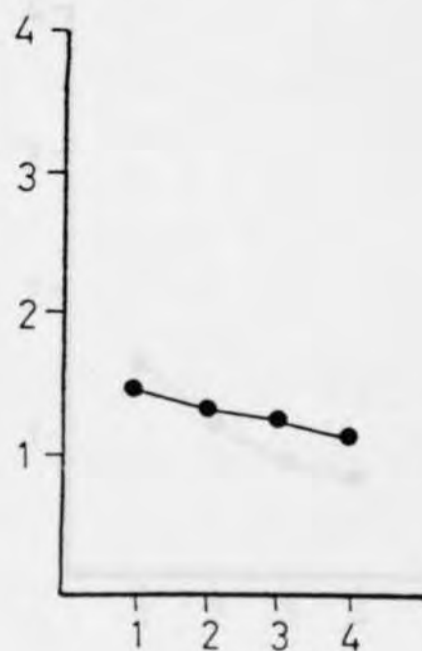
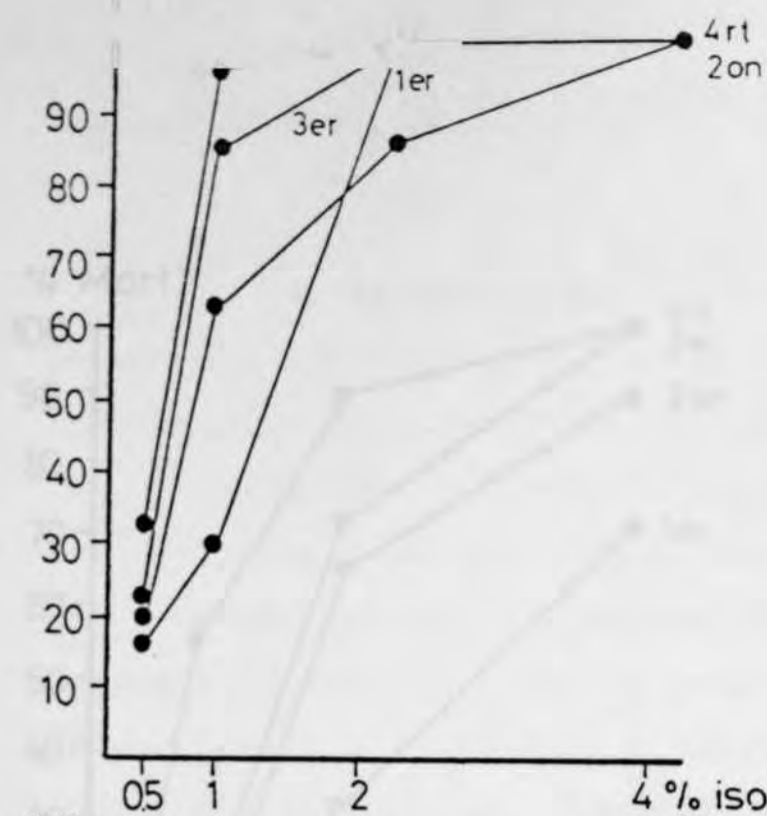
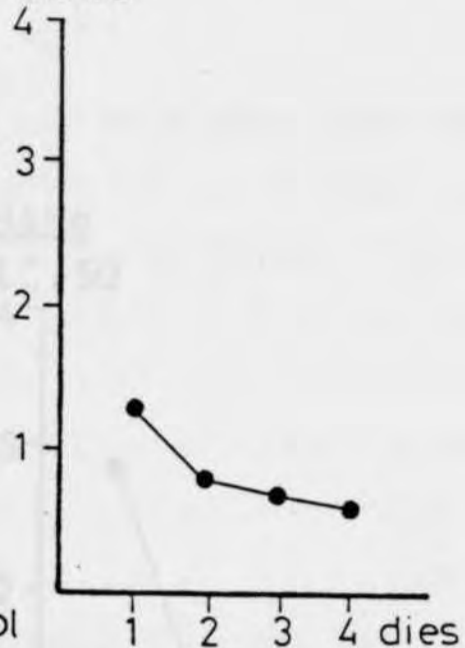


FIGURA 3.3.(d).

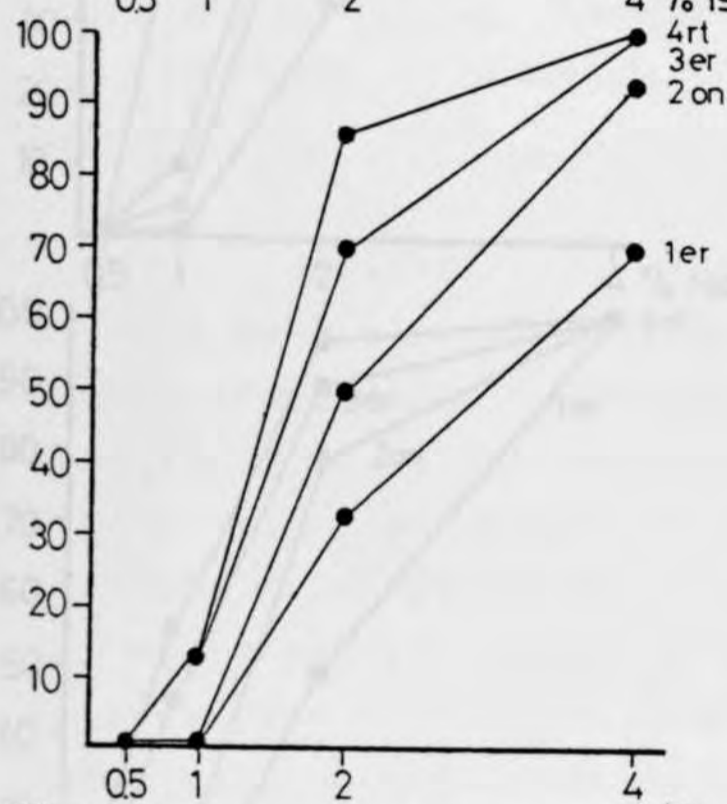


D. phalerata

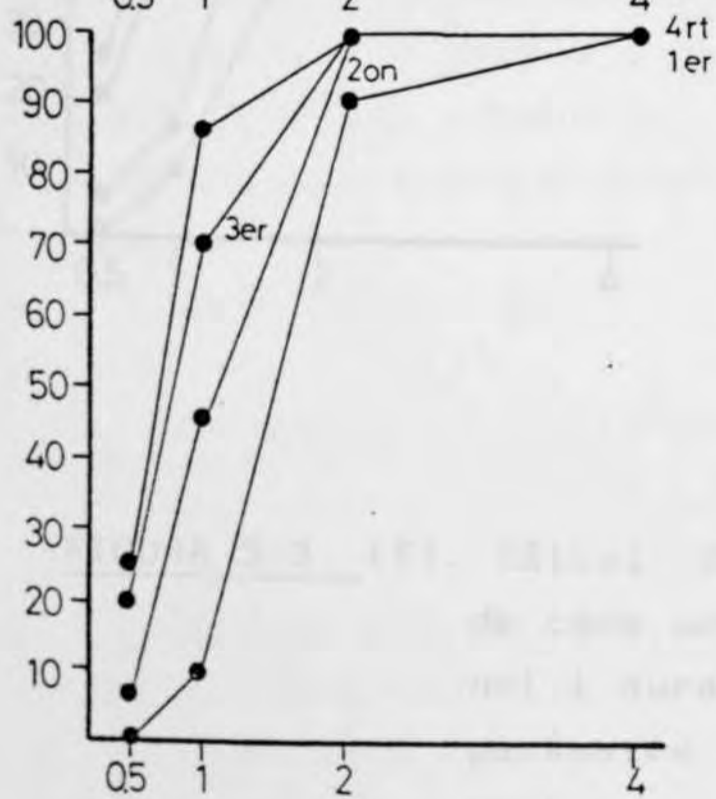
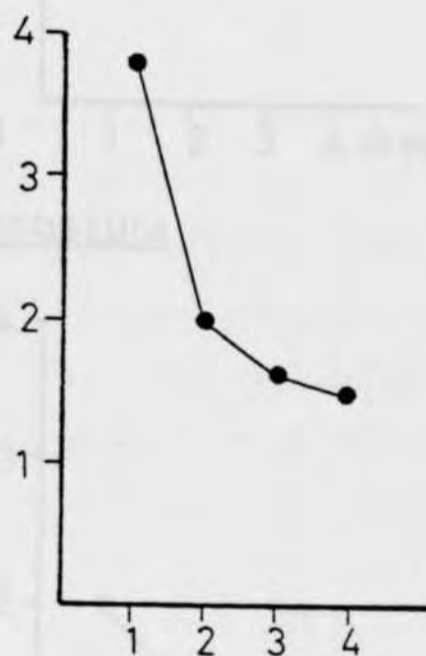
LC/50



4% isopropanol



D. hydei



D. guanche

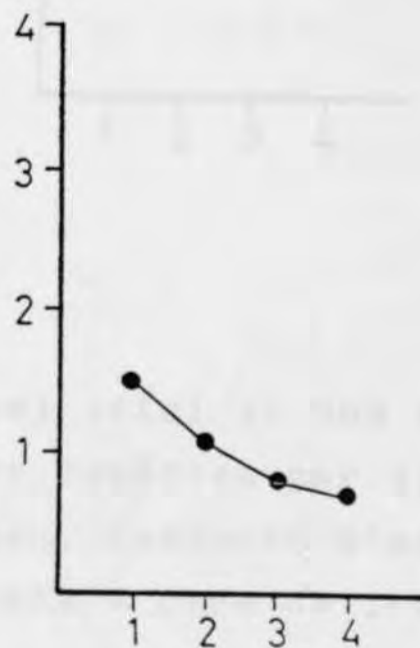


FIGURA 3.3. (e).

3.3. ESTABILITAT DE L'ENZIM EN EXTRACTE D'ADH

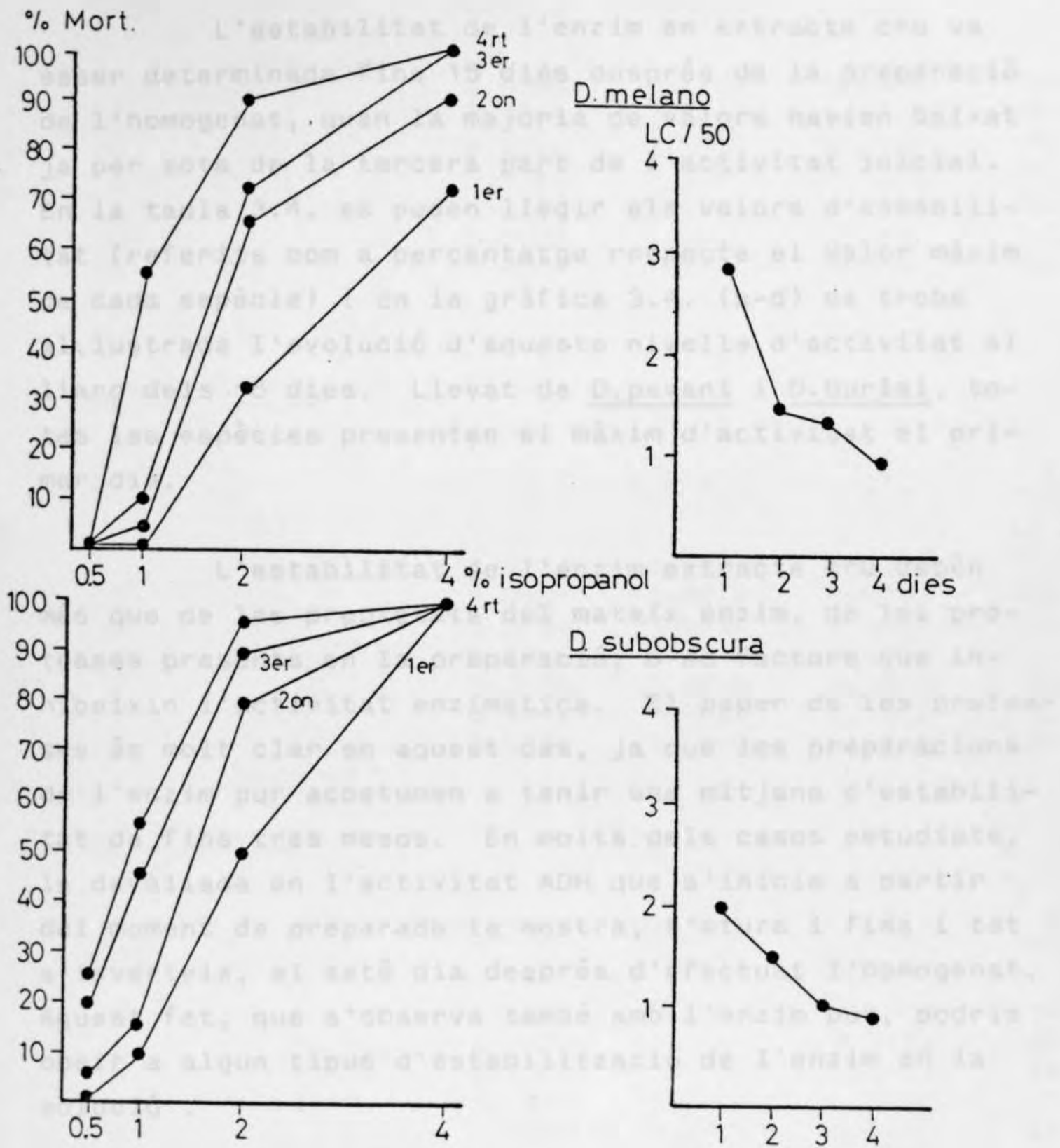


FIGURA 3.3. (f). Càlcul de la dosi letal al 50% (LC/50) de cada una de les espècies per isopropanol i durant 4 dies. Evolució d'aquest paràmetre durant els 4 dies de tractament.

3.3. ESTABILITAT DE L'ENZIM EN EXTRACTE CRU.

L'estabilitat de l'enzim en extracte cru va ésser determinada fins 15 dies després de la preparació de l'homogenat, quan la majoria de valors havien baixat ja per sota de la tercera part de l'activitat inicial. En la taula 3.4. es poden llegir els valors d'estabilitat (referits com a percentatge respecte el valor màxim de cada espècie) i en la gràfica 3.4. (a-d) es troba il.lustrada l'evolució d'aquests nivells d'activitat al llarg dels 15 dies. Llevat de D.pavani i D.burlai, totes les espècies presenten el màxim d'activitat el primer dia.

L'estabilitat de l'enzim extracte cru depèn més que de les propietats del mateix enzim, de les proteases presents en la preparació, o de factors que inhibeixin l'activitat enzimàtica. El paper de les proteases és molt clar en aquest cas, ja que les preparacions de l'enzim pur acostumen a tenir una mitjana d'estabilitat de fins tres mesos. En molts dels casos estudiats, la davallada en l'activitat ADH que s'inicia a partir del moment de preparada la mostra, s'atura i fins i tot s'inverteix, el setè dia després d'efectuat l'homogenat. Aquest fet, que s'observa també amb l'enzim pur, podria obeir a algun tipus d'estabilització de l'enzim en la solució .

3.4. DETERMINACIÓ DEL pH ÒPTIM DE L'ENZIM.

La determinació del pH òptim d'activitat es va realitzar amb homogenats en tampó Tris-HCl 20mM, en cada un dels pH assajats, així com solucions de NAD^+ i isopropanol en el tampó corresponent a cada pH.

