



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

**ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS  
CINAMIL ALCOHOL DESHIDROGENASAS DE  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Carolina Larroy Hernando**

**ESTUDIO CINÉTICO, ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS  
ALCOHOL DESHIDROGENASAS DE CADENA MEDIA CON  
ACTIVIDAD DEPENDIENTE DE NADP(H) DE *Saccharomyces cerevisiae***

Memoria presentada por la licenciada en Bioquímica Carolina Larroy Hernando para obtener el grado de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular otorgado por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona bajo la dirección de los doctores Josep A. Biosca Vaqué y Xavier Parés Casasampera.

Josep Antoni Biosca Vaqué

Xavier Parés Casasampera

Carolina Larroy Hernando

15 de Junio de 2006

**A mis padres,  
no puede ser de otra manera**

***La ilusión es el primero  
de todos los placeres***

OSCAR WILDE

***Si os dan papel pautado,  
escribid por el otro lado***

JUAN RAMÓN JIMÉNEZ

# **AGRADECIMIENTOS**

Esta Tesis es el final de una agotadora pero gratificante etapa de mi vida. Durante este largo viaje he tenido la suerte de compartir el camino con muchas personas que bien en el ámbito laboral, bien en el ámbito personal, han sabido y han podido darme lo que he necesitado en muchos momentos: empuje para empezar, ánimos para continuar, reprimendas para enderezarme y apoyo y más apoyo hasta el final. A cada una de esas personas que ha puesto su granito de arena en esta gran escarpada montaña me gustaría agradecerles enormemente que hayan colaborado en mi humilde sueño, en mi pequeña cruzada, en mi trocito de vida.

Al Dr. Josep Antoni Biosca, mi director de Tesis, me gustaría agradecerle, sobretodas las cosas, que no se asustara ni reculara cuando me planté en su despacho pidiendo una oportunidad sin nada más que mi ilusión, entusiasmo y amor (por entonces algo platónico) por la investigación. Por supuesto debo agradecerle su dirección, esa mezcla de ideas brillantes y a veces algo alocadas que junto con un punto de realidad, serenidad y una desmesurada vocación han llevado este estudio por buen camino.

Al Dr. Xavier Parés, mi otro director de Tesis, le agradezco que aceptara mi improvisada adopción. Su serenidad y su sentido práctico de la ciencia han quedado reflejados en de esta Tesis.

Al Dr. Jaume Farrés le agradezco su interés y sus consejos a lo largo del trabajo realizado durante estos años.

A la Dra. Eva Valencia y al Dr. Ignasi Fita les agradezco la oportunidad que me han dado para entrar un poco en el, para mí, desconocido mundo de las estructuras cristalográficas. Evidentemente, sin su participación todo un capítulo de esta Tesis no existiría.

Un gran agradecimiento lo reservo para mis compañeras/o de laboratorio ya que de todos he podido aprender algo. Constancia, buenas ideas y predisposición en el trabajo ha sido el pan nuestro de cada día. Apoyo y comprensión no han faltado en el trabajo ni en esos ratos de ocio que siempre rodean un buen experimento. Todo junto me hace pensar que si tuviera que repetir esta experiencia no dudaría en volver a ‘equivocarme’. Gracias Chari y gracias Eva. Afortunadamente he tenido el privilegio de ver a más ‘levaduras’ por nuestro laboratorio: personas que parece que hayan pasado un duro proceso de selección dado que todas tienen rasgos que admirar: Nuria su entrega, Eva su alegría y Didac su interés.

A los miembros de la Unidad de Ciencias del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular le agradezco haberme dado buenos compañeros en el trabajo siempre dispuestos a dar sabios consejos, y también haberme dado buenos compañeros en la vida. No me gustaría olvidarme de algún nombre por ese motivo agradezco a todos sin excepción el tiempo compartido. Ahora bien, no sería justa si no hiciera hincapié en los agradecimientos a algunas de estas personas:

A todo el grupo ADH que me apadrinó y cobijó como a una más de la familia en mis solitarios inicios como ‘miosina’ y que me ha prestado consejo y ayuda a lo largo de toda mi Tesis. Gracias a todos: Josep M<sup>a</sup>, Abdellah, Bernat, Susana, Ana M<sup>a</sup>, Silvia, Emma, Albert, Dámaso, Sergio, Oriol, Xavi.

A Salva Bartolomé le agradezco su presencia en casi cada rincón del departamento. Creo que no llegará a saber nunca lo mucho que le agradezco sus sabios consejos en todos los ámbitos y esos favores que tanto he necesitado en su momento. Imposible olvidar esos ratos de ocio juntos que me han hecho sudar mis penas y disgustos. Ya echo de menos esas interminables carreras, esos morados involuntarios y esa persecución sin fin detrás de la pequeña pelotita negra.

Al grupo de Plantas con el que he compartido una buena parte de mi tiempo, y por lo tanto penas y alegrías, le agradezco que me hayan enseñado que tanto en el laboratorio como en la vida se tiene que tener valor, coraje, fuerza y mucho optimismo. Todas ellas me han enseñado que cuando las cosas van mal se tiene que afrontar la vida con buen humor porque siempre (y ojalá no fuera así) las cosas pueden ir peor. Un agradecimiento a todas ellas: Carme, Hakima, Trini, Maykelis, Sandra y también al recién incorporado Jordi.

Estos comentarios sobre el compañerismo que he encontrado a lo largo de esta Tesis se podrían hacer extensivos a la mayoría de miembros de la Unidad porque han sido muchos los buenos ratos pasados y los recuerdos que me llevo conmigo: las aventuras y desventuras de Juanma han sido (y espero que sean) interminables, el optimismo y buen hacer que Helena contagia, y la cantidad de trabajo que Jordi me ha ahorrado.

Pero los agradecimientos no se limitan al ámbito laboral. Son muchas las personas que, sin saberlo, han contribuido al buen desarrollo de este trabajo ayudándome a olvidarme de todo cuando lo he necesitado. Han sido momentos en blanco que han servido de cura y me han inyectado ánimos para continuar: cenas, copas, bailes y sobretodo esos ratos con la raqueta en la mano ya sea jugando a tenis, padel o frontón. Son momentos que me han arrancado las energías negativas y me han renovado por completo. A todas las personas que han colaborado, familia, amigos, compañeros e incluso simplemente rivales, muchas gracias.

Agradezco el interés a los miembros de mi familia y a aquellas personas que sin serlo oficialmente, son más familia de lo que se imaginan: Melo, tu siempre serás ‘mi niña’. Y por último me gustaría agradecer a esas personas más cercanas a mí, que me hayan sabido llevar, que hayan aguantado con paciencia mis cambios de humor, mis caprichos, mi tranquilidad excesiva en ciertos momentos y mi nerviosismo irritante de la última etapa:

A Jaume le agradezco más que nada que haya entrado a formar parte de este grupo de agradecimientos, de esas personas muy cercanas a mí. Su aparición en mi vida le ha dado un lindo empuje a mi persona que espero no haya afectado demasiado a esta Tesis. Aunque no acaba de entender muy bien como funciona ‘esto de la investigación’, se que me entiende a mí y esto es mucho más que suficiente.

A Marta y Jordi les agradezco su interés, preocupación y apoyo. Sobretudo a mi Martita porque su amistad y nuestras interminables charlas son, además de una diversión, lo mejor de todo.

A mis padres se lo agradezco TODO. Sin ellos nada habría sido posible. La persona, y en consecuencia, la científica que soy es resultado de su minuciosa educación, desorbitada paciencia e interminable amor. Esta Tesis es tan mía como suya.



## **ABREVIATURAS**

ADH	<u>A</u> lcohol <u>d</u> eshidrogenasa
AAD	<u>A</u> ril <u>a</u> lcohol <u>d</u> eshidrogenasas
ADN	<u>Á</u> cido <u>d</u> esoxiribonucleico
ALDH	<u>A</u> ldehído <u>d</u> eshidrogenasa
BCAA	<u>B</u> ranch <u>e</u> d <u>c</u> hain <u>a</u> minoacid - Aminoácidos de cadena ramificada
BSA	<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin – Albúmina de suero bovino
CADH	<u>C</u> inamil <u>a</u> lcohol <u>d</u> eshidrogenasa
D <sub>595</sub>	Densidad óptica a 595 nm
FALDH	<u>F</u> ormaldehído <u>d</u> eshidrogenasa dependiente de glutatión
HPLC	<u>H</u> igh <u>p</u> ressure <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography – Cromatografía líquida de alta presión
k <sub>cat</sub>	Constante catalítica
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis
MDR	<u>M</u> edium-chain <u>d</u> ehydrogenase/ <u>r</u> eductase - Deshidrogenasa/Reductasa de cadena media
mRNA	<u>M</u> essenger <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid – Ácido ribonucleico mensajero
NAD(H)	<u>N</u> icotinamide <u>a</u> denine <u>d</u> inucleotide (reduced form) – Dinucleótido de nicotinamida adenina (forma reducida)
NADP(H)	<u>N</u> icotinamide <u>a</u> denine <u>d</u> inucleotid <u>p</u> hosphate (reduced form) – Fosfato dinucleótido de nicotinamida adenina
NBT	<u>N</u> itro <u>b</u> lue <u>t</u> etrazolium – Azul de nitro-tetrazolio
ORF	<u>O</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame – Marco de lectura abierto
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffer <u>s</u> aline – Tampón fosfato salino
PCR	<u>P</u> olimerasa <u>c</u> hain <u>r</u> eaction – Reacción en cadena de la polimerasa
PDC	<u>P</u> iruvato <u>d</u> escarboxilasa
PMS	<u>P</u> henazine <u>m</u> etho <u>s</u> ulfate – Metasulfato de fenazina
SAD	<u>S</u> inapil <u>a</u> lcohol <u>d</u> eshidrogenasa
SDR	<u>S</u> hort-chain <u>d</u> ehydrogenase/ <u>r</u> eductase – Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
SDS-PAGE	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate- <u>P</u> oliacrylamide gel <u>e</u> lectrophoresis – Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
TPBS	<u>T</u> ween en tampón fosfato salino
U	Unidad enzimática (μmol/min)
YPD	<u>Y</u> east extract, <u>p</u> eptona, <u>d</u> extrosa

# **PRESENTACIÓN**

En esta memoria se presenta la identificación de dos nuevas alcohol deshidrogenasas de *Saccharomyces cerevisiae* con actividad dependiente de NADP(H), y su posterior estudio de las características cinéticas, estructurales y funcionales. Ambos enzimas, Adh6p y Adh7p, que comparten un 64% de identidad, pertenecen a la superfamilia de alcohol deshidrogenasas de cadena media que unen zinc. Este trabajo se ha estructurado en capítulos en base a las publicaciones de los resultados obtenidos. En el Capítulo I se presenta la identificación y caracterización de Adh6p con dos publicaciones referentes a la identificación del ORF *YMR318C* como el gen *ADH6* y la consiguiente determinación de las propiedades fisicoquímicas y cinéticas de Adh6p [Larroy et al., 2002a; Larroy et al., 2003]. Se trata de una proteína homodimérica compuesta por subunidades de 40 kD, activa con alcoholes primarios o aldehídos, en presencia de NADP<sup>+</sup> o NADPH respectivamente. En el Capítulo II se presenta la identificación y caracterización de Adh7p con una publicación en la que se identifica al ORF *YCR105W* como el gen *ADH7* [Larroy et al., 2002b]. En este artículo se describen las propiedades fisicoquímicas y cinéticas de Adh7p, que resultaron muy similares a las ya encontradas para Adh6p, y se clasifica a estas dos alcohol deshidrogenasas como miembros de la familia de las cinamil alcohol deshidrogenasas. En el capítulo III se presenta la estructura tridimensional de Adh6p como publicación [Valencia et al., 2004]. La resolución de dicha estructura reveló el patrón característico de las ADHs de cadena media y se pudieron identificar los residuos implicados en la unión al coenzima y la topología del centro de unión al sustrato. Además, la estructura obtenida nos ha permitido proponer un mecanismo catalítico de ‘half-of-the-sites reactivity’. Finalmente, en el Capítulo IV se presentan estudios no publicados sobre la posible función de Adh6p en la levadura. Posiblemente Adh6p estaría implicada en la desintoxicación de productos derivados de la biodegradación de la lignina, en la respuesta al estrés oxidativo y en el mantenimiento intracelular del balance redox NADP<sup>+</sup>/NADPH.

# **ÍNDICE DE MATERIAS**

# ÍNDICE DE MATERIAS

■ AGRADecIMIENTOS .....	pág. i
■ ABREVIATURAS .....	pág. v
■ RESUMEN GLOBAL .....	pág. vii
■ ÍNDICE DE MATERIAS .....	pág. ix
■ ÍNDICE DE FÍGURAS Y TABLAS .....	pág. xv
■ INTRODUCCIÓN	
■ ALCOHOL DESHIDROGENASAS .....	pág. 1
■ Alcohol deshidrogenasas activadas por hierro .....	pág. 1
■ Alcohol deshidrogenasas de cadena corta .....	pág. 2
■ Alcohol deshidrogenasas de cadena media .....	pág. 2
■ CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MDRs .....	pág. 3
■ MDRs con catálisis dependiente de Zn .....	pág. 5
■ Centro de unión al coenzima .....	pág. 6
■ Átomos de zinc .....	pág. 8
■ Centro de unión al sustrato y catálisis .....	pág. 8
■ ACTIVIDAD ALCOHOL DESHIDROGENASA EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	pág. 9
■ Adh1p .....	pág. 11
■ Adh2p .....	pág. 11
■ Adh3p .....	pág. 12
■ Adh4p .....	pág. 12
■ Adh5p .....	pág. 13
■ Adh6p y Adh7p .....	pág. 13
■ FALDH .....	pág. 13
■ Sdh1p y Sdh2p .....	pág. 14
■ Xyl2p .....	pág. 14

■ Bdh1p y Yal061p .....	pág. 14
■ Otras actividades alcohol deshidrogenasa dependientes de NADP(H) .....	pág. 14
■ CINAMIL ALCOHOL DESHIDROGENASAS (CADHs) .....	pág. 15
■ ALCOHOLES SUPERIORES EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	pág. 17
■ BCAA transaminasas .....	pág. 19
■ Descarboxilasas .....	pág. 19
■ Alcohol deshidrogenasas .....	pág. 20
■ OBJETIVOS .....	pág. 23
■ <b>CAPÍTULO I: Caracterización de Adh6p, una nueva alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP(H) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	
■ <b>ARTÍCULO: ‘Characterization of the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction’</b> .....	pág. 25
■ <b>RESUMEN DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN EL ARTÍCULO ‘Characterization of the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction’</b> .....	pág. 35
■ <b>ARTÍCULO: ‘Properties and functional significance of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ADHVI’</b> .....	pág. 39
■ <b>RESUMEN DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN EL ARTÍCULO ‘Properties and functional significance of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ADHVI’</b> .....	pág. 49
■ <b>CAPÍTULO II: Caracterización de Adh7p, la segunda alcohol deshidrogenasa de cadena media de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	
■ <b>ARTÍCULO: ‘Characterization of a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase’</b> .....	pág. 51
■ <b>RESUMEN DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN EL ARTÍCULO ‘Characterization of a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase’</b> .....	pág. 59

■	<b>CAPÍTULO III: Estudio cristalográfico de la estructura tridimensional de la Adh6p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	
■	ARTÍCULO: ‘ <i>Apo and holo structures of an NADP(H)-dependent cinnamyl alcohol dehydrogenase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i> ’	pág. 61
■	RESUMEN DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN EL ARTÍCULO ‘ <i>Apo and holo structures of an NADP(H)-dependent cinnamyl alcohol dehydrogenase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i> ’	pág. 75
■	<b>CAPÍTULO IV: Estudios funcionales de Adh6p y Adh7p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	
■	INTRODUCCIÓN	pág. 77
■	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
■	Crecimiento de cepas <i>adh6Δ</i> , <i>adh7Δ</i> y <i>adh6Δadh7Δ</i> en presencia de veratraldehído	pág. 77
■	Análisis de la expresión de Adh6p y Adh7p en diferentes condiciones de estrés	pág. 77
-	Preparación de los extractos totales de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pág. 78
-	Análisis de la actividad cinamaldehído deshidrogenasa	pág. 78
-	Producción de anticuerpos policlonales contra Adh6p y Adh7p	pág. 78
-	Análisis de la expresión de Adh6p y Adh7p por Western-blot	pág. 79
-	Crecimiento de las cepas FY834α y FY18 ( <i>adh6Δ</i> ) en presencia de agentes inductores del estrés oxidativo	pág. 79
-	Análisis de la proteína Adh6p en cultivos crecidos en diferentes fuentes de nitrógeno	pág. 80
■	Análisis de la contribución de Adh6p en la actividad reductasa de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pág. 81
-	Análisis de la actividad reductasa dependiente de NAD(H) y NADP(H)	pág. 81
-	Análisis de las proteínas con actividad reductasa dependiente de NADP(H) en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pág. 81
■	Análisis de los niveles de alcoholes superiores en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pág. 81
-	Crecimiento de los cultivos	pág. 82
-	Preparación de las resinas para desionización	pág. 82
-	Desionización de las muestras	pág. 82



- Cromatografía de gases .....	pág. 83
■ Análisis de la proteína Adh6p en la cepa <i>adh1Δ</i> .....	pág. 83
- Análisis de la expresión de Adh6p en electroforesis en condiciones nativas .....	pág. 84
<b>■ RESULTADOS</b>	
■ Crecimiento en presencia de veratraldehído .....	pág. 85
■ Estudios en condiciones de estrés oxidativo	
- Agente inductor: diamida .....	pág. 86
- Agente inductor: menadiona .....	pág. 89
■ Estudio comparativo de la actividad reductasa en la cepa silvestre y la cepa <i>adh6Δ</i> .....	pág. 91
■ Análisis de papel de Adh6p en el metabolismo de los alcoholes superiores .....	pág. 93
- Niveles de Adh6p .....	pág. 94
- Niveles de volátiles .....	pág. 94
■ Análisis de la proteína Adh6p en la cepa <i>adh1Δ</i> .....	pág. 96
<b>■ DISCUSIÓN</b> .....	pág. 99

## ■ DISCUSIÓN GENERAL

■ Nuevas alcohol deshidrogenasas de la superfamilia MDR con actividad dependiente de NADP(H) en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	pág. 105
■ Adh6p y Adh7p pertenecen a la familia de las cinamil alcohol deshidrogenasas .....	pág. 108
■ Estructura tridimensional de Adh6p: mecanismo cinético con 'half-site reactivity' .....	pág. 109
■ La función fisiológica de Adh7p .....	pág. 117
■ La función fisiológica de Adh6p .....	pág. 118
■ Asimilación de productos procedentes de la degradación de la lignina .....	pág. 118
■ Papel funcional durante el estrés oxidativo .....	pág. 120
■ Participación en la producción de alcoholes superiores .....	pág. 122
■ Participación en la reducción de aldehídos: mantenimiento del balance redox NADP <sup>+</sup> /NADPH .....	pág. 126

■ CONCLUSIONES .....	pág. 129
■ BIBLIOGRAFÍA .....	pág. 131
■ ANEXO I .....	pág. 147

# **ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

# ÍNDICE DE FIGURAS

## ■ INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1</b>	Análisis filogenético de la familia MDR .....	pág. 4
<b>Figura 2</b>	Diagrama del plegamiento de Rossmann .....	pág. 5
<b>Figura 3</b>	Estructura tridimensional de la HLADH .....	pág. 6
<b>Figura 4</b>	Análisis filogenético de las MDRs de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	pág. 10
<b>Figura 5</b>	Esquema funcional de Adh3p .....	Pág. 12
<b>Figura 6</b>	Reacción de Ehrlich en la formación de alcoholes superiores .....	pág. 18
<b>Figura 7</b>	Biosíntesis de alcoholes superiores en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	pág. 22

## ■ CAPÍTULO IV

<b>Figura 1</b>	Crecimiento de la levadura en presencia de veratraldehído .....	pág. 86
<b>Figura 2</b>	Crecimiento de la levadura a diferentes concentraciones de diamida ..	pág. 87
<b>Figura 3</b>	Análisis de la expresión de Adh6p en cepas crecidas con diamida .....	pág. 88
<b>Figura 4</b>	Crecimiento de la levadura a diferentes concentraciones de menadiona .....	pág. 89
<b>Figura 5</b>	Análisis de la expresión de Adh6p en cepas crecidas con menadiona .....	pág. 91
<b>Figura 6</b>	Actividades específicas de reducción en la levadura .....	pág. 92
<b>Figura 7</b>	Gel nativo con tinción de actividad de oxidación de las cepas silvestre y <i>adh6Δ</i> .....	pág. 92
<b>Figura 8</b>	Análisis de la expresión de Adh6p en cultivos crecidos con diferentes fuentes de nitrógeno .....	pág. 94
<b>Figura 9</b>	Niveles de volátiles en cepas crecidas con leucina como fuente de nitrógeno .....	pág. 95
<b>Figura 10</b>	Niveles de volátiles en cepas crecidas con isoleucina como fuente de nitrógeno .....	pág. 96
<b>Figura 11</b>	Niveles de volátiles en cepas crecidas con tirosina como fuente de nitrógeno .....	pág. 96
<b>Figura 12</b>	Análisis de la actividad reductasa dependiente de NADPH en las cepas silvestre y <i>adh1Δ</i> .....	pág. 97
<b>Figura 13</b>	Gel nativo con tinción de actividad de oxidación de las cepas silvestre y <i>adh1Δ</i> .....	pág. 98
<b>Figura 14</b>	Ánálisis de la expresión de Adh6p en las cepas silvestre y <i>adh1Δ</i> .....	pág. 98

■ **DISCUSIÓN GENERAL**

<b>Figura 1</b>	Estructura tridimensional de Adh6p .....	pág. 110
<b>Figura 2</b>	Densidad electrónica del centro de unión al coenzima .....	pág. 112
<b>Figura 3</b>	Esquema del mecanismo catalítico de Adh6p .....	pág. 116
<b>Figura 4</b>	Esquema de la regeneración del NADP <sup>+</sup> en cepas <i>adh1Δ</i> .....	pág. 127

■ **ANEXO I**

	Esquemas de las construcciones plasmídicas empleadas .....	pág. 149
--	--	----------

# ÍNDICE DE TABLAS

## ■ DISCUSIÓN GENERAL

<b>Tabla 1</b>	Especificidad de sustrato de las alcohol deshidrogenasas Adh6p y Adh7p .....	pág. 106
<b>Tabla 2</b>	Parámetros cinéticos de las alcohol deshidrogenasas Adh6p y Adh7p .....	pág. 107
<b>Tabla 3</b>	Actividad reductasa dependiente de NADPH de varios enzimas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	pág. 126

## ■ ANEXO I

<b>Tabla 1</b>	Cepas bacterianas y de levadura empleadas .....	pág. 147
<b>Tabla 2</b>	Vectores empleados .....	pág. 147
<b>Tabla 3</b>	Construcciones plasmídicas empleadas .....	pág. 148

# **INTRODUCCIÓN**

## **Alcohol deshidrogenasas**

Las alcohol deshidrogenasas son enzimas pertenecientes a la clase de las oxidoreductasas que catalizan la abstracción de un protón de un grupo hidroxilo (de un alcohol) y la transferencia de un hidruro de un carbono adyacente al coenzima NAD(P)<sup>+</sup>, así como la correspondiente reacción inversa. Realizan, por tanto, la oxidación de alcoholes a sus correspondientes aldehídos o cetonas con la consiguiente reducción del NAD(P)<sup>+</sup>.



Las alcohol deshidrogenasas son enzimas ampliamente distribuidos en la naturaleza, ubicuos en casi todos los eucariotas y procariotas [Jörnvall et al., 1987]. Este gran grupo enzimático comprende tres superfamilias de enzimas que han crecido de forma independiente en la evolución:

- Alcohol deshidrogenasas dependientes de hierro. Son enzimas con subunidades de 380-390 aminoácidos que requieren iones divalentes para la catálisis.
- Alcohol deshidrogenasas de cadena corta (SDRs). Son enzimas con subunidades de unos 250-350 aminoácidos que no requieren metal como cofactor.
- Alcohol deshidrogenasas de cadena media (MDRs). Son enzimas de unos 350 aminoácidos por subunidad que mayoritariamente dependen de un ión de zinc para realizar la catálisis.

### **Alcohol deshidrogenasas activadas por hierro**

Esta superfamilia es actualmente la más desconocida, ya que hasta la fecha se han identificado pocos enzimas que pertenezcan a este grupo, siendo éstos de procariotas y de hongos. Aunque la nomenclatura describe a estas proteínas como alcohol deshidrogenasas activadas por hierro, lo cierto es que no todas las proteínas de este grupo requieren un ión de hierro sino que pueden aceptar otros iones divalentes. Los miembros más representativos de esta superfamilia son la alcohol deshidrogenasa II de *Zymomonas mobilis* [Conway et al., 1987] activada por hierro y la alcohol deshidrogenasa IV (Adh4p) de *Saccharomyces cerevisiae* [Williamson et al., 1987] activada por zinc.



### **Alcohol deshidrogenasas de cadena corta (SDR)**

Esta superfamilia está compuesta por alcohol deshidrogenasas dependientes de NAD(P) y, hasta la fecha, se han identificado unos 3000 miembros en las bases de datos de secuencias proteicas, distribuidas en todas las formas de vida. Estos enzimas presentan actividad con un amplio abanico de sustratos: alcoholes, azúcares, aminoácidos, esteroides, retinoides, prostaglandinas y ácidos biliares. Por lo tanto, dentro de la superfamilia de SDRs se encuentran actividades tan diversas como la actividad deshidrogenasa, deshidratasa, sintasa, epimerasa o isomerasa. Son enzimas que participan en el metabolismo de los alcoholes como la ADH de *Drosophila* [Deltombe-Lietaert et al., 1979], metabolismo de los retinoides como hRDH-TBE de células humanas epiteliales [Soref et al., 2001], glicosilación de proteínas como la GAP-d-manosa 4,6-deshidratasa del virus del *Paramecium bursaria* [Rosano et al., 2005] o en el metabolismo de los ácidos grasos como la Ybr159p de *Saccharomyces cerevisiae* [Beaudoin et al., 2002].

Son proteínas que se encuentran ubicadas en diferentes compartimentos celulares, por lo que podemos encontrar miembros de esta familia con dominios transmembrana, péptidos señal o incluso pueden estar formando parte de complejos multienzimáticos [Oppermann et al., 2003]. Como resultado de esta variabilidad, la identidad de secuencia dentro de esta superfamilia es de un 15-30%. Sin embargo, aunque no son muchos los residuos estrictamente conservados, los motivos secuenciales característicos de las SDRs son distinguibles: motivo de unión al coenzima, motivos del centro activo y motivos estructurales [Kallberg et al., 2002; Persson et al., 2003]. El dominio de unión a coenzima se sitúa en el extremo amino terminal, mientras que el dominio de unión a sustrato se localiza en el extremo carboxi terminal que, por lo tanto, será el menos conservado en la familia SDR.

### **Alcohol deshidrogenasas de cadena media (MDR)**

Esta superfamilia está compuesta por aproximadamente 1000 secuencias proteicas conocidas con una actividad enzimática muy diversa. La mayoría de las MDRs son deshidrogenasas y/o reductasas, pero también están presentes actividades dismutasa, esterasa, metilformato sintasa, liasa y variantes no catalíticas como proteínas de unión a receptores nucleares, proteínas de unión al ADN, proteínas involucradas en el tráfico de proteínas de membrana y las proteínas estructurales como la  $\zeta$ -cristalina presente en el cristalino [Persson et al., 1994; Riveros-Rosas et al., 2003]. Las MDRs también poseen una distribución subcelular diversa, localizándose de manera mayoritaria en citoplasma, pero también en mitocondria, núcleo y membranas.

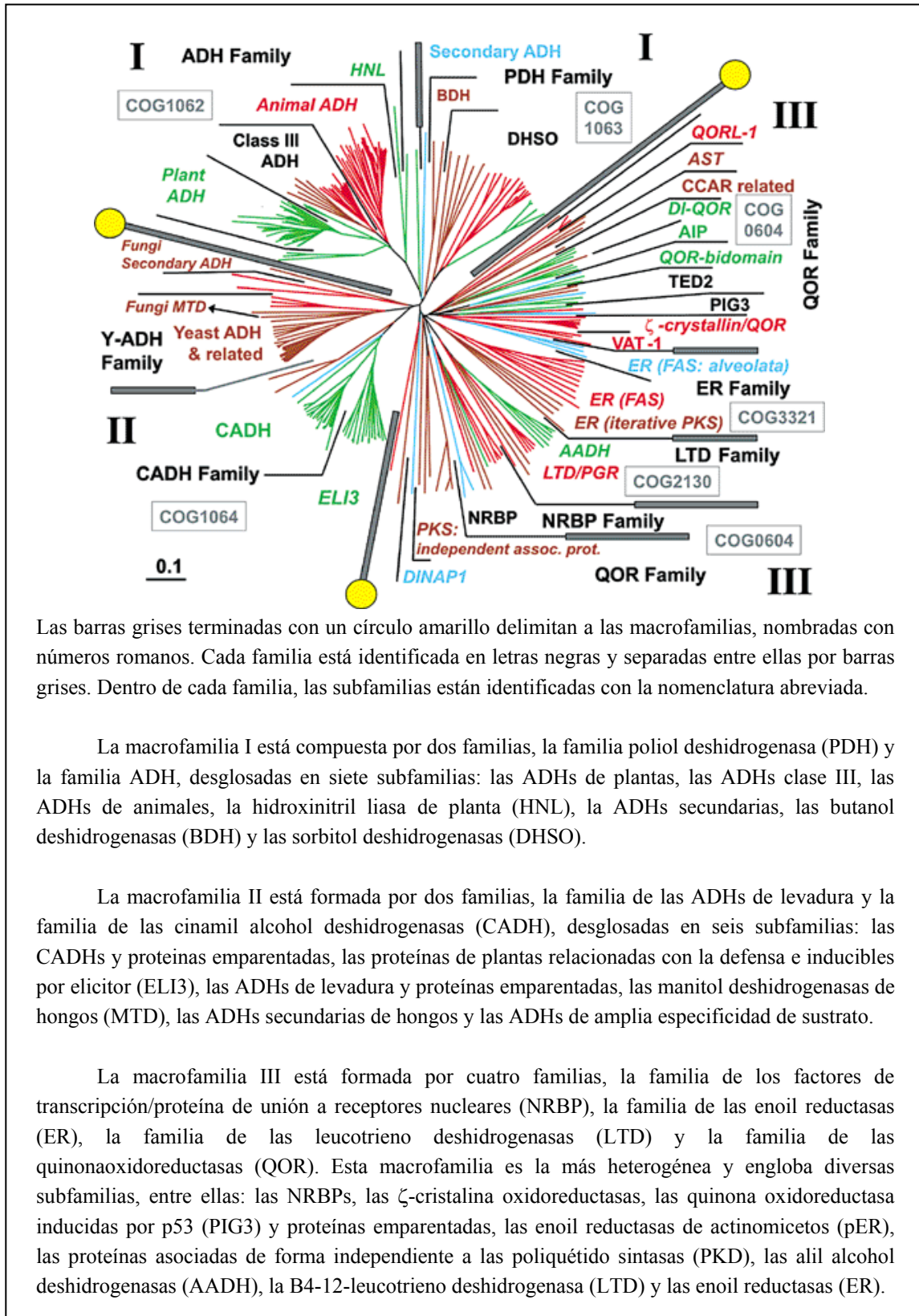
Las MDRs son proteínas compuestas de subunidades de unos 350 residuos, estructuradas en dímeros o tetrámeros. Aunque históricamente esta superfamilia ha sido conocida como la de las alcohol deshidrogenasas dependientes de Zn, aproximadamente la mitad de los miembros de esta superfamilia no requieren un átomo de zinc para llevar a cabo la catálisis [Nordling et al., 2002]. La mayoría de estas alcohol deshidrogenasas utilizan NAD(H) o NADP(H) como cofactor aunque algunas proteínas pueden no requerir ningún tipo de cofactor para su función, como la alginato liasa de proteobacteria [Riveros-Rosas et al., 2003].

### **Características generales de las MDRs**

Han sido muchos los intentos de clasificación de las MDRs en diferentes familias. La secuenciación completa del genoma de varias especies ha permitido analizar e identificar a nuevas proteínas pertenecientes a la familia MDR, así como realizar una clasificación filogenética y funcional de todos sus miembros [Jörnvall et al., 1999; Jörnvall et al., 2001; Nordling et al., 2002; Riveros-Rosas et al., 2003]. De entre todos los estudios realizados, el perteneciente a Riveros-Rosas y colaboradores es, además del más reciente, el más extenso ya que han utilizado 583 secuencias de MDRs pertenecientes a arcaes, bacterias, protistas, hongos, plantas y animales.

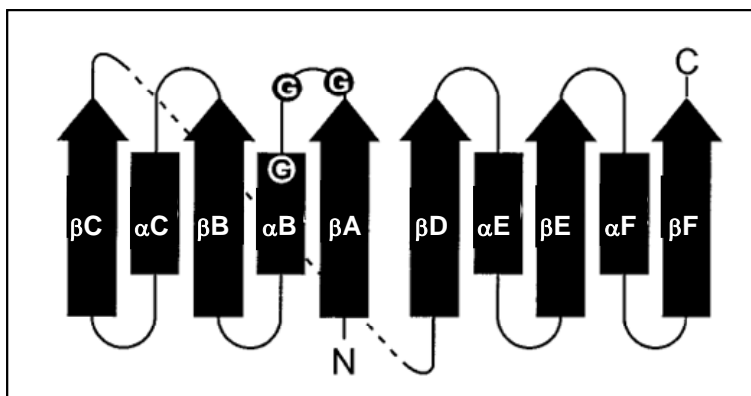
La clasificación que Riveros-Rosas y colaboradores han propuesto para MDRs eucariotas representa a 328 proteínas y divide a la superfamilia de las MDRs en tres macrofamilias que engloban a su vez diversas familias y subfamilias (Figura 1):

- Macrofamilia I: son proteínas homodiméricas que requieren el ión de zinc para la catálisis y utilizan el cofactor NAD(H), a excepción de la ADH8 de *rana perezi* que es dependiente de NADP(H) [Peralba et al., 1999]. Suelen ser proteínas citoplasmáticas aunque también se han detectado en núcleo [Iborra et al., 1992; Fernández et al., 2003].
- Macrofamilia II: Son proteínas estructuradas en homodímeros o homotetrámeros que requieren el ión de zinc para la catálisis. Se localizan en el citoplasma y requieren NAD(H) y NADP(H) como coenzima.
- Macrofamilia III: son proteínas que no requieren zinc en la catálisis y utilizan mayoritariamente al NADP(H) como cofactor. Su localización celular es muy diversa.



**Figura 1:** Análisis filogenético de 328 secuencias proteicas de MDRs eucariotas. En rojo las proteínas del reino animal, en verde el reino vegetal, en marrón el reino de los hongos y en azul el reino protistas. [Riveros-Posas et al., 2003].

Actualmente se conocen las estructuras terciarias de, por lo menos, un miembro de cada familia de las MDRs. El alineamiento estructural de 14 proteínas representativas de las tres macrofamilias ha revelado una alta conservación en el patrón estructural, a pesar de la alta divergencia de sus secuencias de aminoácidos, actividades y funciones que realizan. El dominio de unión a coenzima está presente en todas las familias, presentando el característico plegamiento de Rossmann [Rossmann et al., 1974]. Se trata de seis hojas  $\beta$  paralelas flanqueadas por hélices  $\alpha$  dispuestas de manera alternada ( $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$ ), siguiendo un orden 321456 (Figura 2). El dominio catalítico repartido entre los extremos amino y carboxilo está también muy conservado en cuanto a estructura tridimensional. No obstante, el extremo amino es la región que presenta mayor variabilidad dado que la macrofamilia III carece del ión de zinc. [Julián-Sánchez, A. y Riveros-Rosas, H., 2005].



### **MDRs con catálisis dependiente de Zn**

Las alcohol deshidrogenasas de la familia de las MDR que requieren un ión de zinc para la catálisis, pertenecen a las macrofamilias I y II. Son las ADHs de vertebrado, ADHs de plantas, ADHs de levadura, poliol deshidrogenasas y cinamil alcohol deshidrogenasas [Nordling et al., 2002; Riveros-Posas et al., 2003]. Son proteínas que presentan un 20% de identidad entre familias pero que mantienen una elevada homología estructural por subunidad, aunque diferentes estructuras cuaternarias ya que forman homodímeros o homotetrámeros.

Fue hace tres décadas cuando Brändén y colaboradores, y más tarde Eklund y colaboradores, resolvieron la estructura cristalográfica de la ADH de hígado de caballo (HLADH), históricamente el miembro más representativo de las MDRs dependientes de zinc [Brändén et al., 1973; Eklund et al., 1976]. Posteriormente se han resuelto muchas estructuras de MDR dependientes de zinc y se ha comprobado que todas mantienen las mismas características estructurales: el plegamiento de Rossmann que facilita la unión al coenzima y

una rotación de 10° entre dominios de las formas *apo* y *holo* que favorece a la catálisis [Eklund, H. y Brändén, C.I., 1979; Eklund, H. y Brändén, C.I., 1987]. Se trata de proteínas formadas por subunidades de aproximadamente 40 kDa que presentan dos dominios, uno catalítico y otro de unión al cofactor, separados por una profunda hendidura y dos átomos de zinc, uno con función estructural y otro con función catalítica. El espacio creado entre ambos dominios describe al centro de unión al coenzima y centro de unión al sustrato (Figura 3).



**Figura 3: Estructura de la HLADH.** Los iones de zinc están representados como esferas grises y la molécula de coenzima está representada en forma de modelo de bolas y bastones.

### Centro de unión al coenzima

Para que se produzca la catálisis, la molécula de coenzima debe estar bien posicionada dado que la transferencia del protón se tiene que dar al C4 de la nicotinamida. La adecuada ubicación del coenzima para que se de el reconocimiento del anillo de nicotinamida implica una unión fuerte con la proteína a través de múltiples interacciones, lo que crea un conflicto dado que no facilita su disociación una vez finalizada la catálisis. Es por esta circunstancia que la liberación de coenzima suele ser el paso limitante de la catálisis en las ADHs. La molécula de NAD(P) forma entre 16 y 19 puentes de hidrógeno con la proteína, de los cuales el 30% está

mediado por moléculas de agua [Bottoms et al., 2002]. La hendidura entre dominios que forma el centro de unión al coenzima se puede dividir en tres zonas; las de unión a la adenina, el pirofosfato y la nicotinamida, siendo la nicotinamida la más interna [Eklund, H. y Brändén, C.I., 1987].