Hi ha dos tipus d'espècies, segons es pot deduir de les dades presentades en la taula 3.5. Les primeres

Drosophila pavani

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.3354	0.3612	0.3483	100.0
2	0.2709	0.2838	0.2773	79.61
3	0.2580	0.2580	0.2580	74.07
4	0.2580	0.2580	0.2580	74.07
7	0.3220	0.3350	0.3285	94.31
10	0.2193	0.2322	0.2257	64.80
15	0.2064	----	0.2064	59.25

Drosophila gaucha

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.2838	0.2709	0.2773	100.0
2	0.2451	0.2515	0.2483	89.54
3	0.2064	0.2451	0.2257	81.39
4	0.1612	0.1354	0.1483	53.48
7	0.1935	0.1806	0.1870	67.43
10	0.1419	0.1290	0.1345	48.50
15	0.0709	----	0.0709	25.57

Drosophila hydei

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.3741	0.3354	0.3547	100.0
2	0.3483	----	0.3483	98.18
3	0.3483	----	0.3483	98.18
4	0.2818	0.3354	0.3096	87.27
7	0.3483	0.3225	0.3354	94.54
10	0.3096	0.3096	0.3096	87.27
15	0.2580	0.2838	0.2709	76.36

Drosophila burlai

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.0580	0.0645	0.0612	48.57
2	0.1419	0.1032	0.1261	100.0
3	0.0645	0.0903	0.0774	61.38
4	0.0580	0.0903	0.0741	58.76
7	0.1161	0.1225	0.1193	94.60
10	0.0774	0.0967	0.0870	68.99
15	0.0645	0.0580	0.0612	48.53

Drosophila greeni

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.0387	-----	0.0387	100.0
2	0.0903	0.0580	0.0741	88.42
3	0.0580	0.0516	0.0580	69.21
4	0.0387	0.0387	0.0387	46.18
7	0.0387	-----	0.0387	46.18
10	-----	-----	-----	---

Drosophila kikkawai

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.1161	0.0580	0.0870	100.0
2	0.0516	0.0541	0.0528	60.76
3	0.0516	0.0387	0.0451	51.86
4	0.0645	0.0516	0.0583	66.97
7	0.0451	0.0451	0.0451	51.81
10	0.0387	0.0258	0.0322	37.04
15	0.0258	0.0283	0.0270	31.01

Drosophila subobscura

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.1290	0.1032	0.1161	100.0
2	0.1032	0.0967	0.0999	87.00
3	0.1032	0.0967	0.0999	87.00
4	0.0967	0.0967	0.0967	86.00
7	0.1096	0.1032	0.1064	91.64
10	0.0774	0.0838	0.0806	69.42
15	0.0645	0.0516	0.0580	49.95

Drosophila guanche

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.0774	-----	0.0774	100.0
2	0.0774	0.0650	0.0712	91.99
3	0.0774	0.0645	0.0709	91.66
4	0.0580	0.0709	0.0644	83.27
7	0.0645	0.0619	0.0632	81.66
10	0.0516	0.0645	0.0580	74.93
15	0.0516	-----	0.0516	66.66

Drosophila bocqueti

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.0774	0.0903	0.0838	74.25
2	0.0967	0.1032	0.0999	88.60
3	0.1032	0.1225	0.1128	100.0
4	0.0709	0.0812	0.0761	67.44
7	0.0774	0.0838	0.0806	71.42
10	0.0709	0.0774	0.0741	65.66
15	0.0516	0.0580	0.0548	48.56

Drosophila willistoni

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.1419	0.1032	0.1225	100.0
2	0.0770	0.0900	0.0835	68.16
3	0.0709	0.0903	0.0806	65.80
4	0.0774	0.0709	0.0741	60.49
7	0.0580	0.0709	0.0644	52.57
10	0.0451	0.0490	0.0470	38.36
15	0.0258	----	0.0258	21.06

Drosophila phalerata

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.0516	0.0516	0.0516	100.0
2	0.0516	----	0.0516	100.0
3	0.0387	0.0516	0.0451	87.50
4	0.0451	0.0425	0.0438	85.00
7	0.0516	0.0516	0.0516	100.0
10	0.0354	0.0387	0.0354	68.60
15	0.0129	0.0193	0.0161	31.25

Drosophila littoralis

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.0838	----	0.0838	100.0
2	0.0451	0.0774	0.0612	73.03
3	0.0387	----	0.0387	46.18
4	0.0193	0.0258	0.0225	26.85
7	0.0387	0.0322	0.0354	42.30
10	0.0193	0.0232	0.0212	25.29
15	0.0193	0.0193	0.0193	23.09

Drosophila mauritiana

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.0645	0.0903	0.0774	100.0
2	0.0838	0.0580	0.0709	91.60
3	0.0516	0.0516	0.0516	66.66
4	0.0258	0.0322	0.0290	37.46
7	0.0129	0.0193	0.0161	20.60
10	0.0258	0.0258	0.0258	33.33
15	0.0193	0.0258	0.0225	29.06

Drosophila yakuba

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.1032	0.0903	0.0967	100.0
2	0.0903	0.0774	0.0838	86.66
3	0.0645	0.0516	0.0580	59.98
4	0.0322	0.0258	0.0290	29.99
7	0.0258	0.0129	0.0193	19.96
10	0.0193	0.0193	0.0193	19.96
15	0.0193	0.0193	0.0193	19.96

Drosophila erecta

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	0.1677	0.1419	0.1548	100.0
2	0.1548	0.1161	0.1354	87.48
3	0.1419	0.1419	0.1419	91.20
4	0.1225	0.1264	0.1244	80.36
7	0.1161	0.0838	0.0999	64.53
10	0.0774	0.0516	0.0645	41.66
15	0.0516	0.0516	0.0516	33.33

Drosophila teissieri

<u>dies</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
1	----	0.1419	0.1419	100.0
2	0.1419	0.1290	0.1354	91.54
3	0.1225	0.1161	0.1193	80.66
4	0.0774	0.0903	0.0838	56.66
7	0.0387	0.0387	0.0387	26.16
10	0.0258	0.0258	0.0258	17.44
15	0.0258	0.0193	0.0225	15.21

TAULA 3.4.(d) Lectures espectrofotomètriques corresponents a l'estabilitat de l'enzim en extracte cru conservat a 4 °C (unitats/ml)

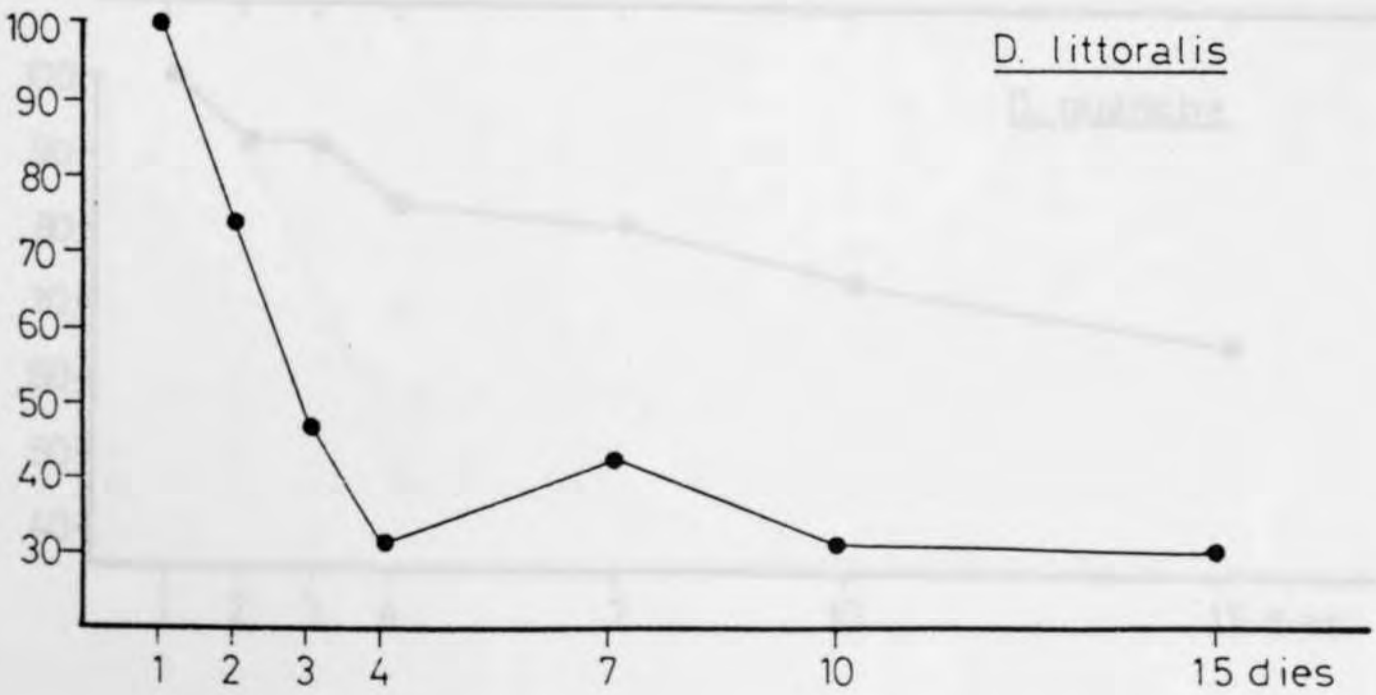
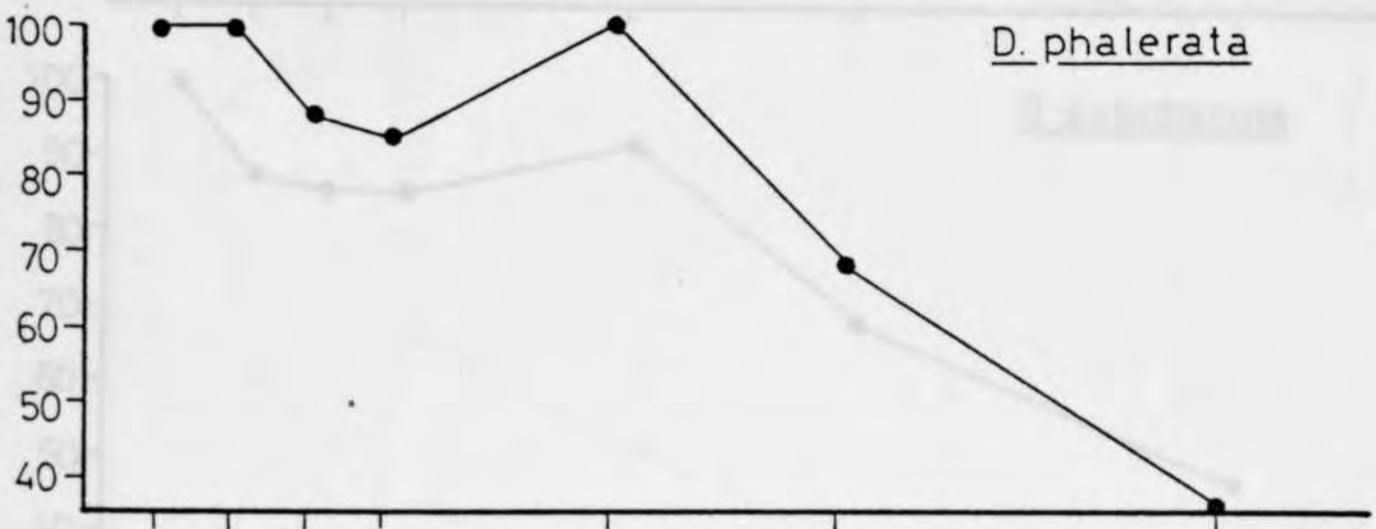
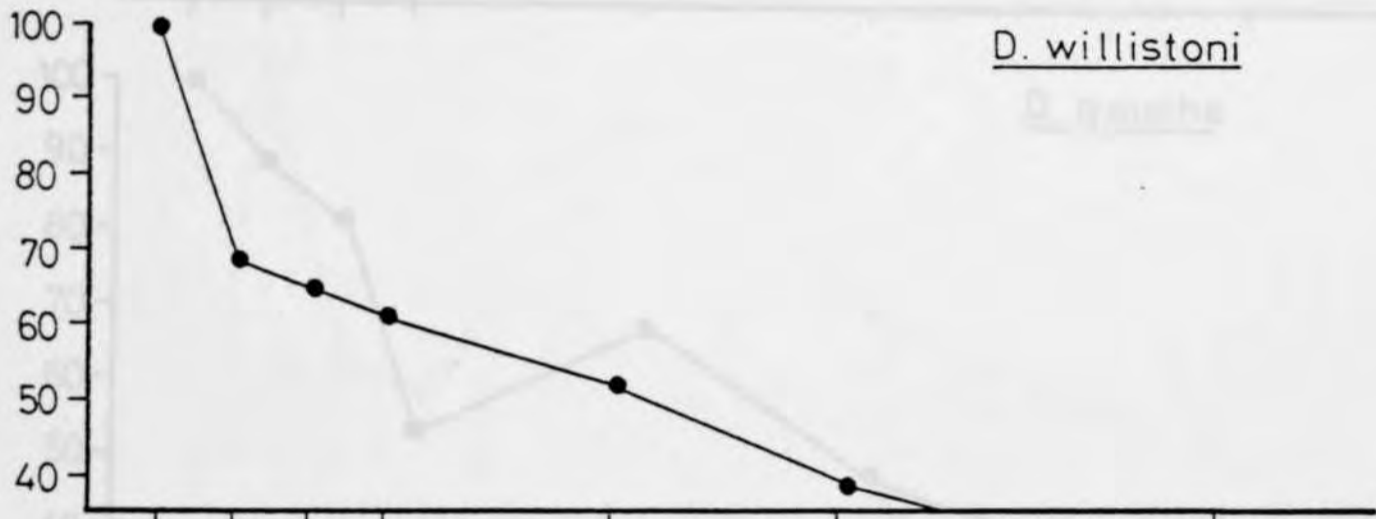
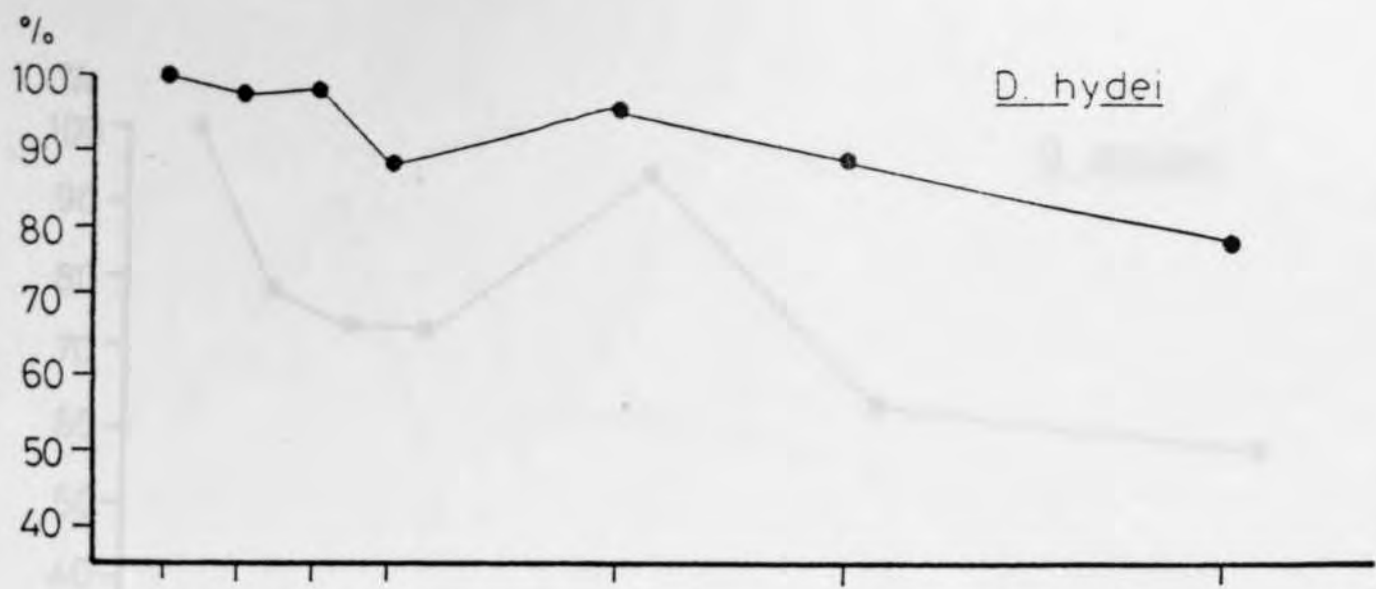


FIGURA 3.4. (a)

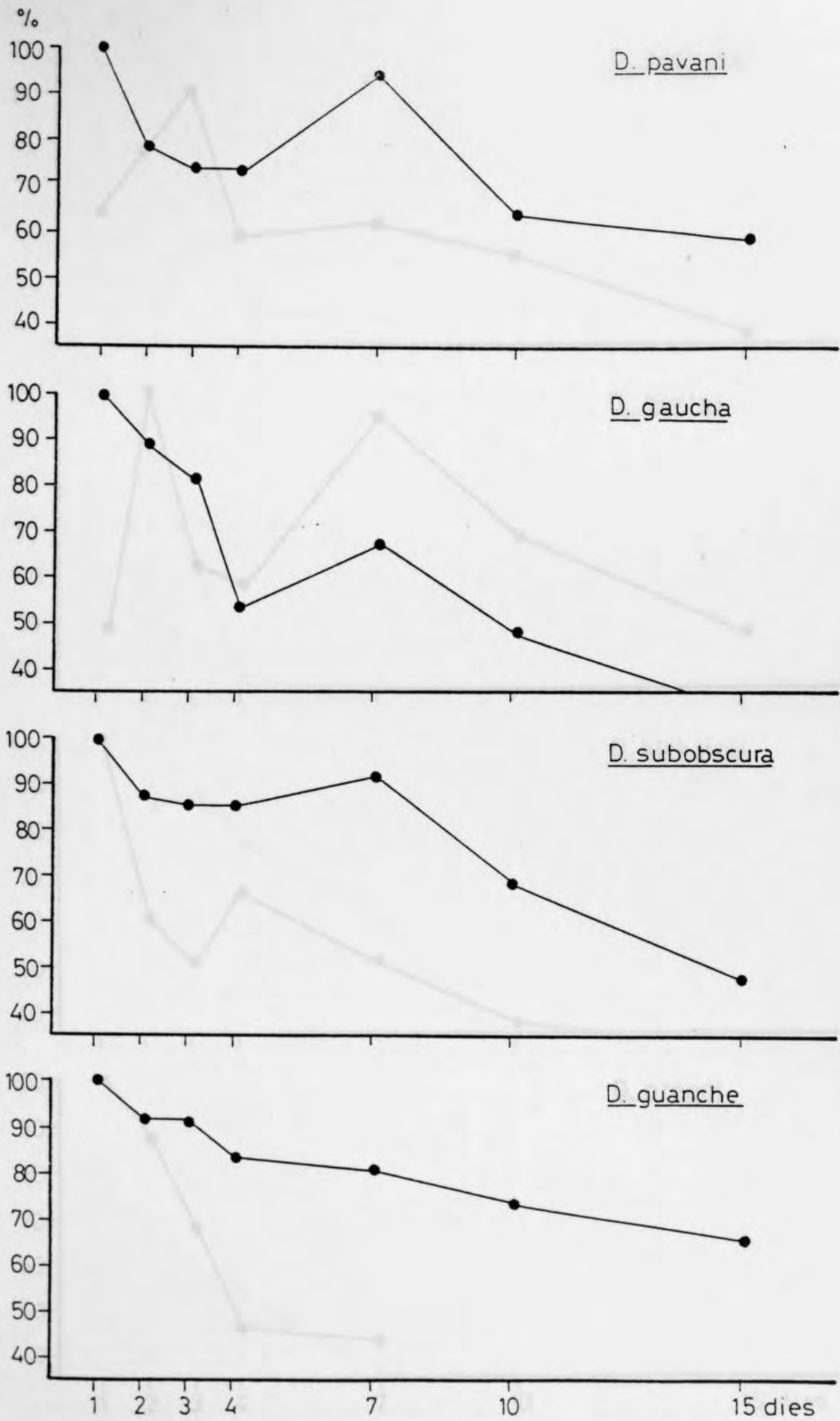


FIGURA 3.4. (b)

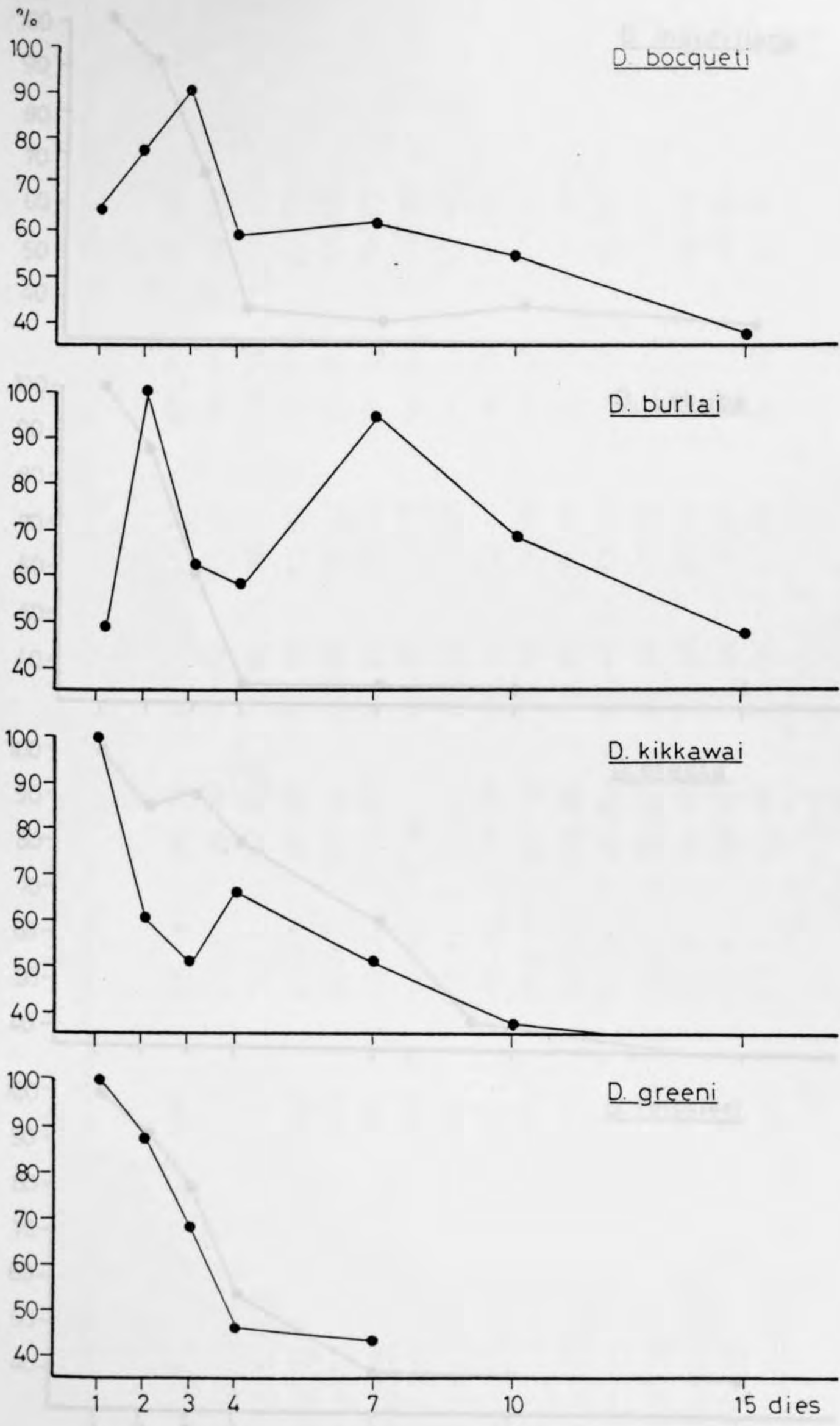


FIGURA 3.4. (c).

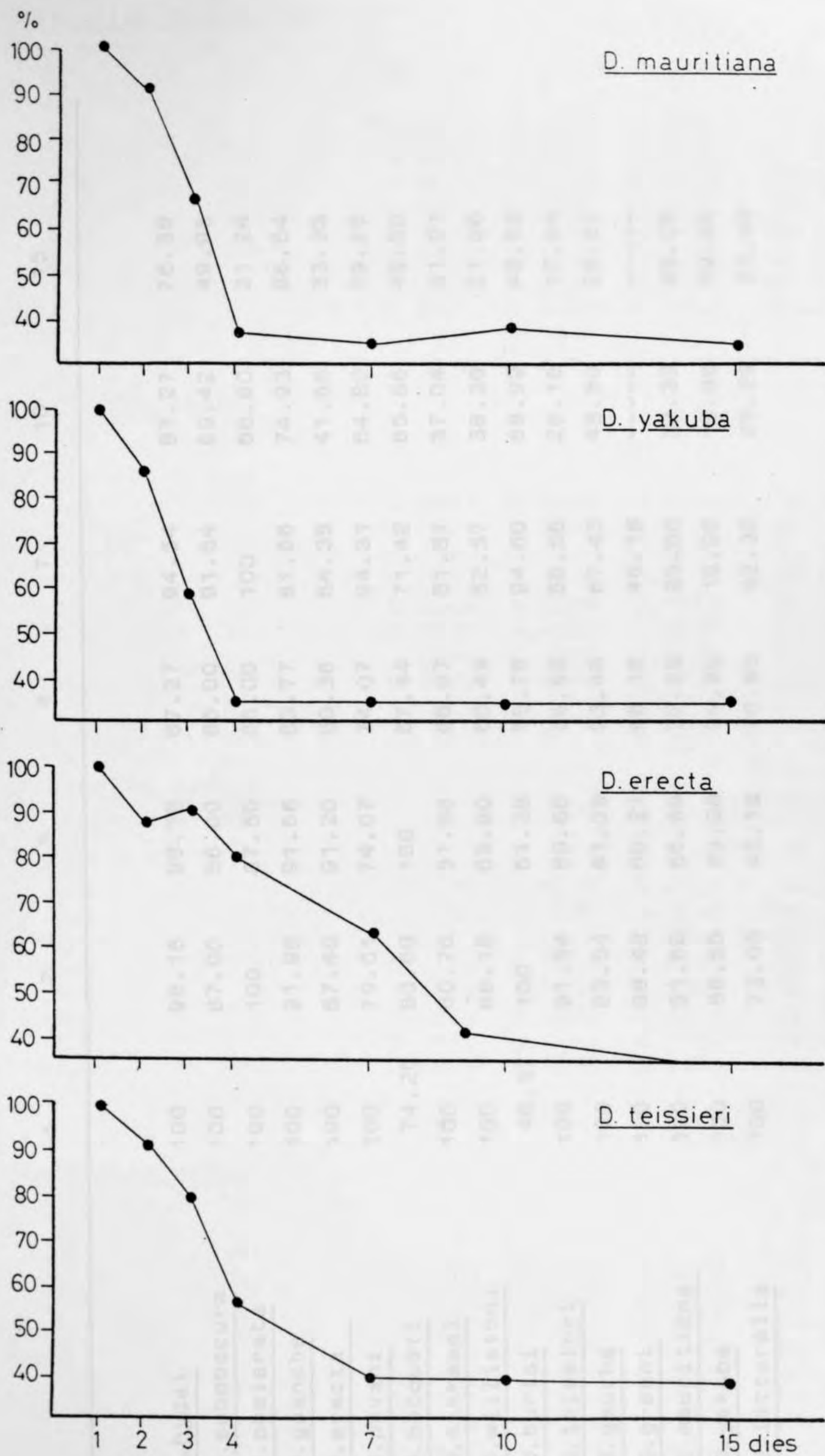


FIGURA 3.4. (d). Estabilitat de l'enzim ADH de cada una de les espècies, en homogenat cru i durant un període de 15 dies. L'activitat ADH s'expressa com % del màxim.

ESPÈCIES

ACTIVITAT 1-15 DIES DESPRÉS DE L'HOMOGENITZACIÓ (%)

	1	2	3	4	7	10	15
<u>D. hydei</u>	100	98.18	98.18	87.27	94.54	87.27	76.36
<u>D. subobscura</u>	100	87.00	86.00	86.00	91.54	69.42	49.95
<u>D. phalerata</u>	100	100	87.50	85.00	100	68.60	31.24
<u>D. guanche</u>	100	91.99	91.66	83.77	81.66	74.93	66.64
<u>D. erecta</u>	100	87.48	91.20	80.36	64.35	41.66	33.33
<u>D. pavani</u>	100	79.61	74.07	74.07	94.31	64.80	59.25
<u>D. bocqueti</u>	74.25	88.60	100	67.44	71.42	65.66	48.56
<u>D. kikkawai</u>	100	60.76	51.86	66.97	51.81	37.04	31.01
<u>D. willistoni</u>	100	68.16	65.80	60.49	52.57	38.36	21.06
<u>D. burlai</u>	48.57	100	61.38	58.76	94.60	68.99	48.53
<u>D. teissieri</u>	100	91.54	80.66	56.66	56.56	26.16	17.44
<u>D. gaucha</u>	100	89.54	81.39	53.48	67.43	48.50	25.57
<u>D. greeni</u>	100	88.42	69.21	46.18	46.18	-----	-----
<u>D. mauritiana</u>	100	91.60	66.66	37.66	20.80	33.33	29.06
<u>D. yakuba</u>	100	86.66	59.98	29.99	19.96	19.96	19.96
<u>D. littoralis</u>	100	73.03	46.18	26.85	42.30	25.29	23.09

TAULA 3.4. Estabilitat de l'enzim ADH en homogenat cru.

L'activitat màxima s'expressa com a 100%, i els altres valors hi estan referits.

Drosophila willistoni

<u>pH</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
6.5	0.0322	0.0322	0.0322	7.57
7.0	0.2838	0.3096	0.2967	69.68
7.5	0.4515	0.3612	0.4063	95.43
8.0	0.4128	0.4386	0.4258	100.0
8.5	0.3999	0.3999	0.3999	93.94
9.0	0.3870	0.3870	0.3870	90.89
9.5	0.3870	0.3335	0.3705	87.01
10.0	0.3483	0.3225	0.3354	78.77

1 pic: 8.0

Drosophila pavani

<u>pH</u>				
6.5	0.0200	0.0100	0.0150	6.50
7.0	0.1806	0.1741	0.1773	59.70
7.5	0.2060	0.2000	0.2030	68.35
8.0	0.1810	0.2260	0.2030	68.35
8.5	0.1740	0.2200	0.1970	66.32
9.0	0.2970	0.2200	0.2585	87.03
9.5	0.2840	0.3100	0.2970	100.0
10.0	0.2580	0.2970	0.2775	93.43

1 pic: 8.0

2 pic: 9.5

Drosophila gaucha

<u>pH</u>				
6.5	0.0190	0.0200	0.0195	4.38
7.0	0.2193	0.1935	0.2064	46.40
7.5	0.2703	0.2581	0.2642	59.40
8.0	0.2967	0.3096	0.3031	68.15
8.5	0.3676	0.3096	0.3386	76.12
9.0	0.2838	0.2709	0.2773	62.34
9.5	0.3887	0.3612	0.3741	84.10
10.0	0.4644	0.4257	0.4448	100.0

1 pic: 8.5

2 pic: 10.0

Drosophila hydei

<u>pH</u>				
6.5	0.0350	0.0400	0.0483	8.32
7.0	0.4128	0.3870	0.1999	68.89
7.5	0.4386	0.4128	0.4257	73.33
8.0	0.4773	0.5805	0.5289	91.11
8.5	0.5160	0.6450	0.5805	100.0
9.0	0.4128	0.5031	0.4580	78.90
9.5	0.4128	0.4386	0.4257	73.33
10.0	0.3870	0.4386	0.4128	71.11

1 pic: 8.5

TAULA 3.5. (a)



Drosophila littoralis

<u>pH</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
6.5	0.0322	0.0387	0.0354	10.16
7.0	0.1806	0.1741	0.1773	50.90
7.5	0.2709	0.2515	0.2612	75.00
8.0	0.3483	0.3483	0.3483	100.0
8.5	0.3225	0.3354	0.3289	94.43
9.0	0.2580	0.2580	0.2580	74.07
9.5	0.2193	0.1870	0.2031	58.31
10.0	0.2451	0.1677	0.2064	59.26

1 pic: 8.0

Drosophila subobscura

<u>pH</u>				
6.5	0.0322	0.0258	0.0290	7.18
7.0	0.2193	0.1677	0.1935	47.62
7.5	0.2451	0.2322	0.2386	58.72
8.0	0.2322	0.2838	0.2580	63.50
8.5	0.2322	0.2580	0.2451	60.32
9.0	0.2967	0.2580	0.2774	68.27
9.5	0.3870	0.4257	0.4063	100.0
10.0	0.3096	0.4128	0.3612	88.90

1 pic: 8.0

2 pic: 9.5

Drosophila guanche

<u>pH</u>				
6.5	0.0348	0.0387	0.0367	10.57
7.0	0.2322	0.2064	0.2193	62.96
7.5	0.2838	0.2967	0.2902	83.32
8.0	0.3125	0.3031	0.3128	89.81
8.5	0.2967	0.3225	0.3096	88.89
9.0	0.2838	0.3612	0.3225	92.59
9.5	0.3612	0.3354	0.3483	100.0
10.0	0.2967	----	0.2967	85.18

1 pic: 8.0

2 pic: 9.5

Drosophila kikkawai

<u>pH</u>				
6.5	0.0129	0.0129	0.0129	5.40
7.0	0.0387	0.0387	0.0387	16.22
7.5	0.0516	0.0516	0.0516	21.62
8.0	0.0516	0.0387	0.0451	18.90
8.5	0.1161	0.1548	0.1354	56.74
9.0	0.1419	0.1548	0.1483	62.15
9.5	0.1806	0.2064	0.1926	80.72
10.0	0.2451	0.2322	0.2386	100.0

1 pic: 7.5

2 pic: 10.0

Drosophila burlai

<u>pH</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
6.5	0.0129	0.0129	0.0129	4.16
7.0	0.1419	0.1419	0.1419	45.83
7.5	0.1548	0.1419	0.1483	47.90
8.0	0.1806	0.1935	0.1870	60.40
8.5	0.1806	0.1419	0.1612	52.06
9.0	0.2580	0.2709	0.2644	85.40
9.5	0.3096	----	0.3096	100.0
10.0	0.2580	0.2838	0.2709	87.50
	1 pic: 8.0		2 pic: 9.5	

Drosophila bocqueti

<u>pH</u>				
6.5	0.0129	0.0129	0.0129	4.25
7.0	0.0903	0.1032	0.0969	31.97
7.5	0.0903	0.1161	0.1032	34.05
8.0	0.1161	0.1161	0.1161	38.30
8.5	0.1806	0.1548	0.1677	55.33
9.0	0.1935	0.1935	0.1935	63.84
9.5	0.3096	0.2967	0.3031	100.0
10.0	0.3225	0.2709	0.2967	97.81
	1 pic: 9.5			

Drosophila greeni

<u>pH</u>				
6.5	0.0129	0.0129	0.0129	6.66
7.0	0.0645	0.0645	0.0645	33.33
7.5	0.0722	0.0709	0.0715	36.95
8.0	0.0903	0.0903	0.0903	46.66
8.5	0.0774	0.1096	0.0935	48.32
9.0	0.1290	0.1161	0.1225	63.30
9.5	0.1935	0.1935	0.1935	100.0
10.0	0.1419	----	0.1419	73.33
	1 pic: 9.5			

Drosophila yakuba

<u>pH</u>				
6.5	0.0387	0.0258	0.0322	8.32
7.0	0.2451	0.2838	0.2644	68.32
7.5	0.2967	0.2838	0.2902	74.98
8.0	0.3096	0.2838	0.2967	76.66
8.5	0.4128	0.3612	0.3870	100.0
9.0	0.3354	0.2838	0.3096	80.00
9.5	0.3775	0.2838	0.3275	84.65
10.0	0.3354	----	0.3354	86.66
	1 pic: 8.5		2 pic: 10.0	

Drosophila erecta

<u>pH</u>	<u>prova 1</u>	<u>prova 2</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>%</u>
6.5	0.0451	0.0387	0.0419	12.02
7.0	0.2580	0.2580	0.2580	74.07
7.5	0.2580	0.3225	0.2902	83.32
8.0	0.3870	0.3096	0.3483	100.0
8.5	0.2580	0.2838	0.2709	77.77
9.0	0.2709	0.2580	0.2646	75.94
9.5	0.2838	0.2322	0.2580	74.07
10.0	0.1806	----	0.1806	51.85

1 pic: 8.0

Drosophila mauritiana

<u>pH</u>				
6.5	0.0903	0.0516	0.0709	20.74
7.0	0.2838	0.2967	0.2902	84.90
7.5	0.2967	0.2902	0.2934	87.57
8.0	0.2967	0.3870	0.3418	100.0
8.5	0.2838	0.2580	0.2709	79.25
9.0	0.3225	0.2580	0.2903	84.90
9.5	0.3225	0.2709	0.2967	86.80
10.0	0.2322	----	0.2322	67.93

1 pic: 8.0

2 pic: 9.5

Drosophila teissieri

<u>pH</u>				
6.5	0.0258	0.0258	0.0258	6.89
7.0	0.1935	0.2193	0.2064	55.06
7.5	0.2322	0.2580	0.2515	67.22
8.0	0.2322	0.2709	0.2515	67.22
8.5	0.3225	0.3225	0.3225	86.20
9.0	0.3483	0.3612	0.3547	94.81
9.5	0.3870	0.3612	0.3741	100.0
10.0	0.3612	----	0.3612	89.65

1 pic: 9.5

TAULA 3.5. (d) Lectures espectrofotomètriques corresponents a les determinacions de pH òptim (unitats/ml).