La adenosina se emplaza en la región más externa del centro de unión al coenzima, quedando accesible al solvente. Entre los residuos involucrados en la interacción con la ribosa se encuentran las glicinas 199, 201 y 202 (tomando siempre como base la numeración de la HLADH). El patrón GXGXXG está altamente conservado en toda la familia y forma el enlace entre la hoja  $\beta$ A y la hélice  $\alpha$ B del dominio de Rossmann (Figura 2). Un residuo importante para discriminar entre la unión del NAD(H) o NADP(H) es el aminoácido situado en la posición 223. Para las ADH con actividad dependiente de NAD(H) este residuo suele ser un Asp223. El volumen de la cadena lateral del aspártico, así como la carga negativa que aporta a la región de unión de la ribosa de la adenina impedirían la adecuada ubicación de la molécula de NADP(H) dado que se generarían interacciones estéricas y electrostáticas con el fosfato adicional. Para ADHs con actividad dependiente de NADP(H) este residuo suele ser neutro y menos voluminoso, como una serina o glicina (Fan et al., 1991).

El pirofosfato se sitúa en la región intermedia, prácticamente enterrado en la estructura de la proteína. Los residuos Arg47 y Arg369 y los nitrógenos de la cadena principal de la proteína estabilizan a los oxígenos del pirofosfato mediante puentes de hidrógeno. En la unión también participan los residuos Gly199, Gly201 y Gly202 que permiten que el coenzima se acerque a la cadena principal de la proteína. Los momentos dipolares de las hélices implicadas confieren al centro de unión una densidad de carga positiva, que en consecuencia hace que la interacción pirofosfato-proteína sea una de las más fuertes en la unión del coenzima por lo que los residuos implicados se encuentran altamente conservados en las MDRs.

La nicotinamida se une en la región más cercana al zinc catalítico. Para la HLADH la cara A del anillo se orienta hacia el espacio reservado para el sustrato de manera que en la oxidoreducción se transfiere el hidrógeno H4Re. Es una transferencia estereoespecífica resultado de la reorganización del centro activo. La disposición del anillo de nicotinamida en relación al sustrato determinará qué hidrogeno será transferido (H4Re para enzimas pro-R o tipo A, y H4Si para enzimas pro-S o tipo B) [Weinhold et al., 1991]. La carga positiva del anillo de nicotinamida facilita la unión del alcohol y la posterior formación del alcoholato al que contribuye a estabilizar durante la catálisis [Eklund, H. y Brändén, C.I., 1987].

### **Átomos de zinc**

El zinc estructural no está presente en todas las MDRs dependientes de zinc. En aquellas que sí lo presentan, las cisteínas 97, 100, 103 y 111, ubicadas en un loop superficial se encargan de su coordinación. Se ha descrito que la presencia de este átomo de zinc mantendría la orientación correcta de la región en la que se encuentra, permitiendo la correcta interacción entre subunidades y por lo tanto, manteniendo la estabilidad de la estructura cuaternaria [Karlsson et al., 1995]. La interacción entre subunidades ha sido descrita como interacciones hidrofóbicas entre seis hojas  $\beta$  del dominio de unión al coenzima de cada subunidad, que crean una estructura compacta de doce hojas  $\beta$  antiparalelas con los dominios catalíticos expuestos al medio [Eklund et al., 1976].

El zinc catalítico se encuentra en el fondo de la hendidura que une al coenzima, unido por enlaces coordinados a los grupos sulfidrilo de los residuos Cys46 y Cys174, y al imidazol del residuo His67. El cuarto ligando del zinc es una molécula de agua que forma un puente de hidrógeno con el hidroxilo del residuo 48 (generalmente Ser o Thr). En la reacción de oxidación, el ión de zinc proporciona la carga positiva necesaria para la formación del alcoholato, ayudando a su estabilización hasta la transferencia del hidruro al  $\text{NAD}^+$ . Sin embargo, en la reacción de reducción actúa como un atractor de electrones, que incrementa el carácter electrófilo del aldehído, facilitando la transferencia del ión hidruro del NADH al aldehído [Kvassman et al., 1981; Eklund, H. y Brändén, C.I., 1987].

### **Centro de unión al sustrato y catálisis**

El centro de unión al sustrato es una hendidura que se encuentra expuesta al medio aunque el cambio conformacional provocado por la entrada del coenzima la deja aislada del solvente. Las características del centro de unión del sustrato junto con las interacciones del sustrato con el túnel hidrofóbico del enzima, favorecen la reacción de oxidación de alcoholes dado que proporcionan un entorno anhidro. Para el enzima HLADH se ha descrito el proceso de catálisis para la oxidación de alcoholes. Se trata de un mecanismo cinético ordenado Bi-Bi. La reacción se inicia con la unión del coenzima  $\text{NAD}^+$  que genera una rotación de 10 Å del cuerpo rígido de los dominios catalíticos que como resultado acercan el centro de unión a la molécula de coenzima. La unión va seguida por la ionización de la molécula de agua que coordina al zinc, de manera que queda coordinado por un hidroxilo y se libera un protón. Este protón es liberado a la superficie mediante un sistema de transmisión que involucra a los residuos His51 y Ser/Thr48. El sustrato se acerca al zinc catalítico desplazando al hidroxilo que lo coordinaba.

Las características del ión de zinc y el microentorno favorecen la ionización del alcohol y el protón liberado formará una molécula de agua junto con el hidroxilo desplazado [Kvassman et al., 1981]. Seguidamente se produce la transferencia del hidruro al C4 del  $\text{NAD}^+$  con la consiguiente formación del aldehído y la reducción del  $\text{NAD}^+$  a NADH. Finalmente se disocian el sustrato y el coenzima reducido, siendo habitualmente este último paso el limitante de la reacción.

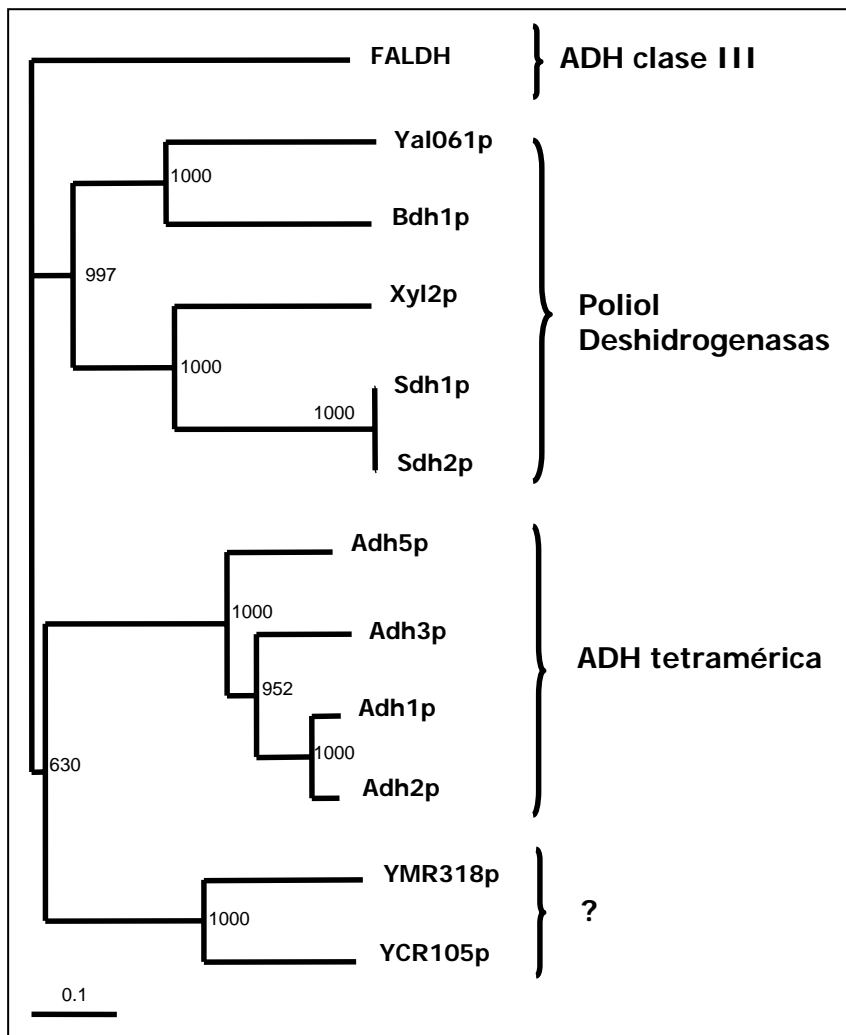
### **Actividad alcohol deshidrogenasa en *Saccharomyces cerevisiae***

El termino *Saccharomyces* es latín moderno y proviene del griego (azúcar y hongo). *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más utilizada en los estudios de laboratorio, siendo el primer organismo eucariota cuyo genoma ha sido secuenciado. Es un organismo que ha evolucionado consiguiendo una utilización óptima de la fuente de carbono disponible, lo que significa que combina los metabolismos fermentativo y oxidativo de una forma adecuada. Muestra el efecto Crabtree, es decir, una predominancia de la fermentación alcohólica en la degradación de carbohidratos fermentables, como la glucosa, en presencia de oxígeno. Este hecho es debido a una insuficiente capacidad o represión del metabolismo respiratorio, que conduce a un exceso de piruvato. Por lo tanto, la levadura producirá alcohol aún en presencia de oxígeno. Son varios los enzimas con actividad alcohol deshidrogenasa presentes en la célula de levadura, incluso muchos de ellos utilizan sustratos idénticos o muy similares. Sin embargo, serán las condiciones y necesidades del cultivo las que determinen los enzimas que se encargarán de dicha actividad en cada situación por lo que estas proteínas con actividad alcohol deshidrogenasa tendrán diferentes patrones de expresión, así como diferentes características cinéticas.

En presencia de glucosa (u otra fuente de carbono fermentable), un cultivo de levadura tendrá preferencia por un metabolismo fermentativo. La glicólisis generará NADH que deberá ser oxidado a  $\text{NAD}^+$ , con la consiguiente reducción del acetaldehído a etanol. Cuando se agote la fuente de carbono fermentable, el metabolismo pasará a ser oxidativo y el etanol formado será oxidado a acetaldehído. El acetaldehído será oxidado a acetato, que será transformado a acetyl-CoA, el cual podrá entrar en el ciclo de Krebs. Por lo tanto, cada condición necesitará de enzimas diferentes capaces de actuar de manera correcta y concordante con las características del medio.



Desde que en 1996 se completara la secuenciación del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* [Goffeau et al., 1996], la búsqueda de nuevos genes pertenecientes a una familia proteica cuyos productos génicos no habían sido aún caracterizados, se ha visto favorecida. Partiendo de un motivo conservado dentro de una familia de proteínas podemos llegar a conocer qué ORFs pueden codificar por proteínas de estructura y función similar. En nuestro laboratorio se utilizó el motivo GHEX<sub>2</sub>GX<sub>5</sub>(G,A)X<sub>2</sub>(I,V,A,C,S) [Sun, H.W. y Plapp, B.V., 1992], característico de las alcohol deshidrogenasas de cadena media que unen zinc, para identificar a nuevos miembros de la familia MDR dependiente de zinc. Como resultado de la búsqueda se identificaron 12 genes que se correspondían con ocho proteínas ya caracterizadas (Adh1p, Adh2p, Adh3p, Adh5p, Sfa1p, Sdh1p, Sdh2p y Xyl2p) y cuatro nuevas secuencias: YAL060W, que ha sido caracterizada en nuestro laboratorio como una 2,3-butanodiol deshidrogenasa [González et al., 2000], YAL061W, todavía sin caracterizar y YMR318W y YCR105C que han sido el objeto de estudio de esta tesis [Larroy et al., 2002a; Larroy et al., 2002b]. En la figura 4 se ha representado la clasificación filogenética de estos enzimas.



**Figura 4.** Análisis filogenético de las alcohol deshidrogenasas MDR que unen zinc de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los números indican la prueba de bootstrap obtenida con 1000 repeticiones. Obtenido de Larroy et al., 2003.

Más tarde, Jörnvall y colaboradores realizaron una búsqueda menos específica utilizando el patrón GHE que se encuentra a unos 60 residuos del dominio N-terminal y el patrón GX<sub>1-3</sub>GX<sub>1-3</sub>G, con lo que se identificaron un total de 17 genes que codificarían por proteínas de la familia de las MDRs, aunque estos cinco nuevos miembros no unirían zinc (*YBR046C*, *YCR102C*, *YLR460C*, *YML131W* y *YNL134C*) [Jörnvall et al., 1999]. Por otra parte, se han descrito en la levadura actividades alcohol deshidrogenasa catalizadas por enzimas diferentes a las ADHs, como son las aldocetorreductasas (AKRs) [Ford, G. y Ellis, E.M., 2002] y otras proteínas no clasificadas todavía dentro de una familia conocida [Wales, M.R. y Fewson, C.A., 1994; Van Iersel et al., 1997].

### **Adh1p**

Adh1p fue purificada y secuenciada en 1979 [Wills, C. y Jörnvall, H., 1979] y posteriormente, en 1982, se dio a conocer la secuencia de *ADH1* [Bennetzen, J.L. y Hall, B.D., 1982]. Se trata de una alcohol deshidrogenasa formada por cuatro subunidades de 347 aminoácidos, localizada en el citoplasma [Ciriacy, M., 1975]. Utiliza únicamente al NAD(H) como coenzima y es activa preferentemente con etanol dado que su eficiencia catalítica disminuye con la longitud de la cadena carbonada. Prácticamente no presenta actividad con alcoholes ramificados o cíclicos, y es inactiva con alcoholes secundarios [Green et al., 1993; Dickinson, F.M. y Dack, S., 2001; Leskovac et al., 2002]. También se ha detectado actividad hemiacetal alcohol deshidrogenasa para metilformato y etilformato [Kusano et al., 1998]. La actividad de Adh1p se induce cuando en el medio hay glucosa u otras fuentes de carbono fermentables, para convertir acetaldehído en etanol durante el crecimiento fermentativo [Denis et al., 1983]. De esta forma se regenera el NAD<sup>+</sup> glicolítico, función que sólo realiza Adh1p dado que Adh3p, enzima mitocondrial de similar especificidad, no podría realizar dicha función porque el NADH no puede entrar libremente en la mitocondria [Ciriacy, M., 1997].

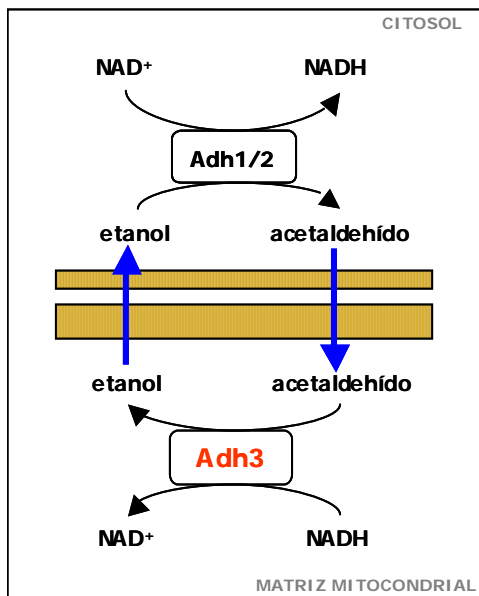
### **Adh2p**

Adh2p es una alcohol deshidrogenasa tetramérica compuesta por subunidades de 347 aminoácidos [Wills, C. y Jörnvall, H., 1979; Russell et al., 1983]. Localizada en el citosol y con una actividad dependiente de NAD(H), comparte un 93% de identidad de secuencia con Adh1p, lo que implica que tan sólo difieren en 22 aminoácidos. Aunque al parecer estas diferencias no están localizadas en grupos implicados en la catálisis, son suficientes para que Adh2p presente unas características cinéticas diferentes a las de Adh1p. Este enzima presenta valores de *k<sub>cat</sub>* similares a Adh1p pero valores de *K<sub>M</sub>* inferiores, lo que se traduce, por tanto, en una mejor eficiencia catalítica, y oxida eficientemente alcoholes de cadena larga [Ganzhorn et al., 1987;

Dickinson, F.M. y Dack, S., 2001]. *ADH2* está reprimido en presencia de glucosa u otras fuentes de carbono fermentables. Cuando el metabolismo es aeróbico, Adr1p bloquea la represión de *ADH2* para que Adh2p oxide el etanol a acetaldehído. Adh2p es la principal ADH oxidativa en la levadura.

### Adh3p

Purificada por Wenger y colaboradores, Adh3p es una alcohol deshidrogenasa tetramérica compuesta por subunidades de 375 aminoácidos, que se localiza en la mitocondria [Wenger, J.I. y Bernofsky, C., 1971]. Presenta un 80% de identidad con Adh1p y Adh2p sin considerar los 28 aminoácidos del extremo N-terminal que dirigen su transporte a mitocondria [Bennetzen, J.L. y Hall, B.D., 1982; Russell et al., 1983]. Al igual que las ADHs citosólicas, su actividad es dependiente de NAD(H) y sus características cinéticas son muy similares a las descritas para Adh1p. Al parecer, Adh3p formaría parte, junto con otra ADH citosólica, de la lanzadera etanol-acetaldehído que permitiría el intercambio de equivalentes redox NAD<sup>+</sup>/NADH entre el citosol y la mitocondria. Así, en la figura 5 se muestra el funcionamiento de la lanzadera en el acoplamiento de la oxidación de NADH mitocondrial a una deshidrogenasa dependiente de NADH citosólica (por ejemplo, en un mutante *ndi1Δ*)



**Figura 5.** Esquema de la participación de Adh3p en el mantenimiento del balance redox. [Bakker et al., 2000]

### Adh4p

Codificada por *ADH4*, Adh4p es un enzima homodimérico formado de subunidades de 465 aminoácidos. No se trata de una alcohol deshidrogenasa de la familia MDR y por lo tanto su estructura es totalmente diferente. Adh4p es dependiente de NAD(H) y cataliza la oxidación

del etanol, aunque su eficiencia catalítica es bastante inferior a la presentada por las otras ADHs, Adh1p, Adh2p o Adh3p. No es activa con alcoholes primarios con más de cuatro carbonos ni con alcoholes secundarios. Sin embargo su actividad no se ha detectado en condiciones normales dado que no hay expresión de *ADH4* [Drewke, C. y Ciriacy, M., 1988].

### **Adh5p**

*ADH5* codifica por una alcohol deshidrogenasa de 351 aminoácidos por subunidad que todavía no ha sido purificada ni caracterizada. Su secuencia polipeptídica presenta un 80% de similitud con Adh1p y Adh2p, por lo que son claros los patrones característicos de la familia de las ADHs-MDR. Al parecer se trataría de una proteína capaz de unir NAD(H) y que tendría dos átomos de Zn por subunidad.

### **Adh6p y Adh7p**

La caracterización cinética, estructural y funcional de estas proteínas ha sido el objeto de este trabajo. Los genes *ADH6* y *ADH7* codifican por proteínas homodiméricas compuestas de subunidades de 360 y 361 aminoácidos que comparten un 64% de identidad entre ellas. El análisis de la secuencia polipeptídica de estas proteínas reveló la existencia de los patrones típicos de las alcohol deshidrogenasas de la familia de las MDR: disponían de los ligandos de unión a los átomos de zinc catalítico y estructural, así como los residuos característicos de la unión al coenzima. Sin embargo, y a diferencia de las otras alcohol deshidrogenasas de la familia de las MDR, estas dos proteínas tenían un residuo Ser en la posición 223, lo que las hacía capaces de utilizar NADP(H) como coenzima. La secuencia de estas proteínas también reveló un dato interesante, y es que parecían formar parte de la familia de las cinamil alcohol deshidrogenasas (CADH), que hasta el inicio de este estudio sólo había sido descrita en plantas.