ESPÈCIES	pH ÒPTIM	ESPÈCIES	pH ÒPTIM
<u>D. erecta</u>	8.0	<u>D. kikkawai</u>	7.5 10.0
<u>D. littoralis</u>	8.0	<u>D. burlai</u>	8.0 9.5
<u>D. willistoni</u>	8.0	<u>D. subobscura</u>	8.0 9.5
<u>D. hydei</u>	8.5	<u>D. guanche</u>	8.0 9.5
<u>D. bocqueti</u>	9.5	<u>D. pavani</u>	8.0 9.5
<u>D. greeni</u>	9.5	<u>D. mauritiana</u>	8.0 9.5
<u>D. teissieri</u>	9.5	<u>D. yakuba</u>	8.5 10.0
		<u>D. gaucha</u>	8.5 10.0

TAULA 3.5. pH òptims de l'ADH de diferents espècies.

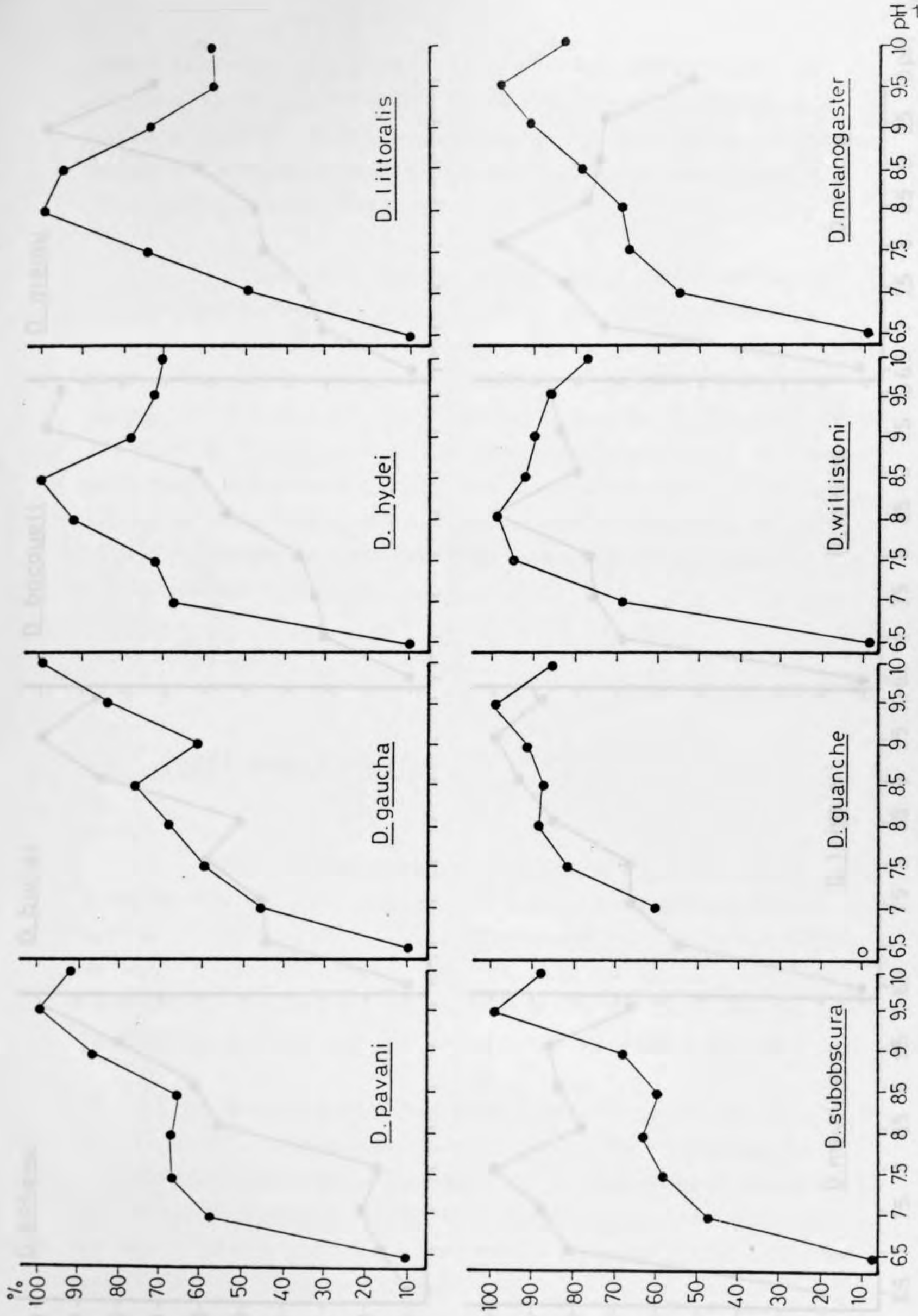


FIGURA 3.5. (a)

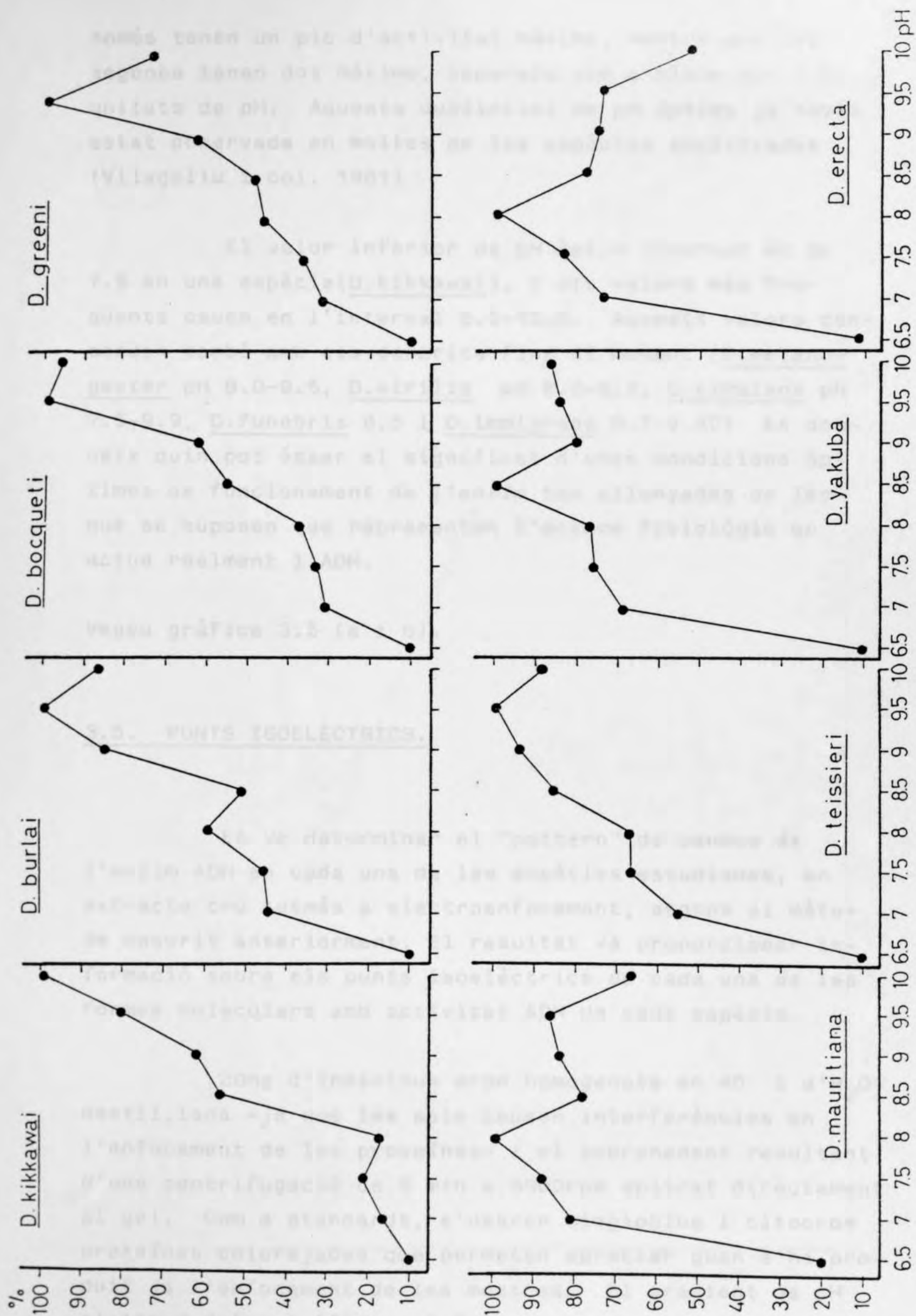


FIGURA 3.5.(b). pH òptim de l'ADH de cada una de les espècies, en homogenat en tampó Tris-HCl.

Nivells d'activitat com % respecte el màxim.

només tenen un pic d'activitat màxima, mentre que les segones tenen dos màxims, separats com a mínim per 1.5 unitats de pH. Aquesta duplicitat de pH òptims ja havia estat observada en moltes de les espècies analitzades (Vilageliu i col. 1981)

El valor inferior de pH òptim observat és de 7.5 en una espècie (D.kikkawai), i els valors més freqüents cauen en l'interval 8.0-10.0. Aquests valors concorden també amb els descrits fins el moment (D.melanogaster pH 8.0-9.5, D.virilis pH 8.0-9.5, D.simulans pH 7.5-9.9, D.funebris 8.6 i D.immigrans 8.7-9.45) Es desneix quin pot ésser el significat d'unes condicions òptimes de funcionament de l'enzim tan allunyades de les que se suposen que representen l'entorn fisiològic on actua realment l'ADH.

Vegeu gràfica 3.5 (a i b).

3.5. PUNTS ISOELÈCTRICS.

Es va determinar el "pattern" de bandes de l'enzim ADH en cada una de les espècies estudiades, en extracte cru sotmés a electroenfocament, segons el mètode descrit anteriorment. El resultat va proporcionar informació sobre els punts isoelèctrics de cada una de les formes moleculars amb activitat ADH de cada espècie.

20mg d'individus eren homogenats en 40 l d'H₂O destil.lada -ja que les sals causen interferències en l'enfocament de les proteïnes- i el sobrenedant resultant d'una centrifugació de 5 min a 5000rpm aplicat directament al gel. Com a standards, s'usaren mioglobina i citocrom proteïnes colorejades que permeten apreciar quan s'ha produït ja l'enfocament de les mostres. El gradient de pH al llarg del gel (figura 3.6.) es va mesurar amb electrodes de contacte, i la recta de regressió construïda, va

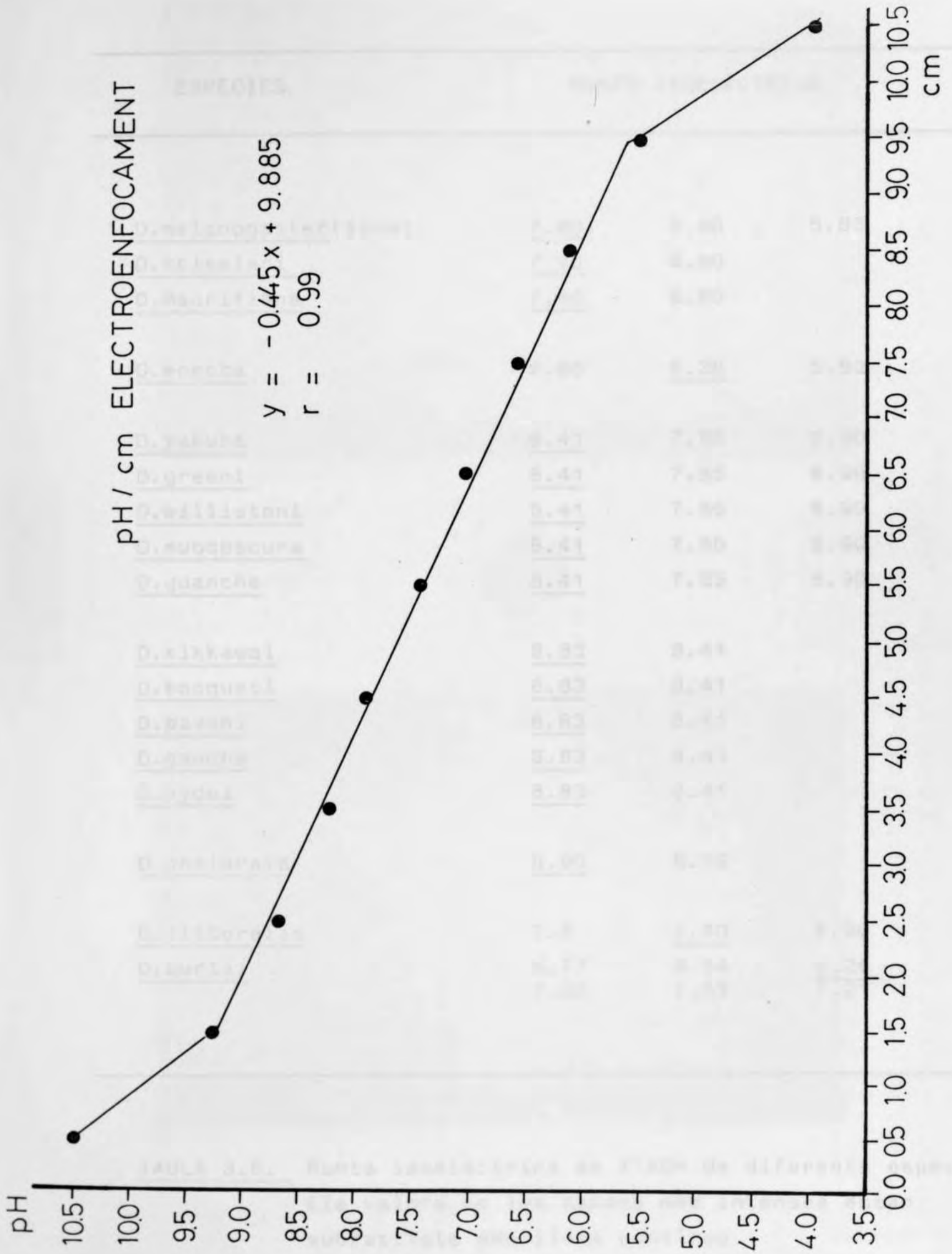
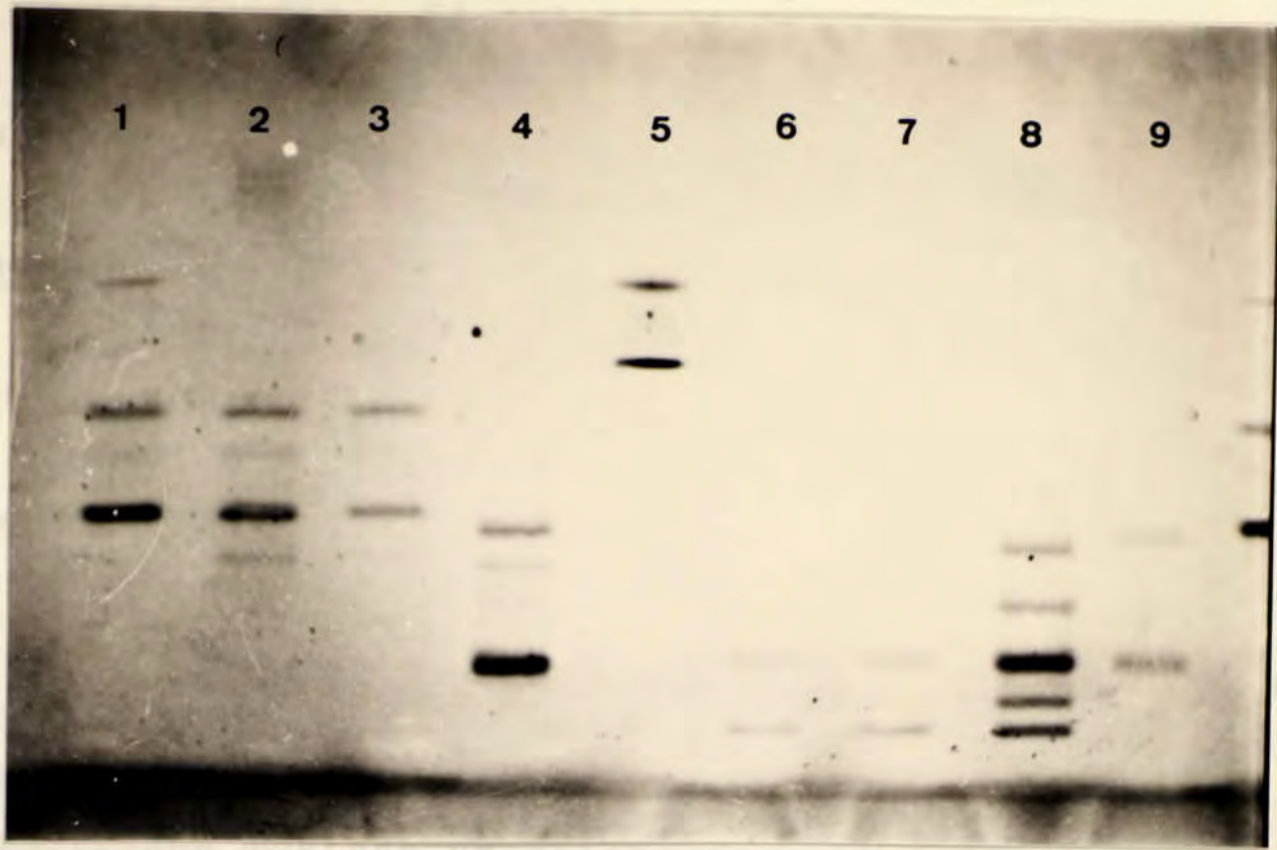


FIGURA 3.6. Recta de regressió pH/distància de migració en gel d'electroenfocament.