### **FALDH**

La formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) está codificada por el gen *SFAI* [Wehner et al., 1993; Fernández et al., 1995]. Se trata de una proteína dimérica compuesta por subunidades de 385 aminoácidos dependiente de NAD(H). Su función celular está relacionada con la desintoxicación del formaldehído generado endógenamente y la reducción del S-nitrosoglutatión (aducto del glutatión y óxido nítrico) [Jensen et al., 1998; Fernández et al., 2003].

### **Sdh1p y Sdh2p**

*Saccharomyces cerevisiae* tiene dos genes que codifican por sorbitol deshidrogenasas *SOR1* y *YDL246C*. Son MDRs tetraméricas compuestas de subunidades de 358 aminoácidos, que comparten un 99% de identidad. Su actividad es dependiente de NAD(H) y actuarían en la producción de fructosa a partir de sorbitol [Sarthy et al., 1994].

### **Xyl2p**

Xyl2p es una xilitol deshidrogenasa codificada por *XYL2*. Se trata de una proteína, que aún no se ha purificado, de subunidades de 356 aminoácidos que posiblemente se combinarían formando tetrameros dada su similitud con las sorbitol deshidrogenasas. Este enzima actúa en la asimilación de xilosa ya que el xilitol resultante de su reducción sería nuevamente oxidado a xilulosa por Xyl2p, con lo que entraría en la vía de las pentosas [Richard et al., 1999].

### **Bdh1p y Yal061p**

Bdh1p y Yal061p (ésta todavía sin caracterizar) comparten un 51% de identidad. *BDH1* codifica por una subunidad de 358 aminoácidos que se estructura en forma de homodímero. Este enzima tiene actividad 2,R-3,R-butanodiol deshidrogenasa y acetoína reductasa, aunque también reduce de forma menos eficiente otros compuestos como el diacetilo y la 2,3-pentanodiona. En *Saccharomyces cerevisiae*, Bdh1p participa en la producción de 2,3-butanodiol, reduciendo el diacetilo formado espontáneamente a acetoína, y reduciendo también la acetoína a 2,3-butanodiol [González et al., 2000].

### **Otras actividades alcohol deshidrogenasa dependientes de NADP(H)**

Se ha descrito la purificación y caracterización de varias proteínas capaces de oxidar alcoholes y reducir aldehídos utilizando como coenzima al NADP(H). Ya en 1994, Wales y Fewson describieron un enzima activo con alcoholes primarios e inactivo con alcoholes secundarios, cuya actividad aumentaba con la longitud de la cadena carbonada, hasta un punto óptimo para C5. La reducción de aldehídos era unas diez veces más eficiente que la oxidación de su correspondiente alcohol. Se trata de una proteína monomérica de 43.5 kDa de la que se desconoce el gen que la expresa [Wales, M.R. y Fewson, C.A., 1994].

Posteriormente se caracterizó otra proteína monomérica (37 kDa) con actividad oxidorreductasa. Se trataba de un enzima expresado en condiciones anaeróbicas que presentaba actividad con alcoholes primarios alifáticos y ramificados, incrementando su eficiencia catalítica con la longitud de la cadena carbonada. Remarcablemente esta proteína llamada bcADH (branched-chain ADH) podía utilizar de forma eficiente tanto  $\text{NAD}^+$  como  $\text{NADP}^+$  aunque la actividad dependiente de  $\text{NADP}^+$  fuera ligeramente más favorable. Se ha propuesto que la bcADH participaría en la producción de alcoholes superiores y/o ayudando al mantenimiento del balance  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  durante la fermentación alcohólica [Van Iersel et al., 1997].

También han sido varios los enzimas que se han caracterizado en base a su actividad 3-metilbutanal reductasa dependiente de NADPH. Van Nederveelde y colaboradores purificaron dos enzimas de 72 kDa y 43 kDa. Estas proteínas eran activas con una gran variedad de aldehídos, desde aldehídos alifáticos lineales, ramificados, aldehídos aromáticos, y otros compuestos como el metilglioxal, el diacetilo o el gliceraldehído aunque presentaban actividades específicas no muy elevadas (alrededor de las 15 y 50 U/mg) [Van Nederveelde et al., 1997]. La función de estas oxidorreductasas estaría relacionada con la reducción de los carbonilos presentes en el mosto durante la fermentación.

Recientemente se ha caracterizado un enzima de la familia de las aldocetoreductasas (familia AKR3), Ypr1p, con actividad 2-metilbutanal reductasa entre otras [Ford, G. y Ellis, E.M., 2002]. Ypr1p sería la responsable de aproximadamente la mitad de la actividad 2-metilbutanal reductasa dependiente de NADPH presente en la célula de levadura crecida en medio YPD.

### **Cinamil Alcohol Deshidrogenasas (CADH)**

La lignina es un polímero que se encuentra en la pared celular de las plantas para aportar un soporte estructural, hidrofobicidad a los elementos vasculares y defensa mecánica contra la biodegradación. Está formada por la combinación de tres monómeros de monolignol,  $\rho$ -cumaril alcohol, coniferil alcohol y sinapil alcohol, que forman diferentes tipos de enlace entre ellos generando un polímero. La reducción de los derivados cinamaldehídos catalizada por las cinamil alcohol deshidrogenasas (CADH) es el último paso enzimático en la formación de los monolignoles. Algunas especies como *Arabidopsis thaliana* presentan 8 genes que codificarían por CADH mientras que *Eucalyptus gunii* tan sólo presenta 3. Esta multiplicidad

genética de la familia CADH dentro de una misma especie explica las diferencias encontradas en la composición de lignina a lo largo del desarrollo, entre diferentes tipos celulares y entre subcapas de una misma pared celular. Entre diferentes especies también se encuentran diferencias en la abundancia de los diferentes monolignoles y en su constitución. Estos hechos implican una regulación en uno o varios pasos de la síntesis de la lignina, así como una amplia diversidad en las características cinéticas de los enzimas que componen el sistema CADH de una especie [Li et al., 2001; Boudet et al., 2004].

Las cinamil alcohol deshidrogenasas (E.C. 1.1.1.195) catalizan la conversión de  $\rho$ -hidroxicinamaldehydos a sus correspondientes alcoholes. Es una reacción dependiente de NADP(H). Tal y como se ha avanzado en esta introducción, constituyen una familia enzimática perteneciente a la superfamilia de las MDRs. La primera CADH que se purificó y caracterizó cinéticamente fue la CAD de soja [Wyrambik, D. y Grisebach, H., 1975]. Hasta la fecha se han identificado más de 100 proteínas pertenecientes a esta familia, lo que ha permitido realizar una mejor clasificación de estos enzimas.

La familia de las CADH está formada por tres subfamilias con al menos un 36% de identidad. Dos de estas subfamilias se ubican en el reino de las plantas (CAD y Eli3) mientras que la subfamilia restante está representada en bacterias y hongos (CAD-related o proteínas emparentadas con las CAD):

- Subfamilia CAD: son enzimas diméricos dependientes de NADP(H) que se expresan mayoritariamente en tallos, hecho consistente con la gran lignificación de este órgano dado que la función de estas proteínas estaría en la vía de síntesis de la lignina.
- Subfamilia Eli3: son proteínas diméricas de respuesta a ‘elicitor’ como hongos patógenos, heridas, ácido salicílico o la senescencia en hojas. Esta subfamilia engloba a cinamil alcohol deshidrogenasas, deshidrogenasas de alcoholes aromáticos y manitol deshidrogenasas, todas ellas dependientes de NADP(H) con una única excepción para la Eli3p del apio *Apium graveolens* que es dependiente de NAD(H). La función de estas proteínas sería la de proporcionar compuestos cinamil derivados o fenólicos a la pared celular en situaciones de defensa [Somssich et al., 1996] o como señalizadores celulares [Montesano et al., 2003], y de proporcionar manitol para bloquear los radicales libres resultantes del estrés oxidativo causado por los hongos patógenos.

- Subfamilia CAD-related: son proteínas con actividad dependiente de NADP(H) que únicamente se han encontrado en bacterias, protozoos y *Saccharomyces cerevisiae*. La variedad de sustratos con los que presentan actividad es consecuente con las diferentes funciones que realizan estas enzimas. En bacteria participan en la biosíntesis de lípidos de membrana.

### **Alcoholes superiores en *Saccharomyces cerevisiae***

Cuando las células de levadura utilizan glucosa como fuente de carbono, el resultado principal de la fermentación es la producción de etanol. Pero éste no es el único producto que se genera, ya que podemos encontrar en el medio aunque en menor cantidad, una gran variedad de compuestos como alcoholes, aldehídos, ésteres y ácidos que son productos secundarios de dicha fermentación. Son los compuestos responsables de las características aromáticas y gustativas de vinos, cavas, cervezas y demás bebidas alcohólicas [Ingraham, J.L. y Guymon, J.F., 1960; Antonelli et al., 1999; Aznar et al., 2001]. Debido a sus características organolépticas también son muy apreciados en la industria alimentaria y de fragancias [Martínez-Anaya, M.A., 1996; Ibáñez et al., 1997; Priddy et al., 1999].

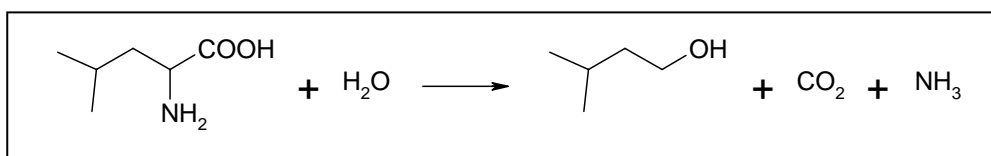
Una vez terminada la fermentación, si se elimina el etanol por destilación, nos queda en el medio toda la mezcla de alcoholes de más de dos carbonos. Esta mezcla de alcoholes es conocida como aceite de fusel y comprende todos los alcoholes superiores o ‘fusel alcohols’. Los alcoholes superiores se forman en la fermentación de todas las levaduras estudiadas hasta la fecha. Derivan de los esqueletos carbonados de aminoácidos siguiendo la vía postulada por primera vez por Ehrlich [Ehrlich, F., 1907], de la que más tarde se establecieron sus bases enzimáticas [Sentheshamuganathan, S., 1960]: aminotransferasas de aminoácidos ramificados (BCAA aminotransferasas), decarboxilasas y alcohol deshidrogenasas. Aunque esta vía es la más importante en la formación de los alcoholes superiores, también se ha observado su formación a partir de la vía biosintética de formación de los aminoácidos desde el esqueleto carbonado de la glucosa [Ingraham, J.L. y Guymon, J.F., 1960]. La contribución de cada vía dependerá de la composición del medio de cultivo y de la necesidad de síntesis o degradación de los aminoácidos.

Cuando Ehrlich en 1907 estudió fermentaciones de levadura utilizando glucosa como fuente de carbono, advirtió que la presencia de leucina y/o isoleucina incrementaba en un factor



de 7-8 la cantidad de alcoholes superiores. Además esta acumulación de productos iba ligada al consumo de leucina. Dada la similitud estructural entre la leucina y el 3-metilbutanol, y entre la isoleucina y el 2-metilbutanol, propuso la existencia de un enzima hidratante que catalizaría la formación del alcohol (Figura 6).

El hecho de que Ehrlich no observara la liberación de amonio durante la fermentación, le indujo a pensar que el amonio era incorporado en las proteínas de la levadura. Posteriores estudios le permitieron aceptar esta hipótesis para los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, tirosina y triptofano que llevarían a la formación de 3-metilbutanol, 2-metilbutanol, 2-metilpropanol, tirosol y triptofol respectivamente.



**Figura 6:** Formación de 3-metilbutanol a partir de su correspondiente aminoácido, la leucina, propuesta por Ehrlich en 1907.

En 1911, Neubauer y Fromherz estudiaron la vía de formación de los alcoholes superiores a partir de los aminoácidos y, aunque también encontraron la relación entre el consumo de aminoácidos y la formación de sus alcoholes correspondientes, discreparon ante la idea de un enzima hidratante ya que encontraron que los cetoácidos eran intermediarios del proceso [Neubauer, O. y Fromherz, K., 1911]. Sin embargo, no fue hasta 1960 que Sentheshanmuganathan dedujo las actividades que participan en la vía de formación de los alcoholes superiores. Sobre trabajos con extractos libres de células demostró las actividades de transaminación, descarboxilación y reducción. No obstante, las rutas propuestas no coinciden con los conocimientos actuales [Sentheshamuganathan, S., 1960].

También en 1960, Ingraham y Guymon que habían realizado diversos estudios de auxotrofías en la levadura, propusieron que los alcoholes superiores no se formaban únicamente por el catabolismo de los aminoácidos sino que también se podían producir durante el anabolismo como síntesis *de novo* desde glucosa [Ingraham et al., 1961].

Por lo tanto, la ruta metabólica de Ehrlich se iniciaría con la transaminación de los aminoácidos ramificados a sus correspondientes oxoácidos ramificados mediante la acción de las BCAA transaminasas (el amonio se une al 2-oxoglutarato formando glutamato que servirá

como donante de nitrógeno para otros compuestos celulares). El siguiente paso es la formación de los aldehídos ramificados a partir de sus correspondientes oxoácidos ramificados por descarboxilación. Finalmente, los aldehídos ramificados se reducen a sus correspondientes alcoholes, supuestamente por la acción de las alcohol deshidrogenasas.

A bajos niveles de fuente de nitrógeno asimilable, la ruta que predomina es la biosintética, mientras que si se aumentan los niveles de fuente de nitrógeno, la ruta metabólica que adquiere mayor importancia es la ruta propuesta por Ehrlich como resultado de la represión de enzimas clave en la ruta biosintética. En consecuencia, variando la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo de la levadura, se puede dirigir el metabolismo hacia la formación de los alcoholes superiores. Es más, dependiendo de la fuente de nitrógeno escogida se puede estudiar la formación de algunos alcoholes superiores concretos aunque no sea una vía completamente unidireccional sino que se trata de un sistema más complejo [Chen, E.C.H., 1978].

Son muchos los estudios que se han realizado con levadura crecida con determinados aminoácidos como fuente de nitrógeno para tratar de esclarecer los enzimas que intervienen en cada paso de la ruta catabólica (Fig. 7).

### **BCAA transaminasas**

En *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado dos genes que codifican por BCAA transaminasas. Se trata de *BAT1* que codifica por el enzima mitocondrial y *BAT2* que codifica por el enzima citosólico [Eden et al., 1996]. Al parecer sería Bat2p la transaminasa más importante en la ruta de Ehrlich ya que cepas *bat2Δ* tendrían los niveles de alcoholes superiores disminuidos respecto a la cepa silvestre en cultivos crecidos en glucosa y sería incapaz de producirlos cuando el etanol sustituye a la glucosa como fuente de carbono [Yoshimoto et al., 2002; Schoondermark-Stolk et al., 2005]. Sin embargo, aunque en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* no se haya encontrado otro gen que pudiera realizar la función BCAA transaminasa, Dickinson ha propuesto la existencia de otro/s enzima/s que pudieran realizarla dado que la cepa *bat1Δbat2Δ* todavía presenta actividad transaminasa en el citosol [Dickinson, J.R., 2000b].

### **Descarboxilasas**

Se han identificado 5 genes que codifican por descarboxilasas involucradas en la descarboxilación de los oxoácidos a sus correspondientes aldehídos: las piruvato descarboxilasas ya conocidas *PDC1*, *PDC5* y *PDC6*, y las recién caracterizadas *YDL080C* (*KID1*) y *YDR380W* (*ARO10*) [Vuralhan et al., 2005]. *PDC1* es la única actividad piruvato

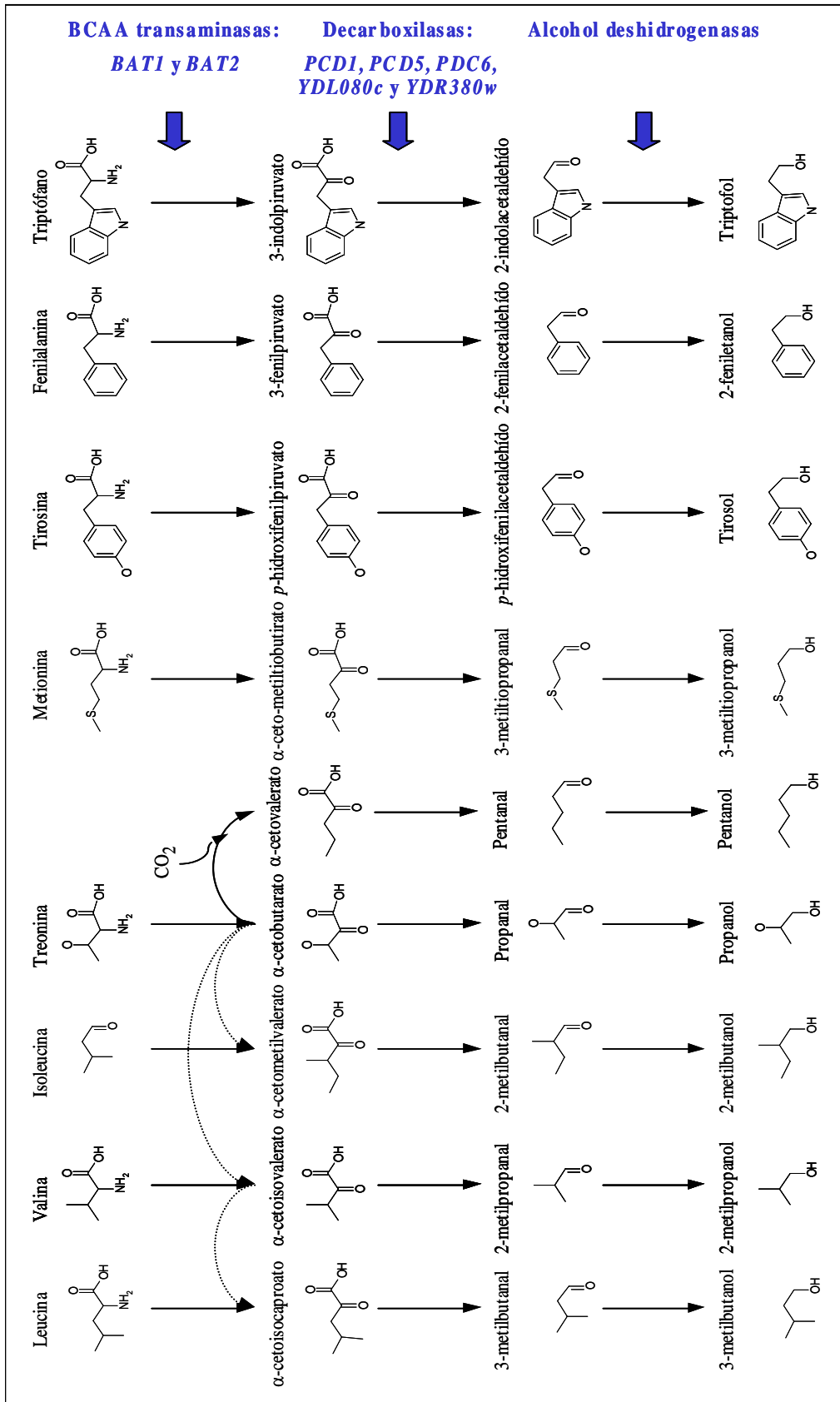
descarboxilasa que se expresa en presencia de glucosa y constituye, por lo tanto, la actividad piruvato descarboxilasa más importante en la célula de levadura. *PDC5* sólo se expresa en glucosa ante la falta de *PDC1* [Yoshimoto et al., 2001], mientras que *PDC6* no se expresa en presencia de glucosa pero sí cuando el etanol es utilizado como fuente de carbono. Aunque todos los enzimas participan en la descarboxilación de oxoácidos, la especificidad de sustrato de cada proteína limita su participación en la formación de los diferentes alcoholes superiores. Han sido los estudios que Dickinson y colaboradores han realizado utilizando la técnica de resonancia magnética nuclear sobre el catabolismo de la leucina, valina e isoleucina los que han permitido esclarecer qué metabolitos se producían como intermediarios de dichas rutas, así como qué descarboxilasas participaban en cada proceso. El catabolismo de la leucina a 3-metilbutanol utilizaría como descarboxilasas a Ydl080p mayoritariamente, pero también estarían involucrados los genes *PDC1*, *PDC5* y *PDC6* [Dickinson et al., 1997]. En el catabolismo de la valina a 2-metilpropanol serían las 3 piruvato descarboxilasas Pdc1p, Pdc5p y Pdc6p las únicas responsables de la descarboxilación a 2-metilpropanal [Dickinson et al., 1998]. Las cinco descarboxilasas participan en la producción de 2-metilbutanol a partir de isoleucina [Dickinson et al., 2000a]. Sin embargo, Ydl080p no estaría involucrada en la descarboxilación del 3-fenilpiruvato a 3-fenillactato [Dickinson et al., 2003] mientras que Ydr380p sería la única descarboxilasa esencial en el catabolismo de la metionina [Perpète et al., 2005].

### **Alcohol deshidrogenasas**

La reducción del aldehído ramificado a su correspondiente alcohol es el último paso de la ruta propuesta por Ehrlich. Históricamente, la hipótesis de que esta reducción la lleva a cabo la alcohol deshidrogenasa Adh1p es la más extendida aunque existe un gran número de investigadores que dudan de la capacidad de este enzima para reducir aldehídos ramificados. Schoondermark-Stolk y colaboradores han realizado un estudio muy reciente sobre la producción de alcoholes superiores en cultivos de levadura crecidos en glucosa o etanol a los que se ha aplicado la técnica de microarrays para determinar la expresión de los genes implicados en las diferentes condiciones. El hecho de que en glucosa la producción de alcoholes superiores sea mayor que en etanol, relacionaría la actividad alcohol deshidrogenasa NAD-dependiente con la reducción de los aldehídos ramificados como una necesidad para compensar el balance celular  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , descompensado durante el alto flujo glicolítico que implica una elevada conversión de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  [Schoondermark-Stolk et al., 2005]. Los estudios de seguimiento de la actividad 2-metilpropanol y 3-metilbutanol deshidrogenasa en cepas en las que se encontraban ausentes *ADH1* y/o *ADH2* han determinado que la actividad estudiada era reflejo únicamente de la participación de *ADH1* dado que la cepa *adh1* $\Delta$  presentaba una disminución de la actividad de 4 veces, mientras que no se observaba ningún efecto en la cepa

*adh2Δ* [Kusano et al., 1998]. Sin embargo, la actividad de Adh1p con los alcoholes superiores es muy baja (4% para el 2-metilpropanol respecto a la actividad con etanol) o nula [Green et al., 1993]. Incluso algunos investigadores han descartado completamente la participación de *ADH1* en la reducción de aldehídos ramificados ya que no han encontrado ninguna correlación entre la reducción de estos compuestos y la actividad de Adh1p [Van Iersel et al., 1997].

Son todas estas dudas sobre el enzima o enzimas implicados en este último paso de la producción de los alcoholes superiores las que nos han hecho plantearnos la posibilidad de que alguno de los ORFs de este estudio (*YCR105C* y *YMR318W*) pudieran estar implicados.



**Figura 6:** Ruta de biosíntesis de los alcoholes superiores en *Saccharomyces cerevisiae* a partir de sus aminoácidos correspondientes. Las líneas sólidas indican pasos directos, las líneas discontinuas indican que en la conversión descrita hay más de una reacción implicada.

## **OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo es completar la caracterización de las ADHs de cadena media dependientes de zinc presentes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Al inicio de este trabajo eran cuatro los genes aún con función desconocida que cumplían todos los requisitos para codificar por MDRs. En una anterior Tesis realizada en nuestro laboratorio se ha caracterizado *YAL060W* y se ha estudiado *YAL061W* [Gonzalez, E., 2004], mientras que los dos genes restantes (*YCR105W* y *YMR318C*) han sido estudiados en el trabajo que aquí se presenta. Por lo tanto, el objetivo de esta Tesis ha sido la caracterización más completa posible de las proteínas codificadas por estos dos genes.

Objetivos parciales:

- Expresión de los genes *YMR318C* y *YCR105W* e identificación de sus productos génicos: Adh6p y Adh7p, dos nuevas alcohol deshidrogenasas de cadena media con actividad dependiente de NADP(H).
- Purificación y caracterización cinética de Adh6p y Adh7p.
- Obtención de la estructura cristalográfica de Adh6p, la primera ADH de *Saccharomyces cerevisiae* cuya estructura ha conseguido determinarse.
- Caracterización funcional de Adh6p y Adh7p. Implicación de estas enzimas en el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*.

# **CAPITULO I**

**Caracterización de Adh6p, una alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* con actividad dependiente de NADP(H)**



# Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction

Carol LARROY, M. Rosario FERNÁNDEZ, Eva GONZÁLEZ, Xavier PARÉS and Josep A. BIOSCA<sup>1</sup>

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (Barcelona), Spain

*YMR318C* represents an open reading frame from *Saccharomyces cerevisiae* with unknown function. It possesses a conserved sequence motif, the zinc-containing alcohol dehydrogenase (ADH) signature, specific to the medium-chain zinc-containing ADHs. In the present study, the *YMR318C* gene product has been purified to homogeneity from overexpressing yeast cells, and found to be a homodimeric ADH, composed of 40 kDa subunits and with a pI of 5.0–5.4. The enzyme was strictly specific for NADPH and was active with a wide variety of substrates, including aliphatic (linear and branched-chain) and aromatic primary alcohols and aldehydes. Aldehydes were processed with a 50-fold higher catalytic efficiency than that for the corresponding alcohols. The highest  $k_{\text{cat}}/K_m$  values were found with pentanal > veratraldehyde > hexanal > 3-methylbutanal > cinnamaldehyde. Taking into consideration the substrate specificity and sequence characteristics of the *YMR318C* gene product, we have proposed

this gene to be called *ADH6*. The disruption of *ADH6* was not lethal for the yeast under laboratory conditions. Although *S. cerevisiae* is considered a non lignin-degrading organism, the catalytic activity of ADHVI can direct veratraldehyde and anisaldehyde, arising from the oxidation of lignocellulose by fungal lignin peroxidases, to the lignin biodegradation pathway. ADHVI is the only *S. cerevisiae* enzyme able to significantly reduce veratraldehyde *in vivo*, and its overexpression allowed yeast to grow under toxic concentrations of this aldehyde. The enzyme may also be involved in the synthesis of fusel alcohols. To our knowledge this is the first NADPH-dependent medium-chain ADH to be characterized in *S. cerevisiae*.

**Key words:** cinnamyl alcohol dehydrogenase, fusel alcohols, lignin metabolism, veratraldehyde.

## INTRODUCTION

Alcohol dehydrogenases (ADHs) catalyse the reversible oxidation of alcohols to aldehydes or ketones with the corresponding reduction of NAD<sup>+</sup> or NADP<sup>+</sup>. They are grouped into at least three families of enzymes; (1) medium-chain dehydrogenases/reductases (MDRs), containing approx. 350 residues per subunit; (2) short-chain dehydrogenases/reductases ('SDR'), with approx. 250 residues per subunit; and (3) iron-activated ADHs [1,2]. MDRs constitute a wide protein family with many different enzymic activities, including, among others, alcohol dehydrogenase, polyol dehydrogenase, glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, cinnamyl alcohol dehydrogenase and quinone oxidoreductase activities [3]. Although some of the MDRs contain zinc and use this metal in the catalytic reaction, others, such as quinone oxidoreductases, do not.

The recent completion of several genome projects has allowed the search of putative MDRs to be carried out among the deduced open reading frames (ORFs). Thus the *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* genomes have been screened for MDRs [4,5]. The analysis of the yeast genome for typical patterns of MDRs revealed 17 genes, which appeared to be members of this protein family [4].

MDRs that use zinc in their catalytic reaction possess a sequence motif known as the zinc-containing ADH signature [GH<sub>2</sub>EX<sub>2</sub>GX<sub>3</sub>(G,A)X<sub>2</sub>(I,V,A,C,S); single amino acid residue no-

tation, and where X is any amino acid residue] [6,7], including a histidine residue that is one of the ligands of the catalytic zinc. In a previous report [8], we used this motif to identify MDRs with zinc-dependent ADH activity in *S. cerevisiae*. The survey revealed 12 sequences with nine representing known MDR genes, including *ADH1* [9], *ADH2* [10–12], *ADH3* [13], *ADH5* [14], *SFA1* [15–17], *SOR1* [18], *YDL246C* (possessing 99% identity with *SOR1*), *XYL2* (a xylitol dehydrogenase) [19] and *BDH1* (a (2R, 3R)-2,3-butanediol dehydrogenase [8]), and three putative ADHs with unknown function. The three MDR genes with unknown function were *YAL061W* (51% sequence identity with *BDH1*), *YMR318C* and *YCR105W* (64% identity between them). Among these 12 sequences, only *YMR318C* and *YCR105W* have the characteristics of an NADPH-dependent ADH. The five additional sequences found by Jörnvall et al. [4] are most probably MDRs that do not use zinc in their catalytic reaction.

In the present study, we report the characterization of a novel MDR gene, *YMR318C*, from the *S. cerevisiae* genome. In order to identify its function, the gene was overexpressed and the resulting enzyme was purified to homogeneity and its enzymic activity characterized. The enzyme was active towards a wide spectrum of linear, branched-chain and aromatic primary alcohols and aldehydes using NADPH as the coenzyme. These results demonstrate that *YMR318C* encodes an NADPH-dependent ADH. Further analysis, including the use of a null mutant strain, has been performed to determine its role in *S. cerevisiae* metabolism.

Abbreviations used: ADH, alcohol dehydrogenase; AspADH, *Acinetobacter* sp. strain M-1 ADH; Ateli3-2, *Arabidopsis thaliana* ELI3; bcADH, branched-chain ADH; CAD, cinnamyl ADH; DTT, dithiothreitol; EgCAD2, *Eucalyptus gunni* CAD2; IEF, isoelectric focusing; MDR, medium-chain dehydrogenase/reductase; MM, minimal medium; MbADH, *Myobacterium bovis* BCG ADH; ORF, open reading frame; Pceli, *Petroselinum crispum* ELI3; ScADH1 *Saccharomyces cerevisiae* ADH1; ZmCAD2, *Zea mays* CAD2.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (e-mail josep.biosca@uab.es).

## EXPERIMENTAL

### Materials

Restriction enzymes, T4-DNA ligase and alkaline phosphatase were from Roche Biochemicals (Mannheim, Germany) and Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). DNA Vent polymerase and *Hind*III linkers were from New England Biolabs (Beverly, MA, U.S.A.). The DNA oligonucleotides were synthesized and purified by Amersham Biosciences. Bacterial and yeast media were from Difco (Detroit, MI, U.S.A.) and US Biological (Swampscott, MA, U.S.A.). DEAE-Sepharose fast flow was from Sigma (St Louis, MO, U.S.A.); hydroxyapatite Biogel HT was from Bio-Rad (Hercules, CA, U.S.A.); Red Sepharose DL-6B and Superdex 200-HR were from Amersham Biosciences. NADP<sup>+</sup> (disodium salt) and NADPH (tetrasodium salt) were from Sigma. Alcohol and aldehydes substrates were obtained from Sigma, Aldrich (Saint Louis, MO, U.S.A.) or Fluka (Buchs, Switzerland), and were of the highest available quality.

### Yeast and bacterial strains, and plasmids

For cloning procedures the *E. coli* XL1-Blue strain from Stratagene (La Jolla, CA, U.S.A.) was used. The *S. cerevisiae* yeast strain FY834 $\alpha$  [20] was used to amplify the *YMR318C* gene (now designated *ADH6*; see the Results section) by PCR. The galactose-inducible *E. coli*-yeast shuttle vector pYes2 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), carrying the *URA3* selection marker and the promoter and upstream activating sequences of *GAL1*, was used to clone and overexpress the *YMR318C* gene in the protease-deficient yeast strain BJ2168 [21]. The pAAH5 vector, generously provided by Dr Benjamí Piña (Department de Biologia Molecular i Cel·lular, Centre de Investigació i Desenvolupament, Barcelona, Spain), was used to overexpress the *YMR318C* gene product in medium containing glucose as the sole carbon source. This vector contains the *LEU2* selection marker and the *ADH1* promoter and terminator regions. The pCRscript vector (Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.) was used to make the construct to disrupt the *YMR318C* gene in yeast. *E. coli* was grown at 37 °C in Luria-Bertani broth supplemented with 50  $\mu$ g/ml ampicillin to select for the desired plasmid constructs. Yeast cells were grown at 30 °C in minimal medium (MM) in the absence of leucine or uracil, further supplemented with 2% (w/v) glucose or galactose to allow for the selection and induction of the yeast transformed with the pAAH5 or pYes2 constructs respectively. Other media used for yeast growth were YPD [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone and 2% (w/v) glucose] and YPD with various concentrations of veratraldehyde.

### Informatic programs

Amino acid sequence similarities were identified using the non-redundant version of the Swiss-Prot database, the translated version of the EMBL nucleotide sequence database ('TREMBL') and the FASTA search program [22]. The protein alignment was obtained using the GCG package [23].

### Cloning methods

All DNA manipulations were performed under standard conditions as described previously [24,25].

#### Amplification of *YMR318C*

The *YMR318C* gene was amplified in a PCR reaction using genomic DNA from the strain FY834 $\alpha$  as the template and the oligonucleotides, 5'-GGCGGATCCATCATGTCTTATCCTG-AGAAATTTGAAGG-3' and 5'-GGGCTCGAGCTAGTAAA-

ATTCTTTGTCG-3', as primers. These primers were designed to introduce a *Bam*HI site at the 5' end and a *Xho*I site in the 3' end. The PCR reaction was started by heating the reaction mixture (1  $\mu$ M each primer, 200  $\mu$ M dNTPs and 3 mM MgSO<sub>4</sub>) for 5 min at 95 °C prior to the addition of 10 units/ml of Vent DNA polymerase. This was followed by 30 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 59 °C and 1 min of extension at 72 °C.

#### Construction of the pYes2-*YMR318C* and pAAH5-*YMR318C* vectors

The amplified PCR fragment, containing *YMR318C* flanked by *Bam*HI/*Xho*I sites, was purified from an agarose gel and digested with *Bam*HI and *Xho*I. This insert was subcloned into the pYes2 vector that had been digested with *Bam*HI and *Xho*I. The resulting construct was named pYes2-*YMR318C*. The construct was sequenced in both directions (Oswell DNA Services, Southampton, U.K.) to verify that there had been no mutations introduced by the PCR reaction.

To subclone *YMR318C* into the unique site of pAAH5, pYes2-*YMR318C* was digested with *Xho*I and, after making blunt-ends and ligating *Hind*III linkers, the vector was digested with *Hind*III and the resulting insert subcloned into *Hind*III-digested pAAH5. The construct was named pAAH5-*YMR318C*.

### Construction of yeast strains overexpressing the *YMR318C* gene product

The yeast strain BJ2168 was grown in YPD media and transformed with the corresponding plasmids using the lithium acetate method [26]. Transformants were selected in MM supplemented with auxotrophic requirements [25] in the absence of uracil or leucine for pYes2 or pAAH5 plasmids respectively.

### Purification of the *YMR318C* gene product

All purification steps were carried out at 4 °C. BJ2168 [pYes2-*YMR318C*] cells were inoculated into 5 litres of MM supplemented with 2% (w/v) galactose and auxotrophic requirements [25] with the exception uracil. Following incubation for 2 days, 23 g of cells were obtained and resuspended in 1 vol. of buffer A [20 mM Tris/HCl (pH 7) and 2 mM dithiothreitol (DTT)]. The crude extract was prepared with glass beads of 0.5 mm diameter on a bead-beater (Biospec Products, Bartlesville, OK, U.S.A.), with 4  $\times$  1 min periods of disruption alternating with 3  $\times$  1 min cooling periods. Glass beads were washed with 1 vol. of buffer A and the homogenate was centrifuged at 29000 *g* for 1 h at 4 °C. The supernatant was collected and dialysed against buffer A overnight at 4 °C. The dialysed extract was applied at 45 ml/h on to a DEAE-Sepharose column (2.4 cm  $\times$  21.5 cm) equilibrated with buffer A. The column was washed with 10 vol. of buffer A and the enzyme was eluted with a linear 0–0.3 M NaCl gradient in buffer A (600 ml). Fractions (5 ml) were collected and those with enzymic activity were pooled and concentrated to 12.5 ml using an Amicon concentrator (Danvers, MA, U.S.A.). The samples were directly loaded at 20 ml/h on to a hydroxyapatite column (1.5 cm  $\times$  13 cm) equilibrated with buffer B [10 mM potassium phosphate buffer (pH 7) and 0.5 mM DTT]. The column was washed with 200 ml of buffer B and the enzyme was eluted with a linear 10–400 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gradient in buffer B. The activity peak was collected and concentrated to 8 ml. The enzyme was loaded on to a PD-1 column (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrated with a solution of 20 mM Hepes (pH 7.0) and 0.5 mM DTT (buffer C). The eluted protein was loaded at 35 ml/h on to a Red Sepharose column equilibrated with buffer C. The column was washed with 250 ml of buffer C and the enzyme was eluted with a linear 0–2.5 mM NADP<sup>+</sup> gradient in

buffer C. Fractions (5 ml) were collected and the purified Ymr318p fractions were pooled and concentrated. Finally, the cofactor was removed by applying the purified protein on to a Superdex 200-HR gel-filtration column (1 cm × 30 cm) connected to a Waters HPLC System, and the chromatography was performed in buffer D [50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 0.15 M NaCl, 0.5 mM DTT and 20% (v/v) glycerol] at 0.4 ml/min. The pure protein was stored at -20 °C in buffer D. Protein concentration was determined by the Bradford method [27] using Bio-Rad protein assay reagents and BSA as the standard. The molecular mass of the purified enzyme was determined using the Superdex 200-HR gel-filtration column equilibrated with buffer D. Purified enzyme (45 µg) was loaded on to the column and the molecular-mass determined following calibration with gel-filtration molecular-mass markers (Sigma).