ESPÈCIES	PUNTS ISOELÈCTRICS		
<u>D.melanogaster</u> (slow)	<u>7.40</u>	6.80	5.83
<u>D.teissieri</u>	<u>7.40</u>	6.80	
<u>D.mauritiana</u>	<u>7.40</u>	6.80	
<u>D.erecta</u>	6.80	<u>6.38</u>	5.83
<u>D.yakuba</u>	<u>8.41</u>	7.55	6.90
<u>D.greeni</u>	<u>8.41</u>	7.55	6.90
<u>D.willistoni</u>	<u>8.41</u>	7.55	6.90
<u>D.subobscura</u>	<u>8.41</u>	7.55	6.90
<u>D.guanche</u>	<u>8.41</u>	7.55	6.90
<u>D.kikkawai</u>	<u>8.83</u>	8.41	
<u>D.bocqueti</u>	<u>8.83</u>	8.41	
<u>D.pavani</u>	<u>8.83</u>	8.41	
<u>D.gaucha</u>	<u>8.83</u>	8.41	
<u>D.hydei</u>	<u>8.83</u>	8.41	
<u>D.phalerata</u>	<u>8.90</u>	8.56	
<u>D.littoralis</u>	7.5	<u>7.40</u>	6.90
<u>D.burlai</u>	8.77	8.54	8.26
	7.90	7.53	<u>7.21</u>

TAULA 3.6. Punts isoelèctrics de l'ADH de diferents espècies. Els valors de les bandes més intenses estan subratllats amb línia contínua.



- 1-D.melanogaster ADH^S
- 2-D.teissieri
- 3-D.mauritiana
- 4-D.yakuba
- 5-D.erecta
- 6-D.kikkawai

- 7-D.bocqueti
- 8-D.burlai
- 9-D.greeni
- 10-D.willistoni
- 11-D.gaucha
- 12-D.pavani

- 13-D.phalerata
- 14-D.littoralis
- 15-D.hydei
- 16-D.guanche
- 17-D.subobscura
- 18-D.melanogaster ADH^S

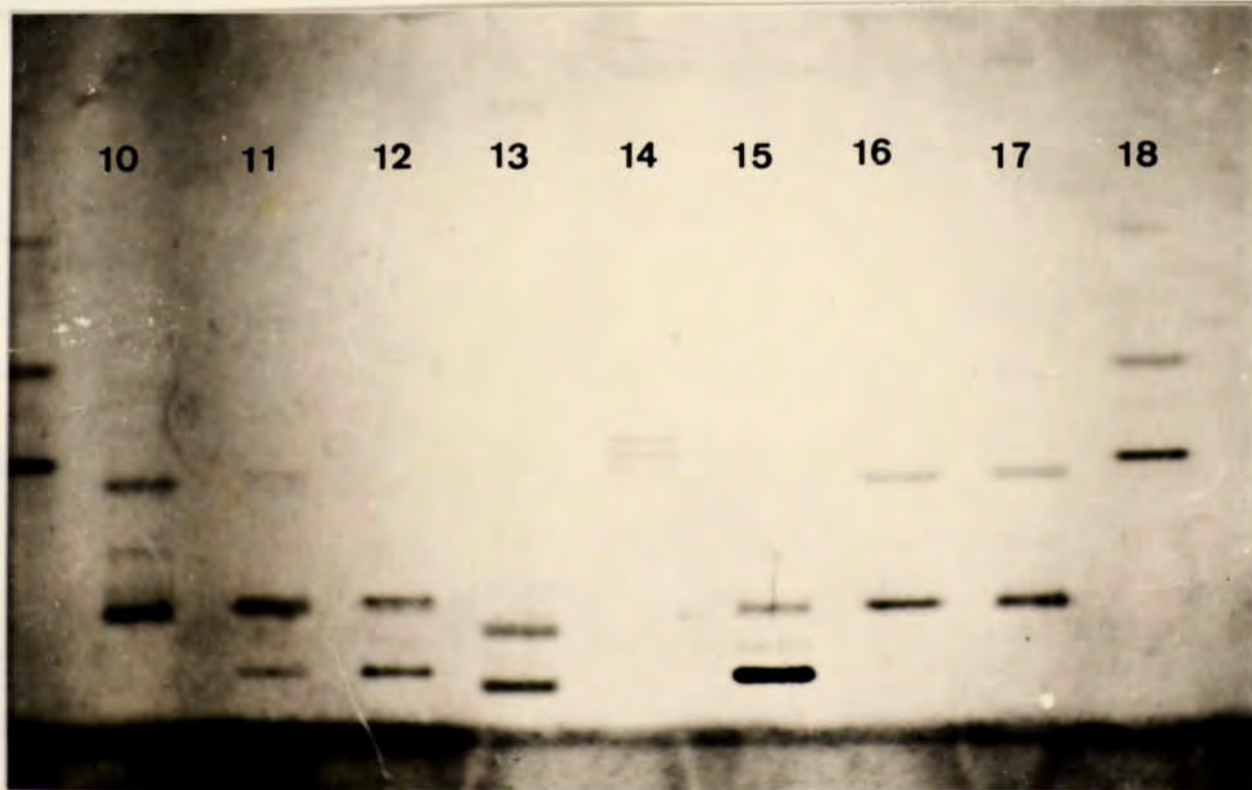


FIGURA 3.7. Gel d'electroenfocament i tinció específica per a ADH, on es poden apreciar les diferents bandes d'activitat per a cada espècie.

permetre la determinació dels pI corresponents a cada una de les bandes. El gel es va tenyir per activitat ADH. La intensitat de la tinció de les bandes es pot considerar un reflex dels nivells d'activitat relativa de cada un dels conformòmers d'una mateixa espècie.

D. melanogaster es va incloure com a control de la prova, i els valors obtinguts per a aquesta espècie concorden perfectament amb els descrits en la literatura : 6.3, 6.8, 7.5 (Juan, 1980: 6.6, 7.0, 7.5). Com a resum de resultats, vegeu taula 3.6 i figura 3.7.

D. melanogaster es caracteritza per una ADH relativament àcida. Només una altra espècie mostra una proteïna més electronegativa: D. erecta. D. teissieri i D. mauritiana mostren un espectre paral·lel a D. melanogaster. D. phalerata apareix com l'espècie amb una ADH de punt isoelèctric més elevat. Les restants espècies formen dos grans grups: D. yakuba, D. greeni, D. willistonii, D. subobscura i D. guanche per una banda i D. kikkawai, D. bocqueti, D. pavani, D. gaucha i D. hydei per una altra. Les consideracions sobre aquests resultats s'efectuaran en l'apartat de la discussió.

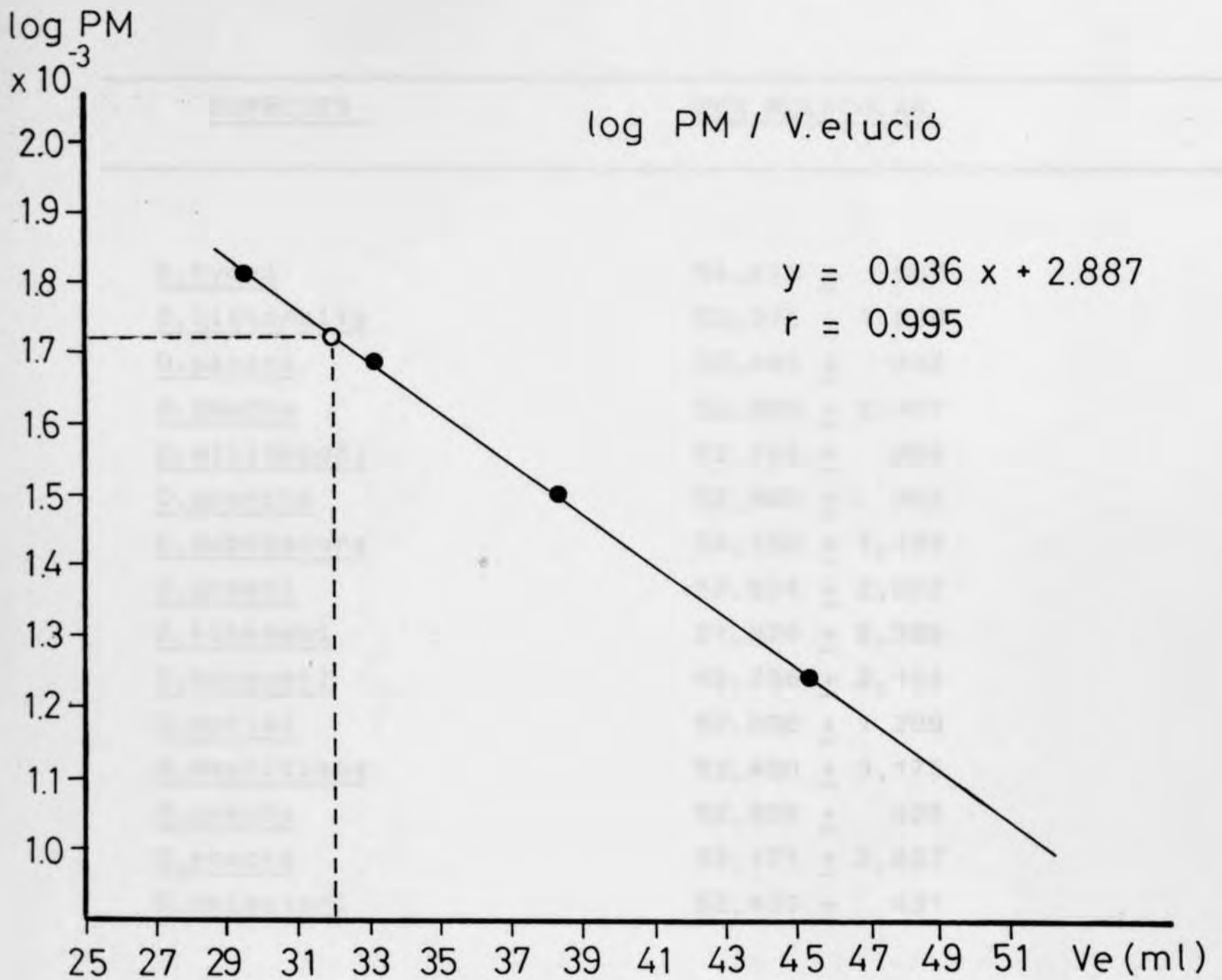
3.6. PES MOLECULAR DE L'ENZIM NADIU.

Per a la determinació del pes molecular de l'enzim nadiu de cada una de les espècies es va procedir a la filtració en gel G-75 SF de l'homogenat total. La corba de calibrat de la columna es va realitzar per a la determinació de la recta de regressió entre el logaritme del pes molecular dels marcadors i el seu volum d'elució.

El procés de preparació de la mostra va ésser el següent: es varen homogenar 1.5g de mosques en 2ml tampó Tris-HCl 20mM, pH 8.6 protegit amb un 0.2% de

2-mercaptoetanol i un 1: d'isopropanol (agents que preserven l'enzim de la degradació). Es centrifugà a 25000g durant 30min i el sobrenedant es filtrà per llana de vidre. Es precipità amb sulfat de protamina al 2% a raó de 14ml de sulfat de protamina per 100ml de mostra. Es tornà a centrifugar a 25000g durant 20min. El sobrenedant s'aplicava a la columna (volum aproximat de 0.5ml) junt amb una proteïna de pes molecular conegut com a standards intern. En aquest cas es va usar mioglobina, ja que el seu pes molecular és molt diferent de l'esperat per a l'ADH, tot evitant possibles interferències, i perquè en ésser una proteïna colorejada, permetia el seguiment de l'elució de la columna. Es varen determinar les fraccions que presentaven contingut en ADH per lectura espectrofotomètrica a 280nm i per lectura a 340nm d'activitat enzimàtica, i es va calcular el volum mitjà de l'elució de l'ADH. Amb aquest valor , i per mitjà de la corba de regressió (figura 3.8.) es va determinar en cada cas el pes molecular de la forma activa de l'enzim. Per a cada espècie es varen realitzar un mínim de dues proves independents.

Cap espècie mostra un valor que difereixi significativament del valor trobar per D,melanogaster (54000d) i que representa un dímer actiu format per 2 subunitats idèntiques de 27000d. Els resultats obtinguts permeten apreciar la gran homologia que presenta l'enzim ADH actiu en tot el gènere Drosophila ; (vegeu taula 3.7.)



PM	BSA	=	68.750	log	=	1.825	Ve	=	29.56 ± 0.14
PM	OA	=	45.000	log	=	1.695	Ve	=	33.14 ± 1.61
PM	AC	=	31.000	log	=	1.508	Ve	=	38.33 ± 0.29
PM	MG	=	17.800	log	=	1.259	Ve	=	45.28 ± 0.09

FIGURA 3.8. Recta de regressió entre el pes molecular d'una proteïna (el seu log) i el seu volum d'elució d'una columna de Sephadex G-75-SF, per a la determinació del pes molecular de la forma activa de l'enzim ADH.

<u>ESPÈCIES</u>	<u>PES MOLECULAR</u>
<u>D.hydei</u>	54,213 \pm 567
<u>D.littoralis</u>	52,376 \pm 1,838
<u>D.pavani</u>	52,445 \pm 452
<u>D.gauchae</u>	52,889 \pm 2,467
<u>D.willistoni</u>	52,165 \pm 956
<u>D.guanche</u>	52,840 \pm 343
<u>D.subobscura</u>	54,162 \pm 1,182
<u>D.greeni</u>	52,604 \pm 2,072
<u>D.kikkawai</u>	51,828 \pm 2,529
<u>D.bocqueti</u>	49,736 \pm 2,114
<u>D.burlai</u>	52,000 \pm 1,289
<u>D.mauritiana</u>	53,400 \pm 3,175
<u>D.yakuba</u>	52,909 \pm 928
<u>D.erecta</u>	53,171 \pm 2,857
<u>D.teissieri</u>	52,430 \pm 431

TAULA 3.7. Pes molecular de l'ADH de diferents espècies de Drosophila, determinat per filtració en columna de Sephadex-G 75-SF.

4. PURIFICACIÓ DE L'ADH DE CROSOPIA RAYEII

4.1. JUSTIFICACIÓ DE LA TRAJA DE L'ESPECTE

4.2. ESQUEMA DE PURIFICACIÓ

4.3. CRITERIS DE PURESA

-4-. PURIFICACIÓ DE L'ADH DE D.HYDEI

4. PURIFICACIÓ DE L'ADH DE D. HYDEI.

4. PURIFICACIÓ DE L'ADH DE DROSOPHILA HYDEI.

4.1. JUSTIFICACIÓ DE LA TRIA DE L'ESPÈCIE.

4.1. JUSTIFICACIÓ DE LA TRIA DE L'ESPÈCIE.

4.2. ESQUEMA DE PURIFICACIÓ.

4.3. CRITERIS DE PURESA.

L'espècie *D. hydei* pertany al gènere *Drosophila* (*Drosophilinae*, *Diptera*), *D. hydei* va ésser descrita per Sturtevant de 1921 (Sturtevant, 1943, Suria, 1951). És una espècie comuna, d'origen paleàrtic, que s'ha detectat en els mercats i habitatges domèstics, en la fruita fermentada, i que es captura també en la natura sense ésser associada a cap nínxol ecològic ben determinat. En una sèrie de estudis realitzats per recerca d'espècies nascudes a partir de fruites en fermentació recollides en mercats anglesos, Atkinson i Sturtevant (1977) assenyalen les següents dades: un 31,4% del total de *D. hydei* va néixer a partir de meló (*Cucumis melo*) i un 32,1% a partir del nyam (*Dioscorea sp.*); el 35% restant es dividia quasi equitativament entre llimona, taronja, anís, ceba, tomàquet i mango. En resum, els autors indiquen que *D. hydei* era una de les espècies menys específiques d'entre totes les analitzades.

En un altre estudi, aquest sobre les poblacions de *Drosophila* presents en els cellers (Mancós i Prevosti, 1978, 1979) s'assenyala aquesta espècie com a característic en ambients rics en alcohol, i concretament que l'espècie del grup *Repleta* més abundant dins dels cellers, *D. hydei* era la quarta espècie en ordre de freqüència d'individus recollits dins els cellers, després de *D. melanogaster*, *D. funebris* i *D. lebanonensis*.