### Enzyme activity

Enzyme activities were determined spectrophotometrically at 25 °C using a Cary 400 spectrophotometer (Varian, Sunnyvale, CA, U.S.A.). The activities towards different aldehydes were assayed in 0.6 ml reaction mixtures containing 33 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 0.5 mM NADPH and 1 mM aldehyde (in 0.2 cm pathlength cuvettes). The decrease in  $A_{340}$  was followed to assess the enzymic activity towards most of the aldehydes, but at  $A_{365}$  when cinnamaldehyde or veratraldehyde were the substrates, and at  $A_{400}$  for coniferaldehyde and sinapaldehyde. The molar absorption coefficients ( $\epsilon$ ) used at pH 7.0 were:  $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  and  $\epsilon_{365} = 3.51 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  for NADPH,  $\epsilon_{365} = 7.71 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  for vanillin plus NADPH,  $\epsilon_{400} = 2.64 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  for coniferaldehyde and  $\epsilon_{400} = 2.00 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  for sinapaldehyde. The activities with the alcohols were tested in 1 ml reaction mixtures containing either 0.1 M glycine (pH 10) or 33 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) with 1.2 mM NADP and 10 mM alcohol (in 1 cm pathlength cuvettes). Activities were measured at  $A_{340}$  (following the reduction of NADP) for most of the alcohols, but at  $A_{365}$  for the oxidation of cinnamyl alcohol and  $A_{400}$  for the oxidation of coniferyl alcohol ( $\epsilon_{400} = 27.5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  at pH 10.0).

The influence of pH on the enzymic activities was carried out using either 33 mM sodium phosphate buffer (pH 6–7.5), 33 mM sodium pyrophosphate (pH 8–9) or 0.1 M glycine (pH 10–11). The substrates used were 1 mM cinnamaldehyde and 0.5 mM NADPH for the aldehyde reduction reaction, and 10 mM cinnamyl alcohol and 1.2 mM NADP<sup>+</sup> for the alcohol oxidation reaction. One unit of activity corresponded to 1 µmol of NADPH formed per min.

The steady-state parameters were determined by fitting the initial rates to the Michaelis–Menten equation using the non-linear regression program Grafit 3.0 (Erithacus Software Ltd., Horley, Surrey, U.K.). The kinetic constants are expressed as the mean ± S.E.M. of at least three separate experiments.

### Disruption of the YMR318C gene

The inactivation of the YMR318C gene was carried out by one-step gene disruption [28] with the TRP1 gene as a marker. The YMR318C gene was subcloned into the pCRscript vector (pCR-YMR318C) and the resulting construct was digested with two internal NdeI and NcoI restriction sites, releasing a 262 bp fragment. TRP1 was obtained by digesting the YDpW plasmid [29] with BamHI and, after making blunt-ends, it was inserted into the NdeI/NcoI sites of the digested pCR-YMR318C construct. The resulting plasmid was used as template to amplify by PCR the truncated ymr318c gene carrying the TRP1 marker. The amplified linear fragment, containing TRP1 flanked by homo-

logous sequences to YMR318C, was used to transform the yeast strain BJ2168. The transformants were identified by growth on selective medium lacking tryptophan [25]. PCR analysis was carried out to confirm whether the replacement had occurred at the YMR318 locus. The resulting ymr318c::TRP1 strain was named BJ18.

### Expression of Ymr318p in alternative carbon sources

Yeast strains BJ2168 and BJ18 (ymr318cΔ; designated adh6Δ in the Results section) were grown in 2% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone and either 2% (w/v) galactose, 2% (w/v) raffinose, 3% (v/v) glycerol or 3% (v/v) ethanol, and harvested in the exponential phase. After preparing the respective crude extracts, the enzymic activities towards the reduction of cinnamaldehyde in the presence of NADPH was measured and compared with the activities of the crude extracts of the same yeast strains grown in glucose. To ascertain whether the measured activities were due to the Ymr318p, equal amounts of protein from the crude extracts were analysed by native PAGE along with purified Ymr318p. The protein bands associated with NADPH-dependent reductase activity present in the gel were visualized using the method of Seymour and Lazarus [30]. The position of Ymr318p in the native gel was displayed by incubating the gel with 1 mM NADPH in 20 mM BisTris buffer (pH 7) and placing the gel in contact with a filter paper soaked in 10 mM pentanal. Gels were exposed to UV light and analysed for the disappearance of fluorescence, indicating the conversion of NADPH to NADP.

### Elimination of veratraldehyde from yeast cultures

Cultures of BJ2168[pAAH5] (wild-type), BJ18[pAAH5] (null mutant) and BJ18[pAAH5-YMR318C] (overexpressing YMR318C in glucose medium) were grown in MM with glucose as the carbon and energy source and in the absence of leucine to select for the plasmids. When the  $D_{595}$  was 0.1, various concentrations of veratraldehyde (3, 5, 10 and 20 mM) were added. The growth curves were monitored by measuring the  $D_{595}$  and the degradation of veratraldehyde by following the disappearance of veratraldehyde at its maximum absorption wavelength ( $A_{310}$ ), as described previously [31].

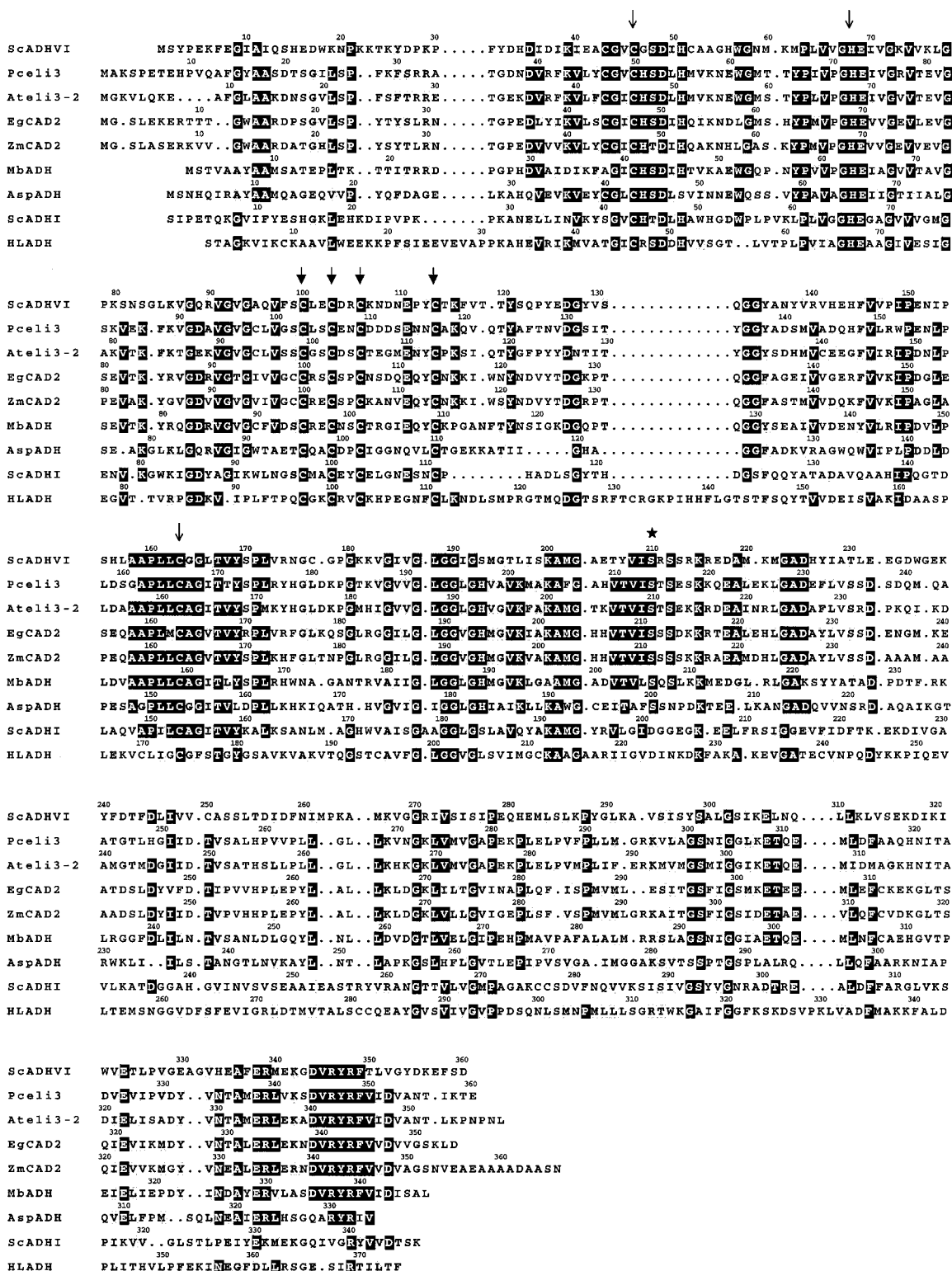
### Electrophoretic analysis

SDS/PAGE was performed as described previously [32] using 12% (w/v) acrylamide gels and the proteins were stained with silver nitrate. To ascertain the positions of the activity bands, proteins were separated by native PAGE on 7% (w/v) acrylamide gels or by isoelectric focusing (IEF) [33] and the gels incubated in a solution containing 100 mM pentanol, 1.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.1 mg/ml 5-methylphenazine methosulphate and 0.2 mg/ml Nitro Blue Tetrazolium (pH 8.6).

## RESULTS

### The YMR318C gene product is a member of the zinc-containing medium-chain ADH family

We have previously reported [8] that YMR318C from *S. cerevisiae* contains the GHEX<sub>2</sub>GX<sub>5</sub>(G,A)X<sub>2</sub>(I,V,A,C,S) sequence motif present in the zinc-containing medium-chain ADHs. A search performed with Ymr318p using the non-redundant Swiss-Prot database revealed over 50% similarity to two recently characterized bacterial ADHs from *Myobacterium bovis* BCG (MbADH) [34] and *Acinetobacter* sp. strain M-1 (AspADH) [35]



and with several plant cinnamyl ADHs (CADs); *Petroselinum crispum* ELI3 (Pceli) [36], *Arabidopsis thaliana* ELI3 (Ateli3-2) [37], *Eucalyptus gunni* CAD2 (EgCAD2) [38] and *Zea mays* CAD2 (ZmCAD2) [39]. A multiple sequence alignment between these proteins is shown in Figure 1, which also includes the *S. cerevisiae* ADHI (ScADHI) sequence. The horse liver ADH-EE enzyme (HLADH) was used as a standard for numbering. The *YMR318C* gene product had a characteristic feature of NADPH-dependent ADHs, namely a serine residue at position 223 instead of the aspartate or glutamate residues found in the coenzyme-binding site of the NADH-dependent ADHs (for example, ScADHI and ADH-EE). Ser<sup>223</sup> is characteristic of some previously described NADP<sup>+</sup>-dependent ADHs, such as Pceli3, Ateli3-2, EgCAD2 and ZmCAD2 (Figure 1) [36–39].

### Overexpression of the *YMR318C* gene product

The pYes2-*YMR318C* plasmid, where the expression of *YMR318C* was under the control of galactose, was employed to overexpress *YMR318C* in the protease-deficient yeast strain BJ2168. In order to confirm the expression and to follow the purification of the enzyme, a specific substrate was needed. Given the 37% sequence identity existing between Ymr318p and different CADs, BJ2168 homogenates were assayed with some of the known substrates for CAD in the presence of NADPH. BJ2168 transformed with the pYes2 plasmid (BJ2168[pYes2]) served as a control. The crude extract from BJ2168[pYes2-*YMR318C*] had a 50-fold higher specific activity towards cinnamaldehyde than the BJ2168[pYes2] crude extract (3.9 units/mg versus 0.06 unit/mg). The crude extract from the *YMR318C*-overexpressing strain also had a 5–10 fold increase in specific activity towards various alcohols and aldehydes (see below) when compared with the non-overexpressing strain.

Overexpression of *YMR318C* was also confirmed by IEF followed by activity staining with 100 mM pentanol and NADP<sup>+</sup>. With equal amounts of protein extracts loaded on to the gel, the overexpressing strain displayed an increased NADP-dependent pentanol dehydrogenase activity when compared with the non-overexpressing strain (results not shown). This increase in activity was associated with a protein band with a mobility identical to that of the purified protein in the IEF gel. Taking into account the substrate and cofactor specificity of the enzyme (see below), and its structural relationship with previously identified yeast ADHs, we designated the *YMR318C* gene as *ADH6* and its protein product as ADHVI.

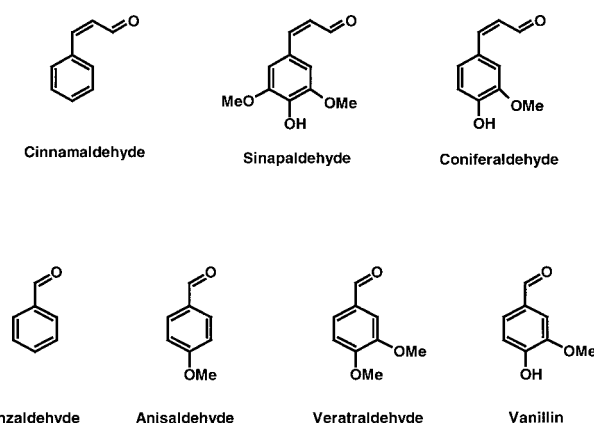
### Purification and properties of ADHVI

The cinnamaldehyde reduction reaction with NADPH as a cofactor was the chosen to follow the purification of ADHVI. The protein was purified to homogeneity by the following protocol; the supernatant of the crude extract was fractionated by separation on a DEAE-Sepharose column followed by hydroxyapatite and Red-Sepharose columns. NADP was used to elute ADHVI from the dye-affinity chromatography and was then itself removed by HPLC gel-filtration chromatography. This purification step led to an increase in the specific activity towards cinnamaldehyde, presumably due to the elimination of NADP that inhibited the NADPH-dependent reduction of cinnamaldehyde. Starting with 23 g of BJ2168[pYes2-*YMR318C*] cells overexpressing *ADH6*, 1 mg of pure ADHVI was obtained (representing a 26% yield), with a specific activity of the pure enzyme towards cinnamaldehyde of 183 units/mg (Table 1). The enzyme was stored at –20 °C in 20% (v/v) glycerol and no loss of activity was detected over 1 month.

**Table 1** Purification of *S. cerevisiae* ADHVI

ADHVI was purified from 23 g of yeast cells overexpressing *ADH6* and the activity after each purification step was measured in 33 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 1 mM cinnamaldehyde and 0.5 mM NADPH. One unit of enzyme activity corresponds to 1 μmol of NADP formed per min.

	Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg of protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	183.0	717	3.9	1	100
DEAE Sepharose	34.5	702	20.3	5.2	98
Hydroxyapatite	7.1	231	32.4	8.3	32
Red Sepharose	1.2	123	106	27.1	17
Superdex 200-HR	1.0	183	183	47.0	26



**Figure 2** Chemical structures of several aldehyde substrates of *S. cerevisiae* ADHVI

Upper row: the structures of cinnamaldehyde and related compounds. Sinapaldehyde and coniferaldehyde, together with *p*-coumarylaldehyde (not shown), are the precursors of the corresponding cinnamyl alcohols that are the immediate precursors of lignin. Lower row: the structures of benzaldehyde and several derivatives. Anisaldehyde, veratraldehyde and vanillin are produced in the lignin biodegradation pathway.

Analysis by SDS/PAGE and subsequent silver nitrate staining showed a single band of approx. 40 kDa, which was close to the predicted molecular mass from the amino acid sequence (39613 Da). The native molecular mass was 71.3 kDa, as determined by gel-filtration chromatography. This result was also confirmed by native PAGE using gradient gels with 8–25% (w/v) acrylamide. Thus the enzyme appeared to be a homodimer.

IEF experiments, followed by activity staining, revealed a major protein band of pI 5.4 and a minor band of pI 5.0 for the purified enzyme (results not shown).

### ADHVI substrate specificity and kinetic parameters

The substrate specificity of the pure protein was tested with a broad range of aldehydes and alcohols (Figure 2 and Table 2). For the reduction reaction, the enzyme was active towards all of the aromatic and aliphatic (linear and branched-chain) aldehydes tested. Although the enzyme was very active towards aromatic aldehydes, such as cinnamaldehyde, benzaldehyde and substituted benzaldehydes, such as veratraldehyde and *p*-anisaldehyde, remarkably, it exhibited low activity towards substituted cinnamaldehydes, such as coniferaldehyde and sina-

**Table 2** Substrate specificity of *S. cerevisiae* ADHVI

Reduction activities were measured in 33 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 1 mM substrate and 0.5 mM NADPH. The activity towards cinnamaldehyde was taken as 100% with the specific activity being 183 units/mg of protein. Oxidation activities were measured in 0.1 M glycine at pH 10.0 containing 10 mM substrate (except for octanol where 1 mM was used) and 1.2 mM NADP<sup>+</sup>. ND; not detected.

Reduction	Relative Activity	Oxidation	Relative Activity
Cinnamaldehyde	100	Cinnamyl alcohol	100
Sinapaldehyde	3	Coniferyl alcohol	27
Coniferaldehyde	10	Benzyl alcohol	45
Benzaldehyde	72	Ethanol	4
Veratraldehyde	82	Propanol	7
Anisaldehyde	72	Butanol	24
Vanillin	57	Pentanol	89
Propanal	21	Hexanol	154
Butanal	57	Octanol	52
Pentanal	109	2-Methylpropanol	1
Hexanal	89	2-(S)-Methylbutanol	7
Heptanal	88	3-Methylbutanol	15
Octanal	84	2-Butanol	2
2-Methylpropanal	67	2-Propanol	ND
2-Methylbutanal	92	1,2-Propanediol	ND
3-Methylbutanal	84	1,2-Butanediol	ND
<i>trans</i> -2-Nonenal	39	1,3-Butanediol	2
4-Hydroxynonenal	30	1,4-Butanediol	4
Furfural	27	2,3-Butanediol	ND
Methylglyoxal	ND	Eugenol	ND
Acetone	ND		
Cyclohexanone	ND		

paldehyde. The enzyme had no activity with ketones, such as acetone or cyclohexanone. The specificity towards alcohols followed a similar pattern as for the aldehydes. Linear and branched-chain primary alcohols were substrates, whereas very low activity was found with secondary alcohols, such as butan-2-ol. The enzyme was inactive towards vicinal diols, such as 1,2-propanediol and 1,2-butanediol. For the aliphatic substrates, the activity increased with the length of the carbon chain until it reached five to six carbons. A further increase of the chain length produced a lower activity.

The maximum reduction activity with cinnamaldehyde was at pH 7.0, whereas the activity for the oxidation of cinnamyl alcohol increased steadily from pH 6–11 (results not shown). Kinetic parameters are given in Table 3. The highest catalytic efficiencies were observed for pentanal and veratraldehyde, although they were 2–3-fold lower for cinnamaldehyde, hexanal and 3-methylbutanal. When both reactions were monitored at pH 7.0, the oxidation of cinnamyl alcohol showed a catalytic efficiency 50-fold lower than for the reduction of the corresponding aldehyde. These values indicate that the major function of ADHVI is as an aldehyde reductase, rather than an alcohol dehydrogenase. The enzyme specifically required NADPH, which could not be substituted by NADH. Thus the activity displayed with NADH was < 5% of the activity with NADPH in both the reduction (with 0.5 mM cofactor) and oxidation (with 5 mM cofactor) reactions.

#### Construction of a null mutant *adh6Δ* strain

The disruption of *ADH6* with the *TRP1* marker [28] led to a null mutant *adh6Δ* strain. The isolation of genomic DNA from the *adh6Δ* strain, followed by PCR analysis, confirmed that the disruption had occurred at the *ADH6* locus. Specific amplification

**Table 3** Kinetic parameters of *S. cerevisiae* ADHVI

Enzymic activities were measured in 33 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.5 mM NADPH or 1.2 mM NADP<sup>+</sup> (for the reduction and oxidation reactions respectively). NADP and NADPH kinetics were performed with 10 mM cinnamyl alcohol and 1 mM cinnamaldehyde respectively. No saturation could be reached up to 0.5 M ethanol, 0.4 M pentanol or 0.19 M 3-methylbutanol at pH 10.

Substrate	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
Cinnamaldehyde	0.172 ± 0.012	18 400 ± 600	107 200 ± 8600
Veratraldehyde	0.073 ± 0.003	15 800 ± 140	217 800 ± 9470
Hexanal	0.152 ± 0.017	21 270 ± 920	139 950 ± 16 780
Pentanal	0.060 ± 0.009	22 700 ± 190	380 300 ± 57 830
3-Methylbutanal	0.129 ± 0.035	14 000 ± 670	109 000 ± 30 440
NADPH	0.029 ± 0.003		
Cinnamyl alcohol	0.436 ± 0.029	884 ± 90	2028 ± 247
Hexanol	9.1 ± 2.4	640 ± 92	71 ± 24
*Cinnamyl alcohol	0.700 ± 0.120	4200 ± 60	6000 ± 1000
*NADP <sup>+</sup>	0.061 ± 0.002		

\* Activities measured in 0.1M glycine (pH 10.0).

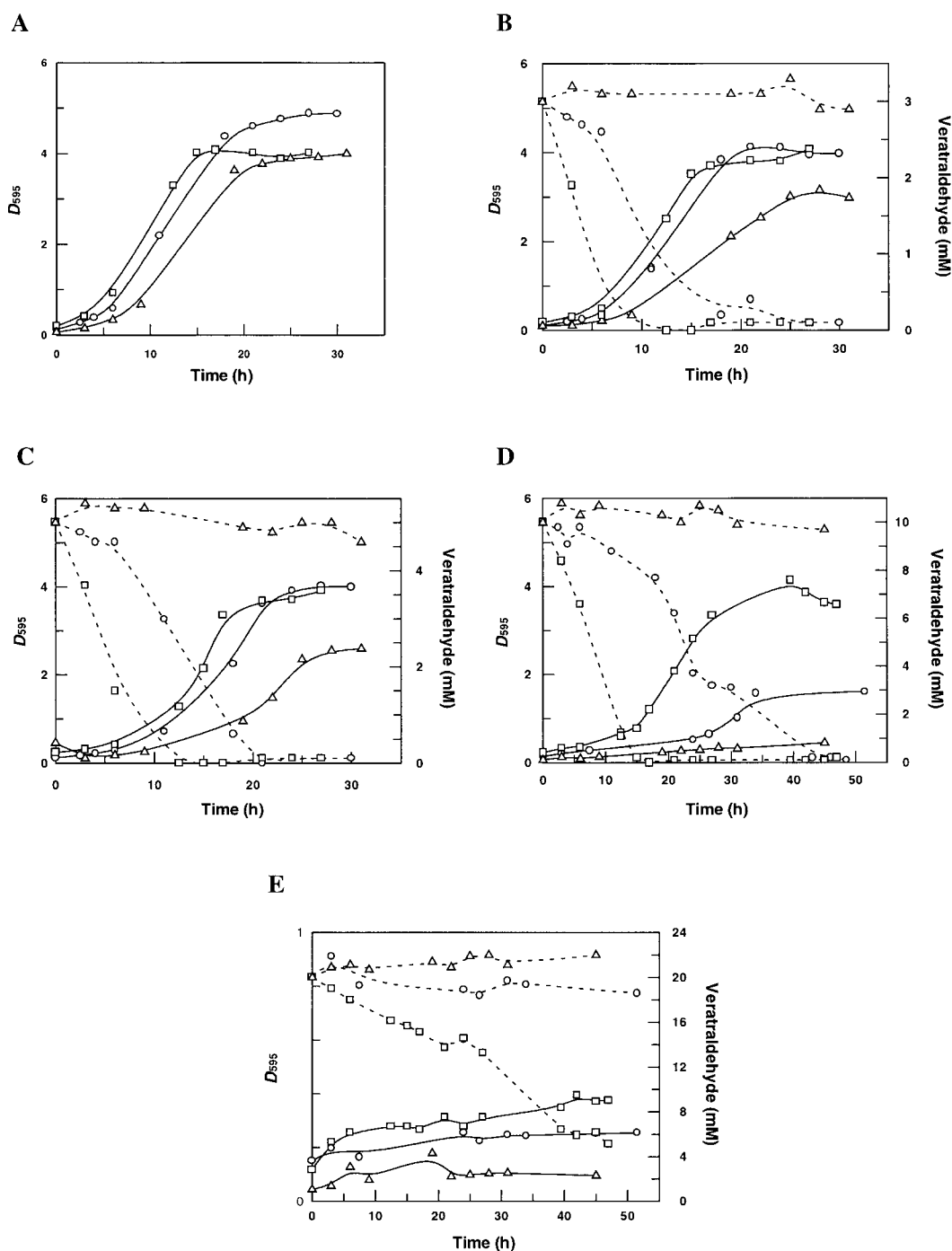
at the *ADH6* locus resulted in a gain of approx. 500 bp for the mutants due to the insertion of *TRP1*, which was bigger than the fragment removed. The disruption of *ADH6* was not lethal for *S. cerevisiae* when grown in YPD medium. Native PAGE showed that the null mutant *adh6Δ* strain did not display the activity band corresponding to ADHVI, whereas the wild-type strain did (results not shown).

#### Activity of ADHVI on alternative carbon sources

The specific activity of ADHVI from the yeast cells grown in raffinose was similar to that in yeast cells grown in glucose. The cells grown in galactose displayed a 3-fold increase in NADPH-dependent cinnamaldehyde reductase specific activity, which was due to the induction of ADHVI. When the cells were grown in glycerol, their NADPH-dependent cinnamaldehyde reductase specific activity increased approx. 4-fold with respect to the cells grown in glucose, although ADHVI expression was similar. The increase in activity was due to the induction of other enzymes with cinnamaldehyde reductase activity as visualized by PAGE analysis (results not shown). With ethanol as the carbon source, there was an approx. 15% decrease in the level of ADHVI activity, whereas at least one other enzyme with NADPH-dependent cinnamaldehyde reductase activity was induced (results not shown).

#### Yeast growth in medium containing veratraldehyde

The cell growth of the yeast strains BJ2168[pAAH5] (wild-type *ADH6*), BJ18[pAAH5] (isogenic to BJ2168, but containing *adh6Δ*) and BJ18[pAAH5-*YMR318C*] (overexpressing *ADH6* when grown in glucose) was followed in synthetic complete medium containing glucose [25] and various concentrations of veratraldehyde, a relevant compound in the ligninolysis pathway. Under these conditions, a specific activity of 7.9 units/mg of protein was obtained for the extract from BJ18[pAAH5-*YMR318C*], as opposed to 0.06 unit/mg obtained when *ADH6* was under the control of its own promoter in the wild-type yeast strain (BJ2168[pAAH5]). The specific activities of ADHVI from the wild-type cells (grown until mid-exponential phase) in the absence and presence of 5 mM veratraldehyde were similar (Figure 3). This result indicated that there was no induction of



**Figure 3** Veratraldehyde elimination and growth curves of different yeast strains at various concentrations of veratraldehyde

Cultures of BJ2168[pAAH5] (wild-type for *ADH6*; ○), BJ18[pAAH5] (the null mutant *adh6Δ*; △) and BJ18[pAAH5-*YMR318C*] (strain overexpressing *ADH6*; □) were grown in synthetic complete medium with 2% (w/v) glucose in the absence (A) or presence of 3 (B), 5 (C) or 10 (D) or 20 mM (E) veratraldehyde. Growth curves (solid lines) and veratraldehyde concentrations (dashed lines) are shown for each culture.

ADHVI by veratraldehyde. The disappearance of veratraldehyde from the media was monitored spectrophotometrically. As shown in Figure 3, the *adh6Δ* strain (BJ18[pAAH5]) was unable to eliminate veratraldehyde at any concentration used over a 30 h time period. In contrast, the wild-type (BJ2168[pAAH5]) and *ADH6*-overexpressing strains (BJ18[pAAH5-*YMR318C*]) eliminated the aldehyde when it was present at 3, 5 and 10 mM in the

culture medium (Figures 3B–D). At 20 mM veratraldehyde, however, only the strain overexpressing *ADH6* eliminated the aldehyde significantly (Figure 3E).

Veratraldehyde decreased the growth rate of the *adh6Δ* strain at all the concentrations used, suggesting a toxic effect of this aldehyde (Figure 3). At 3 mM and 5 mM veratraldehyde, the growth rates and the level of growth were reduced in the *adh6Δ*

strain but not in the wild-type and *ADH6*-overexpressing strains. The growth of these two strains with 3 mM and 5 mM veratraldehyde did not significantly differ from the controls without the aldehyde. At 10 mM veratraldehyde (Figure 3D), the reduction in growth rate and in the level of growth was also observed for the wild-type strain, but not for the *ADH6*-overexpressing strain. At 20 mM veratraldehyde, the inhibitory effect on yeast growth was observed for all strains. When a stationary culture of *adh6Δ* yeast cells, grown in 10 mM veratraldehyde, was observed by phase-contrast microscopy, a large number of enlarged and aggregated cells were observed. This was in contrast with the normal shape of most of the *adh6Δ* cells during the stationary phase without the aldehyde (results not shown).

It is apparent that there is a direct relationship between the growth rate and the veratraldehyde-elimination capacity of the yeast strains provided by ADHVI expression at the high concentration of aldehyde (Figure 3). These results also indicate that ADHVI is the only enzyme capable of significantly eliminating veratraldehyde in *S. cerevisiae* *in vivo*.

## DISCUSSION

In a previous study [8], we had predicted, based on protein sequence comparisons, that the *YMR318C* gene product from *S. cerevisiae* would exhibit characteristics of the zinc-containing MDR family, and suggested it as a putative NADPH-dependent CAD. Recently, a phylogenetic tree constructed from all MDRs identified in *C. elegans*, *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* and *E. coli*, placed the *YMR318C* gene product as an MDR related to CADs [5]. The multiple sequence alignment in Figure 1 shows that Ymr318p (now named ADHVI), exhibits characteristics of the zinc-containing MDR enzymes, such as conservation of Gly<sup>66</sup>, Gly<sup>71</sup>, Gly<sup>77</sup> and Gly<sup>86</sup> (after the horse liver ADH-EE numbering) in the substrate-binding domain, and Gly<sup>199</sup>, Gly<sup>201</sup>, Gly<sup>204</sup> and Gly<sup>236</sup> in the coenzyme-binding domain. It also has the three residues normally involved in the binding of the catalytic zinc and the four cysteine residues involved in the binding of the so-called 'structural zinc' (Figure 1). Although the presence of an aspartate or glutamate residue at position 223 is characteristic of NADH-dependent ADH [40–42], a serine residue at this position, as in ADHVI, has been assigned to NADPH-dependent ADHs [38]; a finding that has been confirmed from its kinetic properties in the present study.

To further classify ADHVI in the MDR family, we have aligned the sequence of the enzyme with the three most closely related types of proteins in the databases. All are MDRs and structurally related to CADs, including (1) Pceli3 [36] and Ateli3-2 [37], as representatives of the CADs implicated in defence mechanisms (both enzymes are expressed in response to elicitors in plant defence reactions); (2) EgCAD2 and ZmCAD2, as representatives of the CADs directly involved in the biosynthesis of lignin [43,44]; and (3) MbADH and AspADH, two bacterial ADHs structurally similar to CADs. While MbADH may have a role in the biosynthesis of the cell envelope lipids [34], AspADH appears to play a role in the metabolism of alkanes [35].

The homologous overexpression of the *ADH6* gene product, ADHVI, has allowed its purification to apparent homogeneity. It appears to have a dimeric structure with the molecular mass of each subunit being 40 kDa. The purified ADHVI shows a strict specificity for NADPH and accepts a wide range of compounds as substrates, including linear and branched-chain primary alcohols and aldehydes, substituted cinnamyl alcohols and aldehydes as well as substituted benzaldehydes and their corresponding alcohols. The highest catalytic efficiencies,  $k_{\text{cat}}/K_m$ ,

were found for pentanal and veratraldehyde, whereas  $k_{\text{cat}}/K_m$  values for the oxidative reactions were 1–2 orders of magnitude lower. The specificity of the substrate and cofactor strongly supports the physiological involvement of ADHVI in aldehyde reduction rather than in alcohol oxidation.

The activity of ADHVI was monitored in the crude extracts of yeast cells grown in different carbon sources. The levels of ADHVI activity were similar for the cells grown in glucose, raffinose or glycerol, whereas they increased approx. 3-fold in cells grown in galactose. In contrast, a slight decrease in ADHVI activity was observed in the yeast cells grown in ethanol. These results are consistent with the levels of *YMR318C* gene transcripts found in cells grown in galactose, raffinose and ethanol (compared with glucose), as reported in a genomic expression study with DNA microarrays [45]. In a recent genome-wide transcriptional analysis performed with chemostat cultures of *S. cerevisiae*, it was observed that the level of the *YMR318C* gene transcript increased by approx. 15% under anaerobic conditions [46].

Two ADHs with similarities to ADHVI have been isolated previously from *S. cerevisiae* [47,48]. The branched-chain ADH (bcADH) purified by Iersel et al. [48] has a pI of 5.9, a value that is close to the pI of the major band of ADHVI. Moreover, the bcADH was active in the reduction of linear, branched-chain and aromatic aldehydes; activities also shown by ADHVI. However, their coenzyme specificities and molecular masses are different. Thus their bcADH is a monomeric protein with a molecular mass of 37 kDa, whereas ADHVI is homodimeric with a molecular mass of 71.3 kDa. In addition, ADHVI showed strict specificity towards NADPH for the reduction reactions, whereas bcADH also utilizes NADH as a coenzyme. The ADH from *S. cerevisiae* isolated by Wales and Fewson [47] was NADP-dependent and showed activity towards some of the substrates of ADHVI. However, the fact that there is little overlap between the substrates studied by Wales and Fewson [47] and us (this report), and that the kinetic constants found for the common substrates were obtained with different experimental conditions, makes comparison difficult. Nevertheless, there seems to be a difference in the molecular masses, since the ADH isolated by Wales and Fewson [47] had an apparent monomeric structure with a molecular mass of 46.2 kDa.

The potential role of ADHVI in *S. cerevisiae* is not easy to ascertain when simply considering its structural similarity to CADs. Two different functions have been attributed to plant CADs; one group of CADs may be involved in the biosynthesis of the monomeric precursors of lignin from their cinnamyl aldehydes (*p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl), whereas the other group may be implicated in plant-defence reactions. The activity profile of yeast ADHVI more closely resembles the activities shown by the defence-type CADs, namely a broad range substrate specificity, poor activity towards coniferaldehyde and sinapaldehyde and a 50–100-fold lower catalytic efficiency towards alcohols than for the corresponding aldehydes (Tables 2 and 3). However, both plant CAD types have been shown to be induced by wounding and by fungal infection [43], stimuli that also lead to lignification, whereas lignin has not been identified in yeast. Therefore it is unlikely that the role of yeast ADHVI is similar to that of plant CADs.

An alternative role for ADHVI might arise from its ability to convert veratraldehyde and anisaldehyde into their corresponding alcohols. In white rot fungi, such as *Phanerochaete chrysosporium*, the reduction of both aldehydes by aryl ADHs has been implicated in ligninolysis [49]. *S. cerevisiae* has seven ORFs with protein products showing high amino acid sequence similarity to aryl ADHs from *P. chrysosporium* [31]. However, a septuple-mutant strain constructed by the disruption of the seven ORFs



did not show a significant decrease in veratraldehyde degradation when compared with the wild-type [31]. The results shown in Figure 3 support the involvement of ADHVI in the *in vivo* dissimilation of veratraldehyde. Thus, whereas the null mutant *adh6Δ* strain did not modify the veratraldehyde concentration in the medium, the wild-type strain significantly decreased it, and the strain that overexpressed *ADH6* rapidly eliminated this aldehyde. Therefore ADHVI may give the yeast the opportunity to live in ligninolytic environments where products derived from lignin biodegradation may be available. The fact that other enzymic activities, such as the decarboxylase that converts ferulic acid and *p*-coumaric acid (two major lignin derivatives) into 4-hydroxy-3-methoxystyrene and vinylphenol respectively, have been found also in *S. cerevisiae* [31,50] would further allow this organism to use products derived from the biodegradation of lignin. In support of this hypothesis, a recent report [51] indicated a partial utilization of lignin as a carbon source by several yeast species, including *S. cerevisiae*.

Another potential function of ADHVI may be in the biosynthesis of fusel alcohols. Fusel alcohols are major flavour components in alcoholic beverages [52], and are derived either from the carbon backbones of several amino acids (valine, leucine, isoleucine and phenylalanine residues) or from  $\alpha$ -ketoacids. They are produced by *S. cerevisiae* and other yeasts and include propan-1-ol, 2-methylpropan-1-ol, (S)-2-methylbutan-1-ol, 3-methylbutan-1-ol and 2-phenylethanol. Although there is no agreement in the literature on the yeast metabolic pathway that yields fusel alcohols [53,54], it appears clear that the last steps involve the reduction of propanal, 2-methylpropanal, (S)-2-methylbutanal and 3-methylbutanal to the corresponding fusel alcohols. Although other yeast ADHs, such as ADHI and ADHII, have been implicated in these reactions, our present results show that ADHVI could play a significant contribution to the pathway. In fact, the  $k_{cat}/K_m$  ratios of ADHVI towards these aldehydes are among the highest observed for all of the substrates tested.

In summary, we have identified in the yeast genome a new member of the growing MDR family and have demonstrated that the corresponding protein is an NADPH-dependent ADH of broad substrate specificity. Given the higher  $k_{cat}/K_m$  ratios for aldehyde reduction (in comparison with alcohol oxidation) found for ADHVI, together with the high [NADPH]/[NADP] ratio necessary for the growth of *S. cerevisiae* [55], its physiological function is most probably the reduction of aromatic and medium-chain aliphatic aldehydes. Our results support the involvement of this enzyme in the biosynthesis of fusel alcohols and in the final steps of the lignin degradation pathway. To our knowledge, ADHVI is the first NADPH-dependent member of the MDR family identified in yeast.

This work was supported by grants from the Dirección General de Enseñanza Superior y Científica (BMC2000-0132 and PB98-0855) and the European Union (Bio4CT972123).