En l'estudi general de les propietats de l'ADN de les poblacions de *Drosophila* de diferents espècies del gènere que s'ha presentat en el capítol passat, *D. hydei* és aquella que presenta més activitat, tant en el seu desenvolupament com en la seva capacitat de resistència a l'estrès i a l'oxidació. El seu ADN és de 10.5 i el seu pes molecular és de 10.5.

4. PURIFICACIÓ DE L'ADH DE D.HYDEI.

4.1. JUSTIFICACIÓ DE LA TRIA DE L'ESPÈCIE.

L'espècie D.hydei pertany al subgènere Drosophila, grup de la Repleta (Drosophílids, Dípters). D.hydei va ésser descrita per Sturtevant en 1921 (Patterson, 1943, Burla, 1951). És una espècie cosmopolita, d'origen paleàrtic, que s'ha detectat en els mercats i hàbitats domèstics, en la fruita fermentada, i que es captura també en la natura sense estar associada a cap nínxol ecològic ben determinat. En uns estudis realitzats per recompte d'espècies nascudes a partir de fruits en fermentació recollits en mercats anglesos, Atkinson i Shorrocks (1977) assenyalen les següents dades: un 31.4% del total de D.hydei va néixer a partir de meló (Cucumis melo) i un 33.1% a partir del nyam (Dioscorea sp.); el 35% restant es dividia quasi equitativament entre llimona, taronja, enciam, raïm, tomàquet i mango. En resum, els autors indicaven que D.hydei era una de les espècies menys específiques d'entre totes les analitzades.

En un altre estudi, aquest sobre les poblacions de Drosophila presents en els cellers (Monclús i Prevosti, 1978, 1979) s'assenyala aquesta espècie com a capturada en ambients rics en alcohol, i concretament com l'espècie del grup Repleta més abundant dins dels cellers. D.hydei era la quarta espècie en ordre de freqüència d'individus recollits dins els cellers, després de D.melanogaster, D.funnebris i D.lebanonensis.

En l'estudi general de les propietats de l'enzim ADH en diferents espècies del gènere que s'ha presentat en el capítol passat, D.hydei és aquella que presenta màxima activitat, tant en estadi larvari com adult, i també una major resistència a l'etanol i a l'isopropanol. El seu pH òptim és de 8.5 i el seu punt isoelèctric, rela-

tivament bàsic en comparació amb d'altres espècies: de 8.83 per a la banda de major intensitat. La seva estabilitat en extracte cru es presenta també com a òptima, ja que després de 15 dies de realitzada la preparació conserva el 76.36% d'activitat enzimàtica respecte el primer dia. Segons Monclús i Prevosti, "en ordre descendent de freqüències, les espècies aïllades en celleres són: D.melanogaster, D.funebris, D.lebanonensis, D.hydei, D.virilis, D.simulans, D. repleta i D.immigrans." En el laboratori del Departament de Genètica, s'havia purificat i caracteritzat l'enzim ADH de les espècies D.melanogaster, D.simulans, i D.virilis (Juan, Tesi Doctoral) i D.funebris i D.immigrans (Vilageliu, Tesi Doctoral); D.lebanonensis estava també essent estudiat. Per tant, hom va creure important de completar el quadre amb les dades de l'enzim d'un membre del grup Repleta present en els cellers. L'elecció de D.hydei en front a D.repleta deriva fonamentalment de tots els factors indicats anteriorment, així com el fet d'ésser una espècie molt estudiada des del punt de vista genètic.

La comparació i tractament de les dades de totes les espècies permetrà l'estudi de l'evolució d'aquesta proteïna dins del gènere i la correspondència d'aquesta evolució amb la del gènere en conjunt. Tambè s'ha d'intentar trobar una base molecular que justifiqui les diferències d'activitat ADH entre una espècie i altra, la resistència i tolerància als alcohols i la seva presència en hàbitats rics en etanol. En definitiva hom pretén d'establir un lligam, si és que existeix, entre les propietats bioquímico-estructurals de l'enzim i el nínxol ecològic que cada espècie és capaç d'ocupar en la natura.

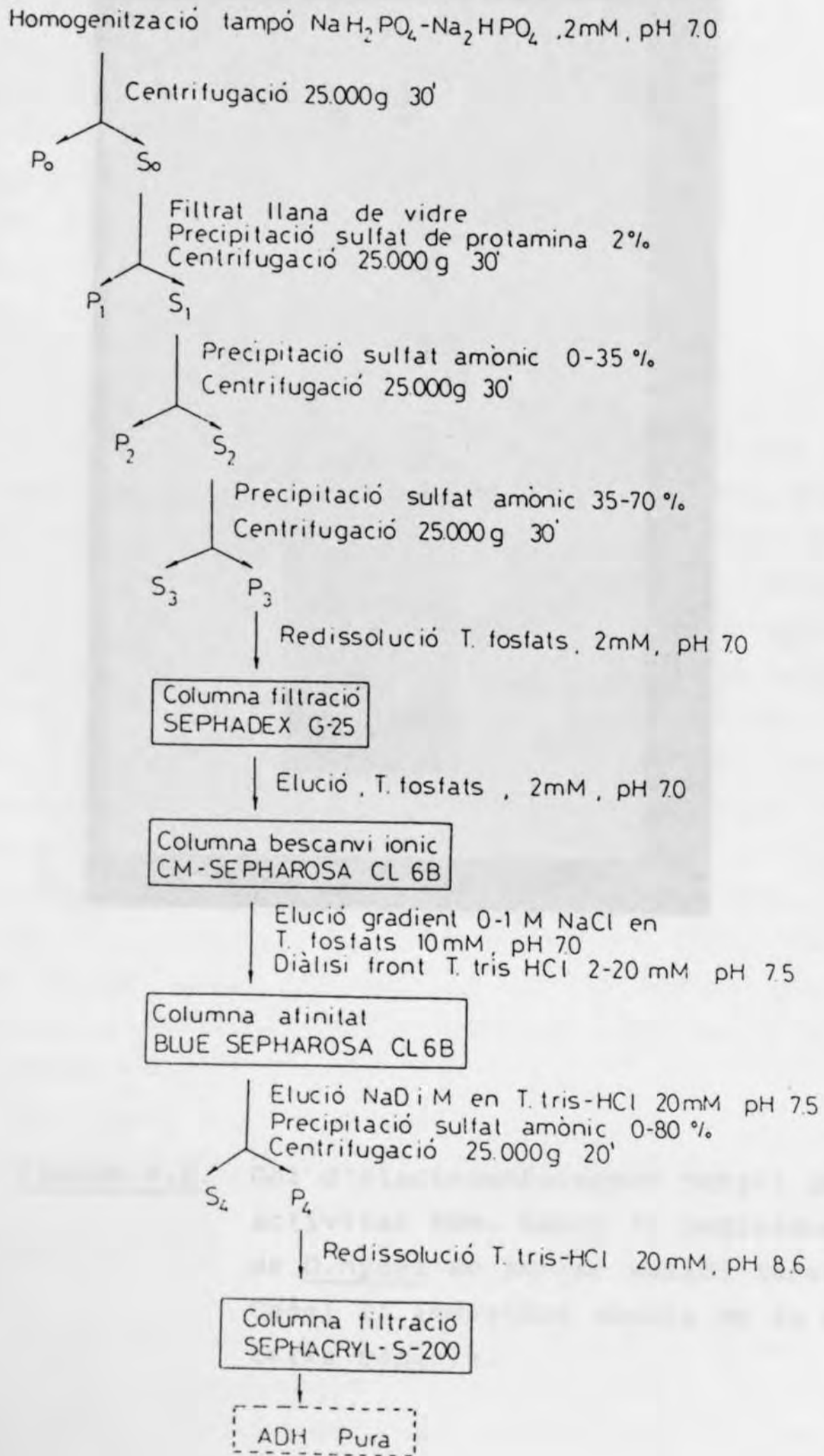


FIGURA 4.1. Esquema del procés complet de la purificació de l'enzim ADH de D.hydei.

4.2. ESQUEMA DE PURIFICACIÓ.

L'esquema seguit per a la purificació de l'enzim ADH de D. hydei segueix les directrius bàsiques del mètode...

Material

vidus en fa... moditats qu... En la figur... del i d'adu... equivalent... ció per act... im pur, du... sacions a p... primera pur... var la idon... tard, les purificacions es van estendre a 100g, 150g, i 200g de larves, sense observar en cap cas variacions substancials en el rendiment de l'operació i mai en la puresa del producte final.



FIGURA 4.2. Gel d'electroenfocament tenyit per activitat ADH. Canal 1: individus de D. hydei en tercer estadi larvari. Canal 2: individus adults de la mateixa espècie.

Precipitacions

Un pes conegut de larves del tercer estadi s'homogenitza en tampó fosfat (Na₂HPO₄-NaH₂PO₄), 2mM, pH 7.0, a un volum de 200ml de tampó per 100g d'individus. La homogenització s'efectua a 4°C, com tot el procés de la purificació...

4.2. ESQUEMA DE PURIFICACIÓ.

L'esquema seguit per a la purificació de l'enzim ADH de D.hydei segueix les directrius bàsiques del mètode posat a punt en el laboratori del Departament de Genètica per Juan (1980) i Vilageliu (1981), amb algunes modificacions introduïdes per tal d'adaptar-lo a les exigències de les característiques bioquímiques de la molècula ADH de l'espècie esmentada. En el diagrama de la figura 4.1. es poden apreciar els paràmetres i etapes bàsiques del procés.

Material

La purificació es va realitzar sempre amb individus en fase de larva del tercer estadi, donades les comoditats que oferia la seva recolecció enfront del adults. En la figura 4.2. es demostra com l'ADH de larva de D.hydei i d'adult de la mateixa espècie apareixen totalment equivalents, segons una prova d'electroenfocament i tinció per activitat específica. Per a l'obtenció de l'enzim pur, durant tot el treball es varen realitzar purificacions a partir de diferents quantitats de larves. Una primera purificació de 50g de larves va servir per comprovar la idoneïtat de l'esquema inicialment concebit. Més tard, les purificacions es varen estendre a 100g, 150g, i 200g de larves, sense observar en cap cas variacions substancials en el rendiment de l'operació i mai en la puresa del producte final.

Etapes de la purificació.

Precipitacions

Un pes conegut de larves del tercer estadi s'homogenitzen en tampó fosfats ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$), 2mM, pH7.0, a raó de 230ml de tampó per 100g d'individus. La homogenització -a 4°C, com tot el procés de la purificació- es realitzava en tres tandes d'1min de duració, separades

per intervals d'1min de repòs, en un Turmix domèstic. La mostra resultant es centrifuga a 25000g durant 30min. Aquest procés està destinat a separar les partícules sòlides de l'homogenat, principalment restes de les cobertes larvals i peces bucals. El sobrenedant de la centrifugació es filtra a través de llana de vidre per eliminar els acúmuls de greix qui hi suren. Es determina exactament el volum del filtrat i es precipita amb una solució de sulfat de protamina al 2%, a raó de 0.14ml/ml de mostra. El sulfat de protamina precipita els àcids nucleics. Es centrifuga a 25000g durant 30 min. Es recull el sobrenedant d'aquesta precipitació, es mesura de nou el volum total de la mostra i es precipita ara amb sulfat amònic, del 0 al 35% de saturació. El sulfat amònic provoca la precipitació de proteïnes de manera selectiva, és a dir, cada espècie proteica en disolució precipita a una determinada concentració de solut. De 0 a 35% no precipita l'ADH, de manera que s'aconsegueix amb aquesta primera precipitació una separació de totes les proteïnes presents en l'homogenat. Es centrifuga a 25000g durant 30min. i es recull el sobrenedant. Una segona precipitació amb sulfat amònic (del 35 al 70%) sí que actua sobre l'ADH, de manera que permet la seva precipitació, de manera que es centrifuga a 25000g durant 30 min i es desprecia el sobrenedant. El precipitat es redissol en un volum limitat del tampó inicial.

Heus aquí algunes observacions sobre aquests primers passos de la purificació:

-el pH del tampó fosfats ve determinat per la necessitat que la proteïna es trobi ionitzada al màxim quan en un pas posterior sigui introduïda en una columna de bescanvi iònic.

-un punt clau en la precipitació amb sulfat amònic és la lentitud de l'addició del solut a l'homogenat i la contínua agitació de la mostra fins i tot uns 20 min després

d'haver-hi afegit la totalitat del sulfat amònic.

-el pas immediatament posterior a l'etapa de les precipitacions consisteix en entrar la mostra a la primera columna de cromatografia; per tant, el màxim volum en què es pot redissoldre el precipitat és d'uns 50ml.

1ª Columna de Cromatografia: Filtració en gel.

La mostra s'introdueix en una columna de Sephadex G-25 M, de 4.5cm de \varnothing i 54cm de llargada, equilibrada amb tampó fosfats, 2mM, pH 7.0, el mateix en què es troba redissolta la mostra. Aquest és un gel inert, que permetrà la separació de la fracció proteïca de la mostra dels ions introduïts en les precipitacions i d'altres substàncies de menor pes molecular (p.e. pigments). La velocitat d'elució de la mostra és controlada post-columna per una bomba peristàltica de variació contínua de fluxe. La velocitat ideal per a aquesta cromatografia era la de 180ml hora, o elució a gravetat. La mostra sortida de columna passava successivament per un absorcímetre i un conductímetre acoplats a un registrador, i la col·lecció de fraccions es realitzava automàticament a raó de 5ml/tub. La presència d'activitat ADH en cada una de les fraccions es detectava per lectura espectrofotomètrica d'un alíquot mínim de la fracció i es reunien totes aquelles fraccions que en presentaven, per a proseguir la purificació.

L'esquema d'elució d'aquesta columna es pot veure en la figura 4.3.

2ª Columna de Cromatografia: Bescanvi iònic.

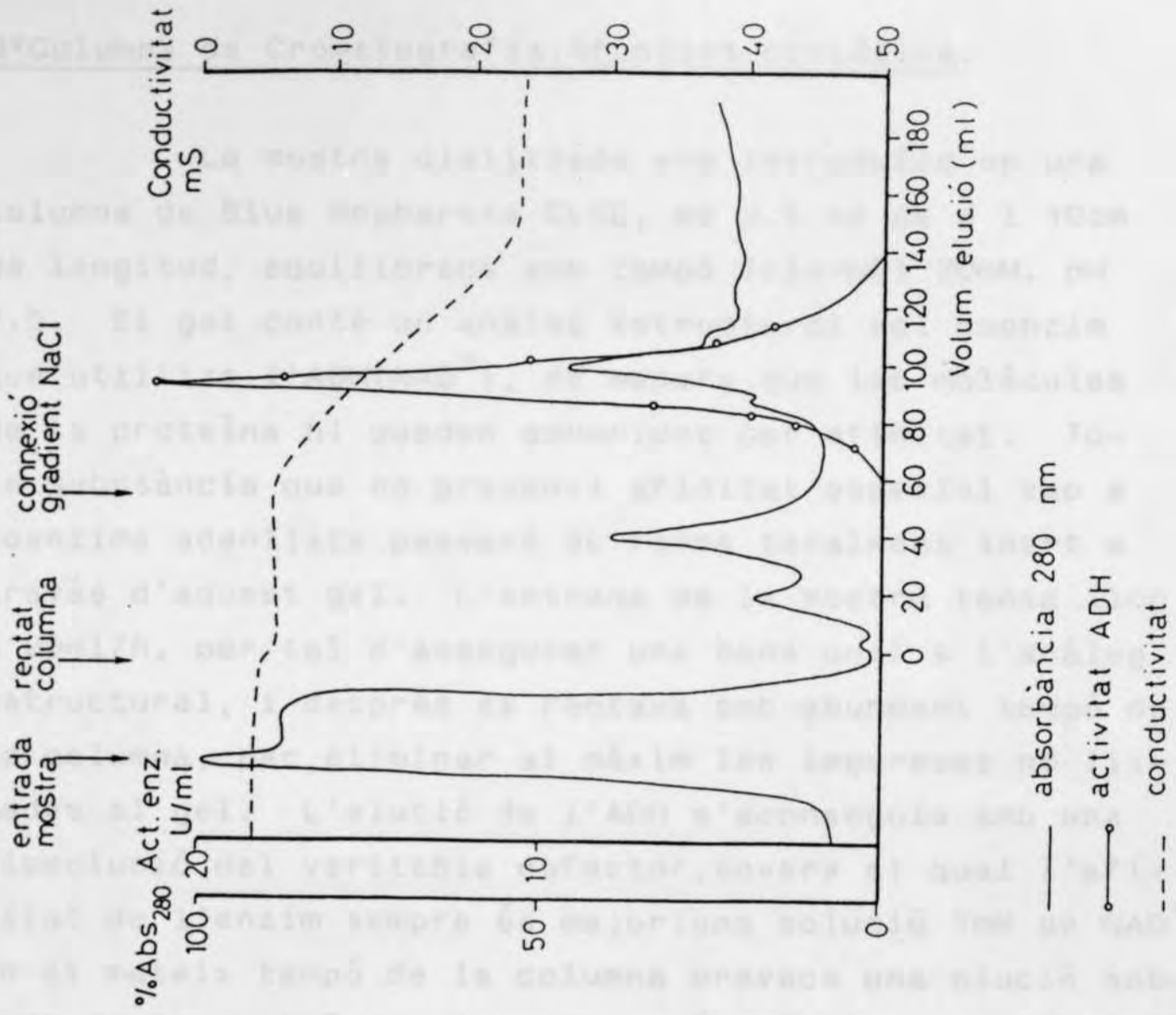
El volum de mostra recollit de la G-25 s'introdueix directament en una columna de CM-Sepharosa-CL 6B, de 2.5cm \varnothing i 10cm de longitud, equilibrada amb tampó fosfats, 10mM, pH 7.0. La base de la purificació per bescanvi iònic rau en la unió de la proteïna a un gel mit-

jançant càrrega elèctrica i posterior elució amb un agent de més gran força iònica. El pH de 7.0 on es troba la mostra - més de 1.5 unitats per sota el punt isoelèctric de 8.83 de la banda de major activitat de l'ADH de D.hydei - assegura una bona ionització positiva de la mostra, fet que permetrà la correcta unió als grups negatius de la Sepharosa. L'entrada de la mostra es realitza a 40ml/h, suficientment lenta per assegurar que les molècules d'ADH queden unides al bescanviador catiònic. A continuació, hom fa passar per la columna fins a 2 volums de tampó amb el qual es troba equilibrada, per eliminar al màxim totes les substàncies que no queden retingudes al gel. L'elució de l'ADH es du a terme amb NaCl, de força iònica suficient com per desplaçar les molècules proteiques dels punts d'enllaç electrostàtic. El NaCl és dissolt en el mateix tampó d'elució de la columna, i s'introdueix en forma de gradient creixent de 0 a 1M, a una velocitat de 20ml/h. De nou es recullen les fraccions que mostren activitat ADH. Sovint s'observen en aquest procés d'elució -il·lustrat en la figura 4.4.- dos pics d'activitat: un primer pic més reduït i un segon pic majoritari, que és el que hom recull. Segurament, ambdós pics corresponen als diferents isozims, de diferent pI que es troben presents en l'organisme, i que, per tant, tindran moments d'elució diferents en una columna de bescanvi iònic.

Diàlisi

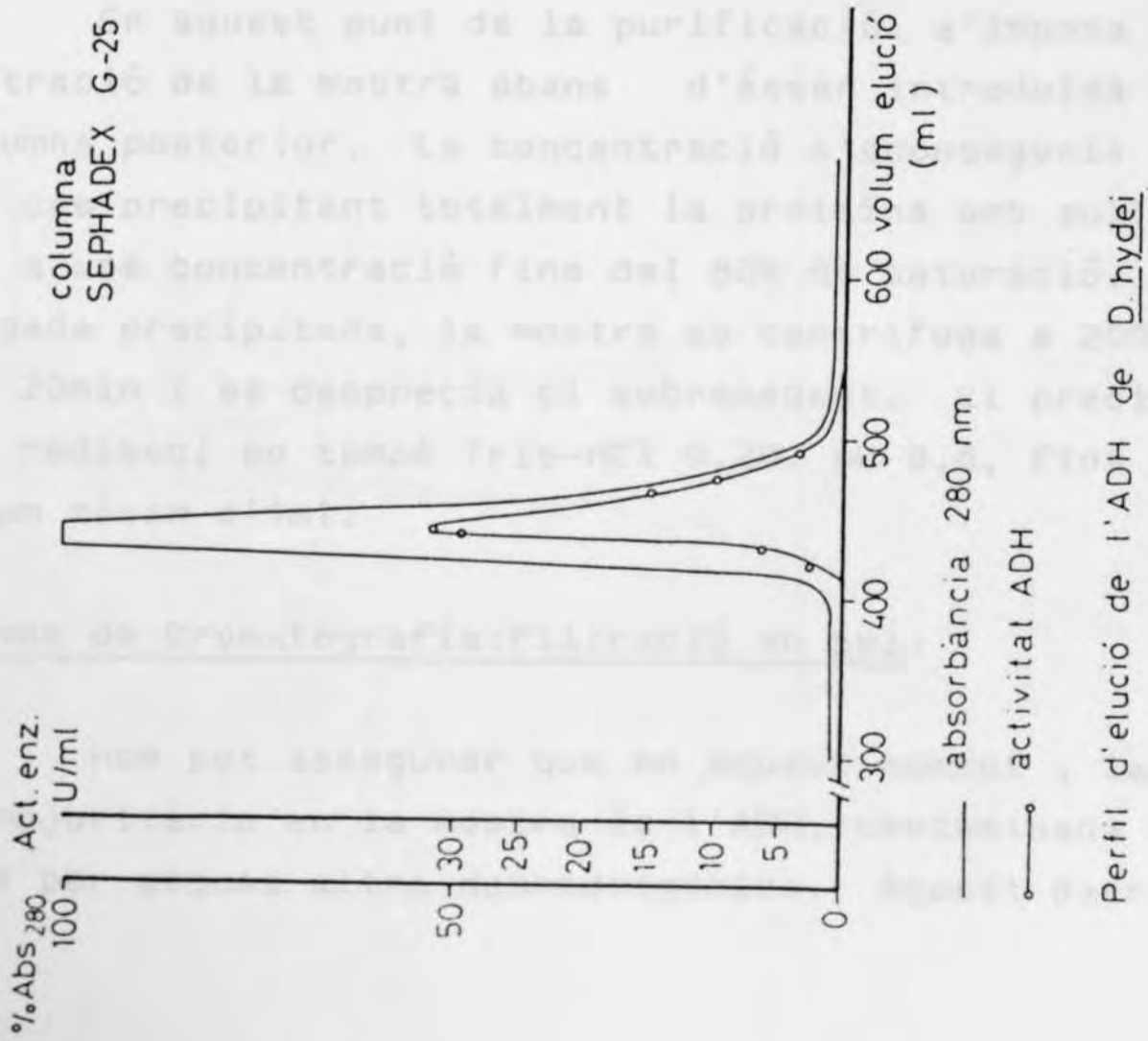
El volum total recollit després de l'elució anterior és sotmés a diàlisi en front de tampó Tris-HCl per tal d'eliminar-ne les sals. La diàlisi es realitza en front del tampó amb què es troba equilibrada la següent columna :Tris-HCl 20mM, pH 7.5, i ha de continuar fins que la conductivitat de la mostra sigui inferior a la de l'esmentat tampó. El procés complet incloïa 5 canvis de tampó a intervals d'1h: els tres primers casos hom treballava amb tampó 2mM i els dos darrers amb tampó 20mM.

Columna CM-SEPHAROSA -CL-6B



Perfil d'elució de l'ADH de D. hydei

FIGURA 4.4.



Perfil d'elució de l'ADH de D. hydei

FIGURA 4.3.

Practicitació amb sulfat amònic.

3ª Columna de Cromatografia: Afinitat biològica.

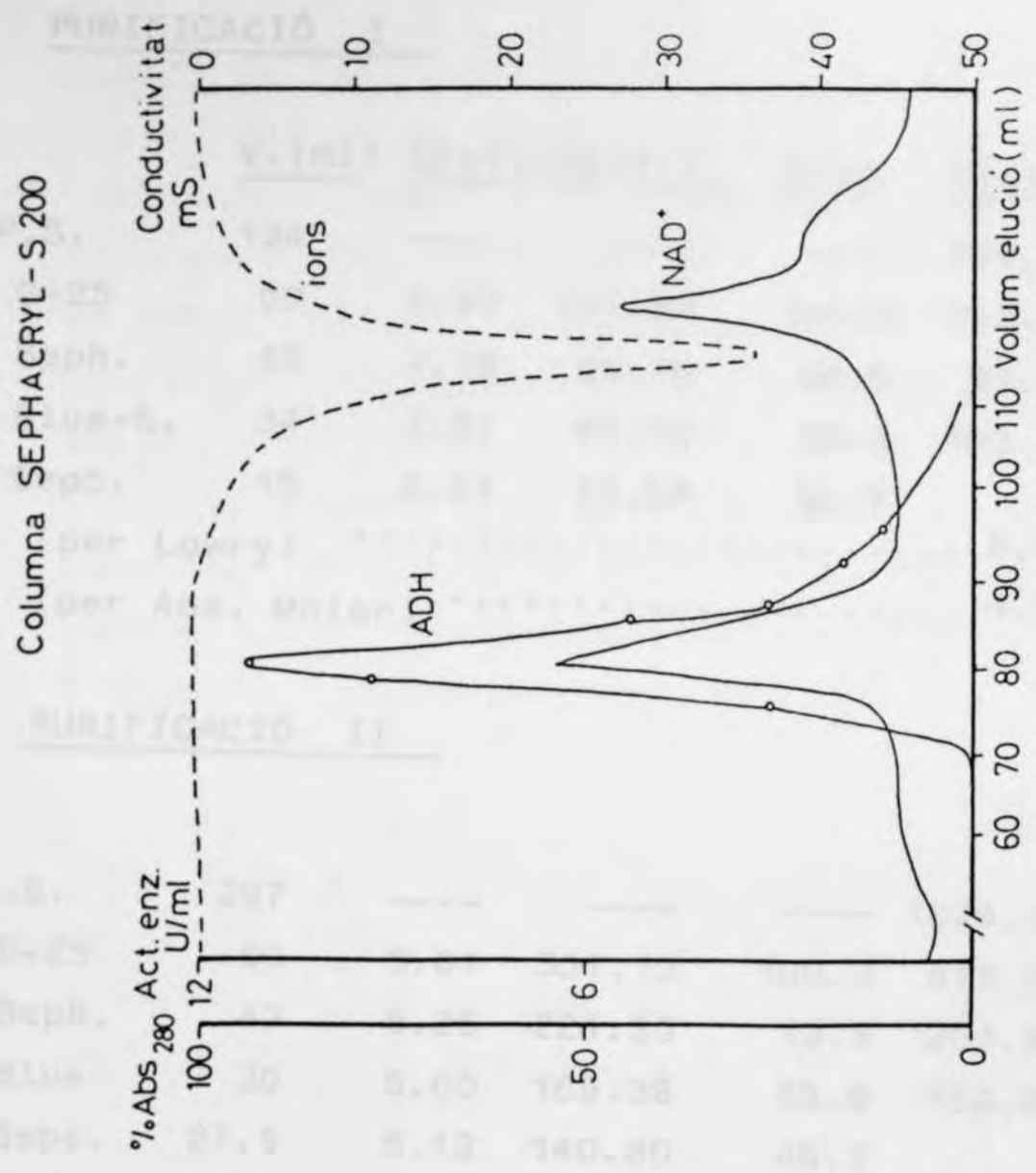
La mostra dialitzada era introduïda en una columna de Blue Sepharosa CL6B, de 2.5 cm de \varnothing i 10cm de longitud, equilibrada amb tampó Tris-HCl 20mM. pH 7.5. El gel conté un anàleg estructural del coenzim que utilitza l'ADH(NAD⁺), de manera que les molècules de la proteïna hi queden adherides per afinitat. Tota substància que no presenti afinitat especial cap a coenzims adenilats passarà de forma totalment inert a través d'aquest gel. L'entrada de la mostra tenia lloc a 20ml/h, per tal d'assegurar una bona unió a l'anàleg estructural, i després es rentava amb abundant tampó de la columna, per eliminar al màxim les impureses no lligades al gel. L'elució de l'ADH s'aconseguia amb una dissolució del veritable cofactor, envers el qual l'afinitat de l'enzim sempre és major: una solució 1mM de NAD⁺ en el mateix tampó de la columna provoca una elució sobtada de la proteïna. Aquest procés té lloc a una velocitat de 12ml/h. Vegeu-ne el diagrama en la figura 4.5.

Precipitació amb sulfat amònic.

En aquest punt de la purificació, s'imposa una concentració de la mostra abans d'ésser introduïda en la columna posterior. La concentració s'aconsegueix en aquest cas precipitant totalment la proteïna amb sulfat amònic a una concentració fins del 80% de saturació. Una vegada precipitada, la mostra es centrifuga a 20000g durant 20min i es desprecia el sobrenedant. El precipitat es redissol en tampó Tris-HCl 0.2M, pH 8.6, fins a un volum màxim d'1ml.

4ª Columna de Cromatografia: Filtració en gel.

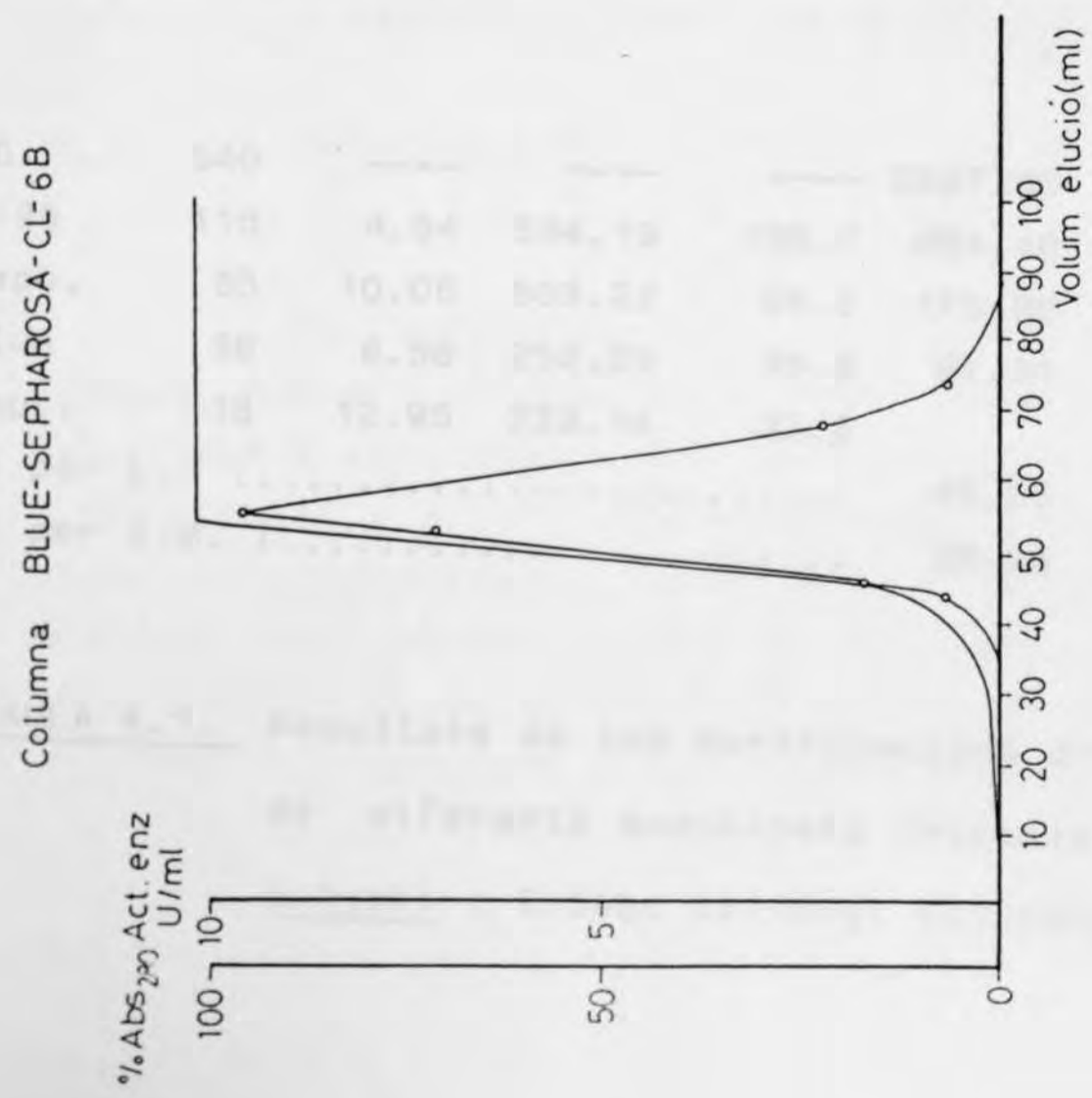
Hom pot assegurar que en aquest moment, la proteïna majoritària en la mostra és l'ADH, contaminada en tot cas per alguna altra deshidrogenasa. Aquest darrer



- absorbància 280 nm
- activitat ADH
- conductivitat

Perfil d'elució de l'ADH de D. hydei

FIGURA 4.6.



- absorbància 280 nm
- activitat ADH

Perfil d'elució de l'ADH de D. hydei

FIGURA 4.5.

PURIFICACIÓ I

	<u>V.(ml)</u>	<u>Act(u/ml)</u>	<u>A.T.</u>	<u>Rend.</u>	<u>Prot.T</u>	<u>Act.esp.</u>	<u>Factor</u>
d.P.S.	134	----	----	----	754.74	----	----
d. G-25	50	2.83	141.93	100.0	213.50	0.66	1
d. Seph.	45	2.19	98.70	69.5	91.08	1.08	1.63
d. Blue-S.	34	2.51	85.58	60.3	103.02	0.83	1.25
d. Sepc.	15	2.91	43.66	30.7			
(per Lowry)				8.00	5.45	8.25
(per Abs. Molar)				4.35	10.03	15.19

PURIFICACIÓ II

d.P.S.	297	----	----	----	1824.00	----	----
d. G-25	60	5.01	301.13	100.0	612.00	0.49	1
d. Seph.	42	5.25	221.35	73.5	263.99	0.83	1.69
d. Blue	30	5.60	168.38	55.9	159.00	1.05	2.14
d. Sepc.	27.5	5.12	140.80	46.7			
(per L.)				21.28	6.57	3.40
(per A.M.)				14.52	9.69	19.79

PURIFICACIÓ III

d.P.S.	540	----	----	----	2937.00	----	----
d. G-25	115	4.64	534.19	100.0	854.40	0.62	1
d. Seph.	50	10.06	503.22	94.2	175.00	2.87	4.62
d. Blue	38	6.58	250.06	46.8	81.51	3.06	4.93
d. Sepc.	18	12.95	233.14	43.6			
(per L.)				45.56	5.11	8.24
(per A.M.)				28.88	8.07	13.01

TAULA 4.1. Resultats de les purificacions d'ADH a partir de diferents quantitats inicials de larves de D.hydei : I:50g; II:100g; III:200g.

procés de filtració servirà per separar les restes de NAD^+ i els ions de la proteïna ADH, així com els possibles contaminants esmentats. La columna usada és un gel de Sephacryl S-200 SF, de 1.5cm de \varnothing i 90cm de longitud, equilibrada amb el mateix tampó amb que es troba redissolta la mostra (Tris-HCl, 20mM, pH 8.6). La velocitat d'elució era de 7ml/h, i es recollien fraccions de 3ml. Al final de l'elució es reunien totes les fraccions que presentaven activitat enzimàtica i es procedia a realitzar els controls de puresa que s'esmentaran a continuació. Vegeu el diagrama d'aquesta columna en la figura 4.6.

NOTA: Tots els tampons del procés de purificació, llevat del Tampó Tris-HCl 20mM, pH 8.6 de la darrera columna, es trobaven protegits amb un 1% d'isopropanol i un 0.2% de 2-mercaptoetanol, per tal d'evitar la degradació de l'ADH.

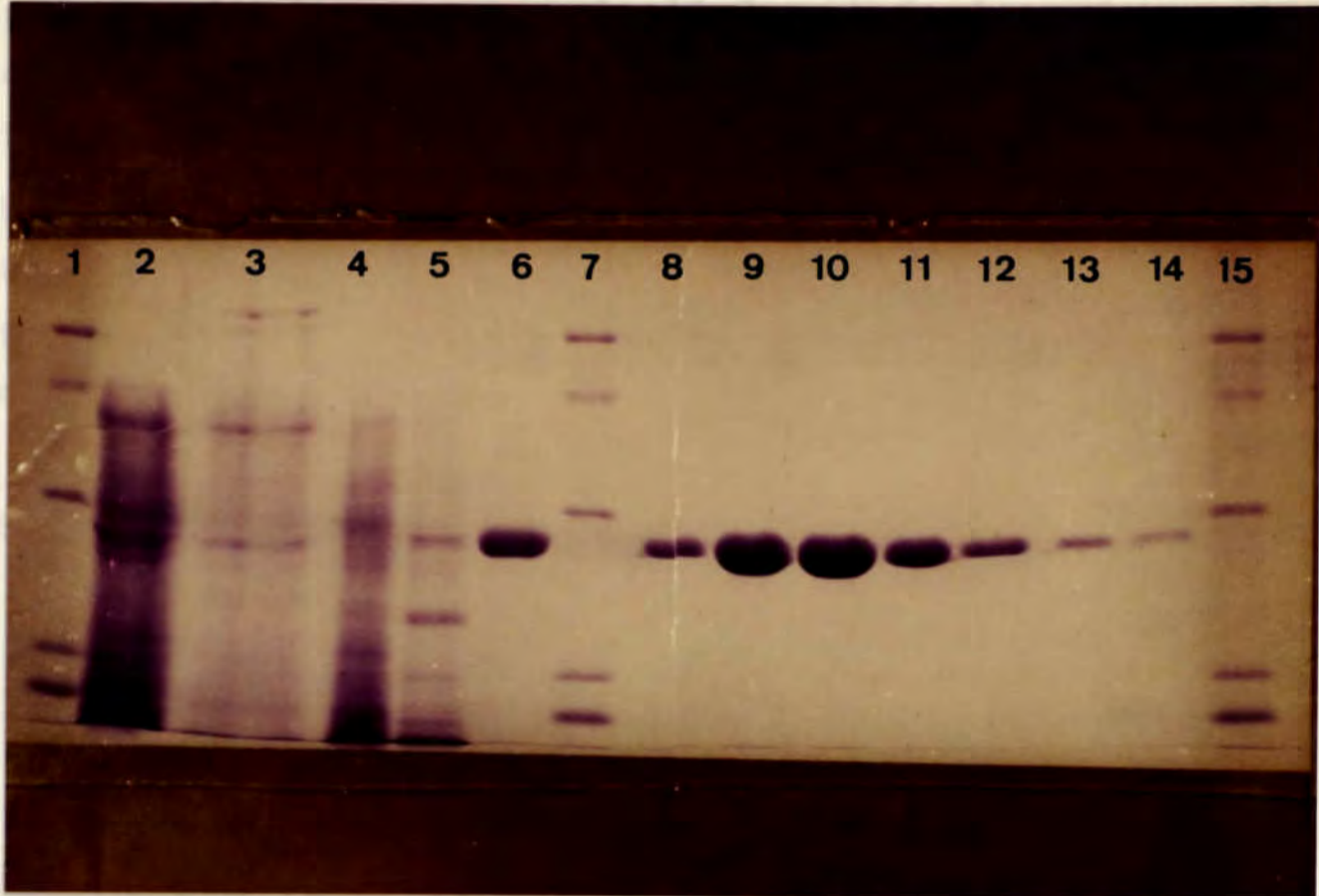
En la taula 4.1. es mostren els resultats de tres processos típics de purificació de l'ADH de D.hydei, un a partir de 50g, un de 100g i un de 200g de larves. En la fig. 4.7. es pot observar l'evolució de la purificació.

4.3. CRITERIS DE PURESA.

Per determinar el grau de puresa de l'enzim obtingut, hom pot adoptar diferents criteris de puresa. Es descriuen a continuació dos tipus d'electroforesi -en gel d'acrilamida i SDS, i electroenfocament- que constitueixen dues proves immediates. D'altres criteris són la determinació dels extrems amino i carboxi-terminals i l'anàlisi d'aminoàcids de la molècula proteica (vegeu capítol 6) i la corba d'absorció molar (vegeu capítol 5).

Gels d'acrilamida-SDS.

Els resultats de les proves d'electroforesi amb SDS es poden observar en la figura 4.7. Les diferents mostres representen les fraccions on es va considerar que l'ADH estava



Cada c...
d'una mescla formada per 10µl de solució 1mg/ml de cada un dels standards. El gel es tenyia amb Coomassie Blue per a proteïna total, de manera que, en no veure cap banda contaminant, hom pot assegurar que no hi cap impu-

FIGURA 4.7. Gel d'electroforesi en acrilamida-SDS tenyit per a proteïna total per tal de seguir la purificació de l'ADH.

- Canals: 1, 7, 15 standards
- 2, homogenat inicial
- 3, després precipitació $(NH_4)_2SO_4$
- 4, després de Sephadex-G 25
- 5, després de Sepharosa
- 6, després de Blue-Sepharosa
- 8 a 14, després de Sephacryl.

Gels d'electroenfocament.

Aquest criteri d...
diferent punt isoelèctric.
paració de bandes obtingudes
posadament pura, tenyides segons el procediment: tinció
específica per activitat ADH i tinció per proteïna total.

Gels d'acrilamida-SDS.

Els resultats de les proves d'electroforesi amb SDS es poden observar en la figura 4.8. Les diferents mostres representen les fraccions on es va considerar que l'ADH estava en estat pur, després de l'elució de la columna de Sephacryl S-200 i on, paral·lelament, es detectava major activitat espectrofotomètrica. Cada mostra és un alíquot de 150 μl . de la fracció de 3ml, dessecat i redissolt en 20 μl de tampó de mostres per a SDS abans de la seva aplicació en el gel. Com a standard es varen aplicar les següents proteïnes:

3 μg	BSA (albúmina sèrica de bou)	0.043 nmols
"	Ovoalbúmina	0.066 nmols
"	Anhidrasa carbònica	0.096 nmols
"	Mioglobina	0.168 nmols
"	Citocrom C	0.244 nmols

Cada canal d'standard representa una aplicació de 15 μl d'una mescla formada per 10 μl de solució 1mg/ml de cada un dels standards. El gel es tenyia amb Coomassie Blue per a proteïna total, de manera que, en no veure cap banda contaminant, hom pot assegurar que no hi cap impuresa, com a mínim a una concentració superior a 0.33 nmols/ml. Evidentment, aquest criteri de puresa no exclou la possibilitat d'una proteïna contaminant que tingués el mateix pes molecular de la subunitat d'ADH, i per tant, s'imposa un criteri complementari.

Gels d'electroenfocament.

Aquest criteri discerneix entre proteïnes de diferent punt isoelèctric. La prova es basa en la comparació de bandes obtingudes a partir d'una mostra suposadament pura, tenyides segons dos procediments: tinció específica per activitat ADH i tinció per proteïna total.

Si realment la preparació és pura, en la tinció per proteïna total només s'obtindrà una banda equivalent a la que aparegui en la tinció per activitat enzimàtica. Això és el que hom pot observar en la figura 4.9. Després de tot el procés de purificació, s'aprecia molt més intensament la banda majoritària, més electropositiva, i la banda superior ha perdut intensitat, indicant que la purificació ha estat selectiva. El pI calculat per l'enzim una vegada purificat, ha resultat de 8.80 i 8.37, valors que concorden molt bé amb els determinats a partir de l'extracte cru (8.83 i 8.41).



Figura 4.8. Diferents fraccions d'elució de la columna de Sepharose 4-200, després de la tinció per proteïna total del gel d'agarosa 4-200, no s'observa cap banda d'enzim.

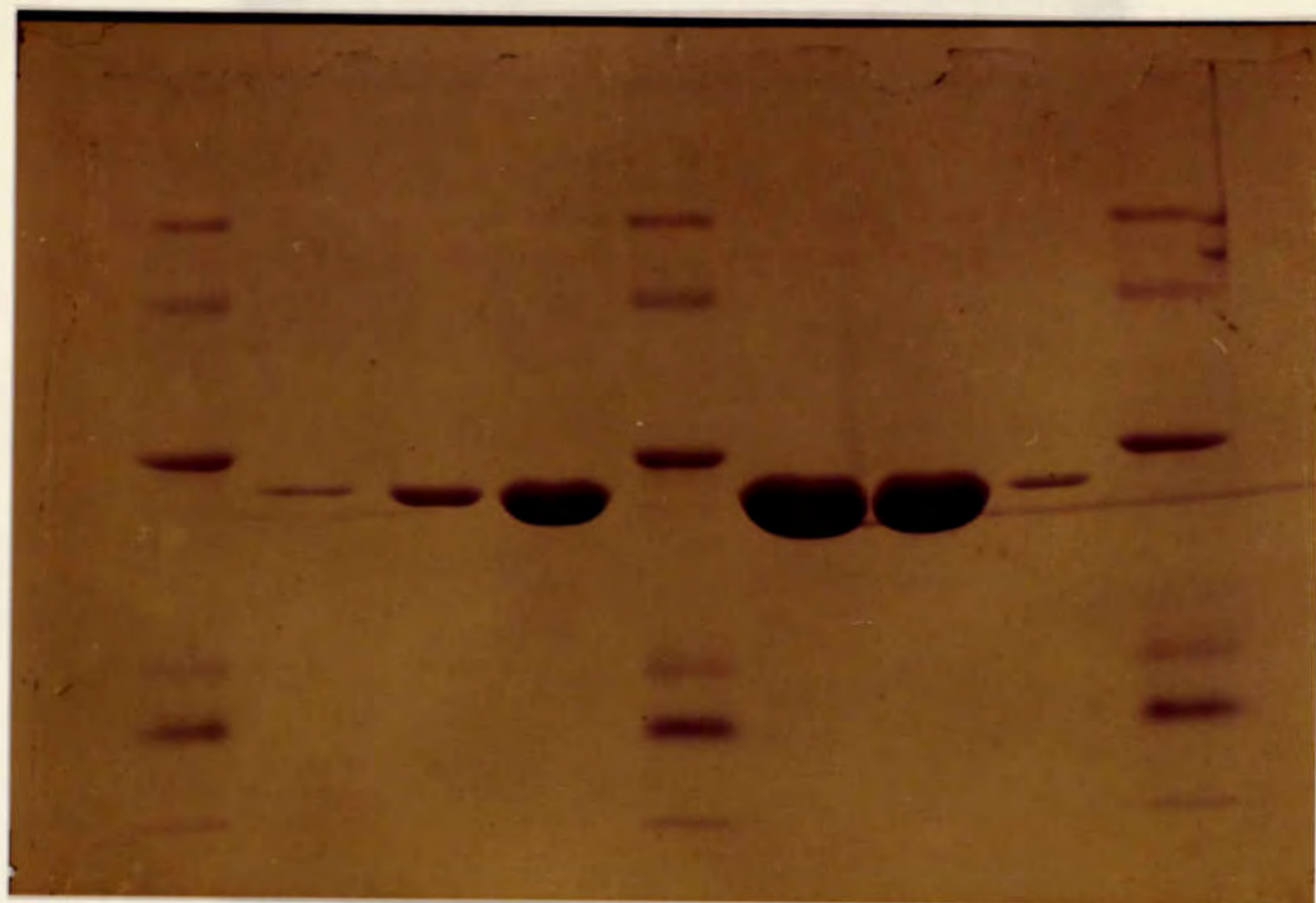


FIGURA 4.8. Diferents fraccions d'elució de la columna Sephacryl S-200, on, després de la tinció per proteïna total del gel d'acrilamida-SDS, no s'aprecia cap mena d'impuresa.

Figura 4.8. Diferents fraccions d'elució de la columna Sephacryl S-200, on, després de la tinció per proteïna total del gel d'acrilamida-SDS, no s'aprecia cap mena d'impuresa.



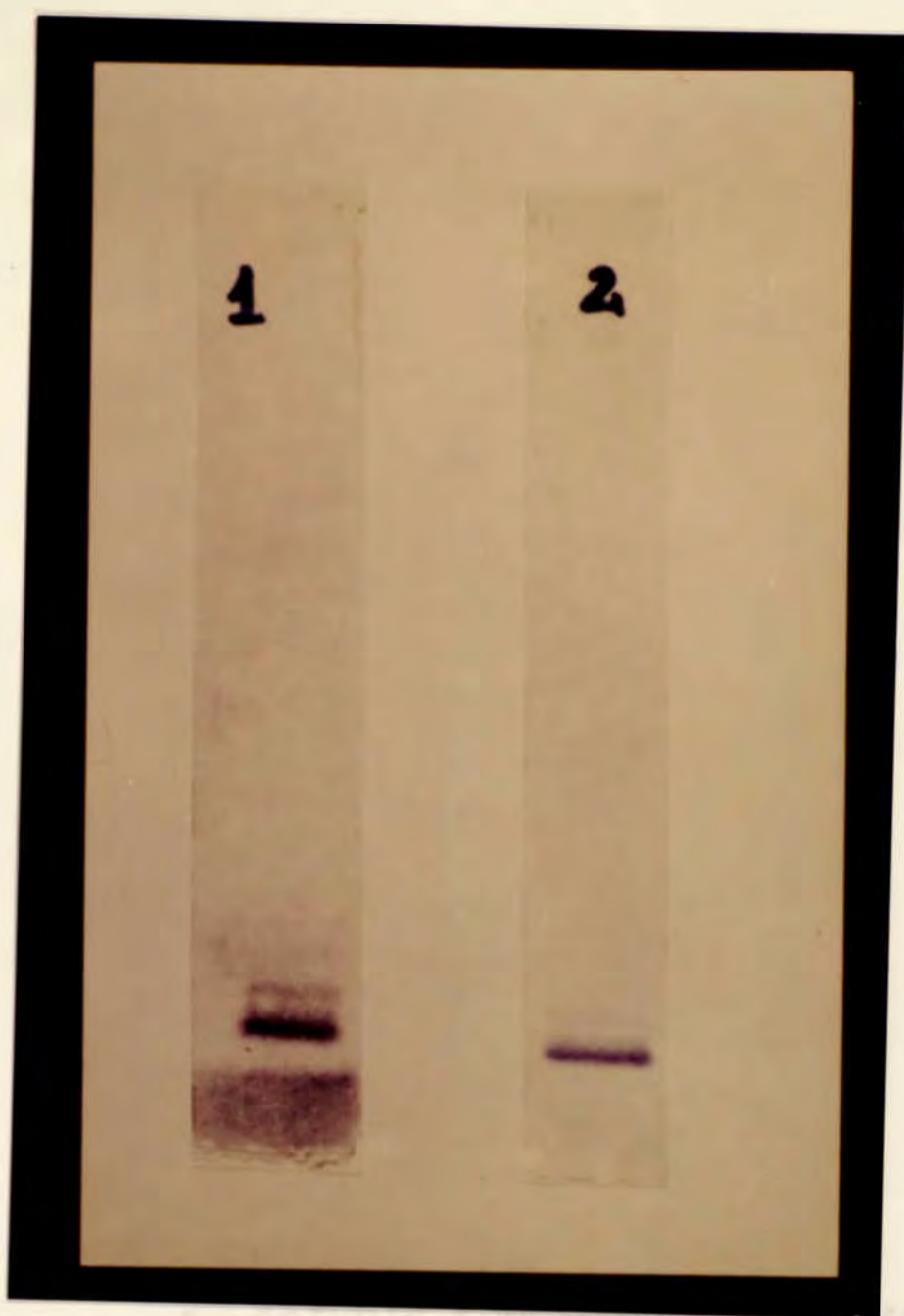


FIGURA 4.9. Gel d'electroenfocament amb ADH procedent d'una purificació com a mostra. El canal 1 ha estat tenyit per activitat ADH i el canal 2 per proteïna total. Observeu la disminució en la intensitat de la banda superior.