## REFERENCES

- Jörnvall, H., Persson, B. and Jeffery, J. (1987) Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **167**, 195–201
- Reid, M. F. and Fewson, C. A. (1994) Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**, 13–56
- Persson, B., Zigler, J. S. and Jörnvall, H. (1994) A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Sub-lines including zeta-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductase enoyl reductases, VAT-1 and other proteins. *Eur. J. Biochem.* **226**, 15–22
- Jörnvall, H., Höög, J. O. and Persson, B. (1999) SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett.* **445**, 261–264
- Jörnvall, H., Shafiqat, J. and Persson, B. (2001) Variations and constant patterns in eukaryotic MDR enzymes. Conclusions from novel structures and characterized genomes. *Chem.-Biol. Interact.* **130–132**, 491–498
- Persson, B., Hallborn, J., Walfridsson, M., Hahn-Hägerdal, B., Keränen, S., Penttilä, M. and Jörnvall, H. (1993) Dual relationships of xylitol and alcohol dehydrogenases in families of two protein types. *FEBS Lett.* **324**, 9–14
- Jörnvall, H. (1994) The alcohol dehydrogenase system. In *Towards a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse* (Jansson, B., Jörnvall, H., Rydberg, U., Terenius, L. and Vallee, B. L., eds.), pp. 221–229. Birkhäuser Verlag, Basel
- González, E., Fernández, M. R., Larroy, C., Solà, L., Pericás, M., Parés, X. and Biosca, J. A. (2000) Characterization of a (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* *YAL060W* gene product. Disruption and induction of the gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 35876–35885
- Bennetzen, J. L. and Hall, B. D. (1982) The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **257**, 3018–3025
- Ciriacy, M. (1975) Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II. *Mol. Gen. Genet.* **138**, 157–164
- Wills, C. and Jörnvall, H. (1979) The two major isozymes of yeast alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **99**, 323–331
- Russell, D. W., Smith, M., Williamson, V. M. and Young, E. T. (1983) Nucleotide sequence of the yeast alcohol dehydrogenase II gene. *J. Biol. Chem.* **258**, 2674–2682
- Young, E. T. and Pilgrim, D. (1985) Isolation and DNA sequence of *ADH3*, a nuclear gene encoding the mitochondrial isozyme of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3024–3034
- Feldmann, H., Aigle, M., Aljinovic, G., André, B., Baclet, M. C., Barthe, C., Bann, A., Becam, A. M., Biteau, N., Boles, E. et al. (1994) Complete DNA sequence of yeast chromosome II. *EMBO J.* **13**, 5795–5809
- Wehner, E. P., Rao, E. and Brendel, M. (1993) Molecular structure and genetic regulation of *SFA*, a gene responsible for resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*, and characterization of its protein product. *Mol. Gen. Genet.* **237**, 351–358
- Fernández, M. R., Biosca, J. A., Norin, A., Jörnvall, H. and Parés, X. (1995) Class III alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: structural and enzymatic features differ toward the human/mammalian forms in a manner consistent with functional needs in formaldehyde detoxication. *FEBS Lett.* **370**, 23–26
- Fernández, M. R., Biosca, J. A., Torres, D., Crossas, B. and Parés, X. (1999) A double residue substitution in the coenzyme-binding site accounts for the different kinetic properties between yeast and human formaldehyde dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **274**, 37869–37875
- Sarthy, A., Schopp, C. and Idler, K. B. (1994) Cloning and sequence determination of the gene encoding sorbitol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **140**, 121–126
- Richard, P., Toivari, M. H. and Penttilä, M. (1999) Evidence that the gene *YLR070c* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase. *FEBS Lett.* **457**, 135–138
- Winston, F., Dollard, C. and Ricupero-Hovasse, S. L. (1995) Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* **11**, 53–55
- Jones, E. W. (1991) Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **194**, 428–453
- Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 2444–2448
- Devereux, J. P., Haeberli, P. and Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387–395
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Ausubel, F. H., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1991) *Current Protocols of Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163–168
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Rothstein, R. J. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101**, 202–211
- Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P. A. and Hilger, F. (1991) The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**, 475–477
- Seymour, J. L. and Lazarus, R. A. (1989) Native gel activity staining and preparative electrophoretic method for the detection and purification of pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *Anal. Biochem.* **178**, 243–247

- 31 Delneri, D., Gardner, D. C., Bruschi, C. V. and Oliver, S. G. (1999) Disruption of seven hypothetical aryl alcohol dehydrogenase genes from *Saccharomyces cerevisiae* and construction of a multiple knock-out strain. *Yeast* **15**, 1681–1689
- 32 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680–685
- 33 Robertson, E. F., Dannelly, H. K., Malloy, P. J. and Reeves, H. C. (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* **167**, 290–294
- 34 Wilkin, J. M., Soetaert, K., Stelandre, M., Buysens, P., Castillo, G., Demoulin, V., Bottu, G., Laneelle, M. A., Daffe, M. and De Bruyn, J. (1999) Overexpression, purification and characterization of *Mycobacterium bovis* BCG alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **262**, 299–307
- 35 Tani, A., Sakai, Y., Ishige, T. and Kato, N. (2000) Thermostable NADP(+) dependent medium-chain alcohol dehydrogenase from *Acinetobacter* sp. strain M-1: purification and characterization and gene expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5231–5235
- 36 Logemann, E., Reinold, S., Somssich, I. E. and Hahlbrock, K. (1997) A novel type of pathogen defense-related cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Biol. Chem.* **378**, 909–913
- 37 Somssich, I. E., Wernert, P., Kiedrowski, S. and Hahlbrock, K. (1996) *Arabidopsis thaliana* defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol: NADP(+) oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 14199–14203
- 38 McKie, J. H., Jaouhari, R., Douglas, K. T., Goffner, D., Feuillet, C., Grima-Pettenatti, J., Boudet, A. M., Baltas, M. and Gorrichon, L. (1993) A molecular model for cinnamyl alcohol dehydrogenase, a plant aromatic alcohol dehydrogenase involved in lignification. *Biochim. Biophys. Acta*, **1202**, 61–69
- 39 Halpin, C., Holt, K., Chojecki, J., Oliver, D., Chabbert, B., Monties, B., Edwards, K., Barakate, A. and Foxon, G. A. (1998) Brown-midrib maize (bm1)—a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. *Plant J.* **14**, 545–553
- 40 Jörnvall, H. (1977) Differences between alcohol dehydrogenases. Structural properties and evolutionary aspects. *Eur. J. Biochem.* **72**, 443–452
- 41 Ganzhorn, A. J., Green, B. W., Hersley, A. D., Gould, R. M. and Plapp, B. V. (1987) Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases. Amino acid residue 294 and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **262**, 3754–3761
- 42 Plapp, B. V., Ganzhorn, A. J., Gould, R. M., Green, D. W., Hersley, A. D., Jacobi, T., Warth, E. and Kratzer, D. A. (1991) Catalysis by yeast alcohol dehydrogenase. *Adv. Exp. Med. Biol.* **284**, 241–251
- 43 Brill, E. M., Abrahams, S., Hayes, C. M., Jenkins, C. L. and Watson, J. M. (1999) Molecular characterisation and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamyl-alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* **41**, 279–291
- 44 Goffner, D., Van Doorselaere, J., Yahiaoui, N., Samaj, J., Grima-Pettenatti, J. and Boudet, A. M. (1998) A novel aromatic alcohol dehydrogenase in higher plants: molecular cloning and expression. *Plant Mol. Biol.* **36**, 755–765
- 45 Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. and Brown, P. O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 4241–4257
- 46 Linde, J. J. M., Liang, H., Davis, R. W., Steensma, H. Y., Dijken, J. P. and Pronk, J. T. (1999) Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**, 7409–7413
- 47 Wales, M. R. and Fewson, C. A. (1994) NADP-dependent alcohol dehydrogenases in bacteria and yeast: purification and partial characterization of the enzymes from *Acinetobacter calcoaceticus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, U.K.)* **140**, 173–183
- 48 van Iersel, M. F., Eppink, M. H., Van Berkel, W. J., Rombouts, F. M. and Abee, T. (1997) Purification and characterization of a novel NADP-dependent branched-chain alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4079–4082
- 49 Reiser, J., Muheim, A., Hardegger, M., Frank, G. and Fiechter, A. (1994) Aryl-alcohol dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Gene cloning, sequence analysis, expression, and purification of the recombinant enzyme. *J. Biol. Chem.* **269**, 28152–28159
- 50 Huang, Z., Dostal, L. and Rosazza, J. P. (1993) Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2244–2250
- 51 Kosíková, B. and Sláviková, E. (1996) Growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra* and *Bullera alba* in the presence of beechwood prehydrolyzate-based lignin fractions. *Folia Microbiol. (Prague)* **41**, 430–432
- 52 Berry, D. R. and Watson, D. C. (1987) Production of organoleptic compounds. In *Yeast Biotechnology* (Berry, D. R., Russell, I. and Stewart, G. G., eds.), pp. 345–368, Allen & Unwin, London
- 53 Webb, A. D. and Ingraham, J. L. (1963) Fusel oil. *Adv. Appl. Microbiol.* **5**, 317–353
- 54 Dickinson, J. R., Lanterman, M. M., Danner, D. J., Pearson, B. M., Sanz, P., Harrison, S. J. and Hewlins, J. E. (1997) A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **43**, 26871–26878
- 55 Gancedo, C. and Serrano, R. (1989) Energy-yielding metabolism. In *The Yeasts*, vol. 3, 2nd edn., (Rose, A. H. and Harrison, J. S., eds.), pp. 205–259, Academic Press, New York

Received 26 April 2001/13 September 2001; accepted 24 October 2001

**Resumen de los resultados presentados en el artículo ‘Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction’. *Biochem. J.* (2002), 361, 163-172.**

En este trabajo se ha purificado el producto del gen *YMR318C* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, partiendo de células que lo sobreexpresaban. La proteína aislada resultó ser una ADH homodimérica compuesta por subunidades de 40 kDa con una actividad alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP(H).

Utilizando el motivo de secuencia GHEX<sub>2</sub>GX<sub>5</sub>(G,A)X<sub>2</sub>(I,V,A,C,S) característico de las alcohol deshidrogenasas de cadena media (MDR) que contienen Zn y analizando el genoma de *S.cerevisiae*, se encontraron 12 secuencias correspondientes a los genes *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH5*, *SFA1*, *SOR1*, *YDL246C* (tiene un 99% de identidad con *SOR1*), *XYL2*, *BDH1* y tres genes con función desconocida, *YAL061W* (comparte un 51% de identidad con *BDH1*), *YMR318C* y *YCR105W* (con un 64% de identidad entre ellos y un 37% de identidad con enzimas MDR de la familia de las CADs). Entre las nuevas secuencias identificadas sólo *YMR318C* y *YCR105W* presentaban las características de una ADH con actividad dependiente de NADP(H), y por este motivo *YMR318C* fue escogido para una mejor caracterización.

El gen *YMR318C* fue sobreexpresado en la cepa de levadura deficiente en proteasas BJ2168, utilizando el vector de expresión pYes2, regulable por galactosa. Comparando las actividades con cinamaldehído entre la cepa silvestre y la cepa de sobreexpresión se identificó al producto del gen *YMR318C* como una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP(H) a la que se denominó Adh6p.

Se utilizaron diversas etapas cromatográficas para llegar a una total homogeneidad del producto final. El extracto crudo de levadura fue preparado por rotura mecánica de las células, utilizando bolas de vidrio y seguidamente fue centrifugado a 29.000g para separar la fracción soluble. Como primera etapa se utilizó la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose. El pico de actividad obtenido en el gradiente salino fue cargado en una cromatografía de Hydroxyapatite de la que se obtuvo un nuevo pico de actividad cinamaldehído reductasa con NADPH como coenzima. Finalmente la proteína fue cargada en una cromatografía de afinidad de Red-Sepharose y el enzima fue eluido con un gradiente de NADP<sup>+</sup>. La proteína recogida resultó prácticamente pura, pero para eliminar el exceso de coenzima y obtener un mayor grado de purificación, la muestra de Adh6p fue sometida a una cromatografía

HPLC de gel filtración con la columna Superdex 200-HR. En la Tabla 1 se presenta el resumen de la purificación de Adh6p. El grado de purificación fue de 47 veces y se llegó a una actividad específica de 183 U/mg.

La muestra resultante de la purificación se analizó por electroforesis en SDS-PAGE, en la que se visualizó una única banda de aproximadamente 40 kDa. En la columna de gel filtración utilizada en la purificación, se determinó una Mr de 71300 para la proteína nativa. Estos resultados sugieren que Adh6p es un homodímero.

Con la proteína purificada se realizaron estudios de especificidad de sustrato con un amplio abanico de alcoholes y aldehídos (Figura 2 y Tabla 2). Adh6p resultó ser activa con todos los aldehídos ensayados, tanto aromáticos como alifáticos con o sin ramificación. Sin embargo, no se detectó la reducción de cetonas. Para la reacción de oxidación el patrón fue muy similar; el enzima presentaba actividad con alcoholes primarios aromáticos o alifáticos (ramificados o de cadena lineal). Prácticamente no se detectó actividad con alcoholes secundarios o dioles.

El estudio de los parámetros cinéticos del enzima está resumido en la Tabla 3. La mayor eficiencia catalítica se observó para el pentanal y el veratraldehído ( $380.000 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  y  $217.800 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Debido a que la oxidación de alcoholes a pH fisiológico presenta una eficiencia catalítica 50 veces inferior, se propuso que la función de Adh6p estaría relacionada con la reducción de aldehídos. La especificidad de coenzima resultó, tal y como se había predicho en el análisis de secuencia, dependiente exclusivamente de NADP(H).

Para explorar la función que Adh6p podría desempeñar en la levadura, se construyó una cepa deficiente en Adh6p. La delección se realizó en un único paso utilizando *TRP1* como marcador. La secuencia de *ADH6* fue interrumpida por *TRP1*, que se clonó en las dianas internas de *ADH6*, *NdeI* y *NcoI*. Transformando la cepa de levadura BJ2168 con dicha construcción y seleccionando los transformantes en medio deficiente en triptófano, se obtuvo una cepa *adh6::TRP1* que se designó BJ18.

Uno de los sustratos que presentaban mejor eficiencia catalítica era el veratraldehído, producto derivado de la degradación de lignina, de manera que se ensayó la capacidad de crecer en presencia de veratraldehído y de eliminar este producto. Para este ensayo se utilizaron varias cepas de levadura: una cepa silvestre (BJ2168), una cepa *adh6Δ* (BJ18) y una cepa con sobreexpresión de Adh6p (BJ18[pAAH5-*YMR318C*]). Cuando los cultivo alcanzaron una  $D_{595}$  de 0.1, se añadieron al medio de cultivo diferentes concentraciones de veratraldehído (0, 3, 5,

10 y 20 mM) y se hizo un seguimiento del crecimiento midiendo la densidad a 595 nm y del veratraldehído restante en el medio de cultivo (presenta un máximo de absorción a 310 nm). En la Figura 3 se puede ver una relación directa entre la concentración de veratraldehído en el medio y la inhibición del crecimiento. La cepa deficiente en Adh6p resultó incapaz de eliminar el veratraldehído presente incluso a concentraciones bajas (Figura 3B). Sin embargo, tanto la cepa silvestre como la cepa con sobreexpresión de *ADH6* pudieron metabolizar el aldehído, alcanzando así un mayor nivel de crecimiento. A 10 mM de veratraldehído la cepa silvestre no pudo alcanzar un crecimiento normal a pesar de que conseguía eliminar el aldehído, aunque más lentamente que la cepa de sobreexpresión de *ADH6*. En la Figura 3E se demuestra la implicación de Adh6p en la desintoxicación de veratraldehído. Aunque la alta concentración del tóxico impide el crecimiento de todas las cepas, la cepa que sobreexpresa *ADH6* es la única que puede llegar a eliminar el aldehído por completo. Estos resultados indican que Adh6p es el único enzima que puede eliminar el veratraldehído *in vivo* en *Saccharomyces cerevisiae*, en estas condiciones.



## Properties and functional significance of *Saccharomyces cerevisiae* ADHVI

Carol Larroy, M. Rosario Fernández, Eva González, Xavier Parés\*, Josep A. Biosca

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

### Abstract

The completion of the *Saccharomyces cerevisiae* genome project has provided the opportunity to explore for new genes of the medium-chain dehydrogenase/reductase enzyme superfamily. Our group has recently identified a new gene, the *YMR318C* open reading frame, which coded for a Zn-containing NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVI). ADHVI has been purified to homogeneity from over expressing yeast cells, and found to be a homodimer of 40 kDa subunits. The enzyme showed a strict specificity for NADP(H) and high activity with a variety of long chain aliphatic and bulky substrates. Aldehydes exhibited 50–12 000 times higher catalytic efficiency than the corresponding alcohols. Substrates with high  $k_{cat}/K_m$  were: pentanal, veratraldehyde and cinnamaldehyde. The ADHVI expression was strongly induced when galactose was the sole carbon source in the culture medium. Phylogenetic trees include ADHVI in the cinnamyl alcohol dehydrogenase (CADH) family. In contrast to the plant CADH, involved in lignin biosynthesis, this is not the function for ADHVI, since yeast does not synthesize lignin. ADHVI may be physiologically involved in several steps of the lignin degradation pathway, initiated by other microorganisms, in the synthesis of fusel alcohols, products derived from the aminoacidic metabolism, and in the homeostasis of NADP(H). Disruption of *ADH6* was not lethal for the yeast, under laboratory conditions.

© 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*; Cinnamyl alcohol; Alcohol dehydrogenase

### 1. Introduction

During the last years many genomes have been completely sequenced, giving rise to numerous studies of identification and classification of predicted proteins. Our group is interested in the identification of all Zn-containing members of the

\* Corresponding author. Tel.: +34-93-5813026; fax: +34-93-5811264.

E-mail address: [xavier.pares@uab.es](mailto:xavier.pares@uab.es) (X. Parés).

medium-chain dehydrogenase/reductase (MDR) superfamily in the *Saccharomyces cerevisiae* genome, and in the characterization of the corresponding gene products with still unknown function. With this aim, we have searched the *S. cerevisiae* genome for the protein pattern  $\text{GHEX}_2\text{GX}_5(\text{G,A})\text{X}_2(\text{I,V,A,C,S})$ , present in all the Zn-containing MDRs, and 12 ORFs were found by the BLAST program (National Center for Biotechnology Information, NIH). Among them, only 4 ORFs remained without an associated enzymatic activity: *YAL060W* and *YAL061W* which shared 51% identity, and *YMR318C* and *YCR105W* (64% identity between them). While *YAL061W* and *YAL060W* protein products had a Glu at position 223 (after the numbering of horse liver ADH) characteristic of NAD(H) dependent ADHs, the proteins coded by *YMR318C* and *YCR105W* had a Ser residue [1]. We cloned and over expressed the *YAL060W* gene, and purified the corresponding protein which consisted in a novel enzyme of the MDR family, a NAD(H)-dependent 2,3-butanediol dehydrogenase. This enzyme was the first eukaryotic MDR characterized with this substrate specificity [1]. Following this strategy, *YMR318C* was also cloned and over expressed in *S. cerevisiae*. Alcohol dehydrogenase and aldehyde reductase activities, both dependent on NADP(H), were identified in yeast extracts over expressing *YMR318C*. Since the enzyme, in crude homogenates, was active towards a wide variety of aliphatic and aromatic alcohols and aldehydes, including ethanol, we named *ADH6* the *YMR318C* open reading frame and ADHVI its protein product. ADHVI was purified to homogeneity and their molecular and kinetic properties were studied [2].

Here we summarize the ADHVI data previously reported [2] and we further characterize the yeast ADHVI kinetic properties. Moreover, the expression levels of *ADH6* have been investigated under different carbon sources and growth phases using specific antibodies. In order to associate a physiological role for ADHVI, an *ADH6* deleted mutant has been also constructed. Finally, we speculate on the possible function of ADHVI in yeast metabolism on the basis of its substrate and cofactor specificity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cloning and purification of ADHVI

The *YMR318C* gene was amplified by PCR from genomic DNA and cloned in the multicopy galactose inducible pYes2 vector (Invitrogen, Groningen, The Netherlands). The BJ2168 protease deficient strain [3] was used to over express the *YMR318C* gene product [2]. Yeast cell homogenates were prepared with glass beads in a bead-beater homogenator (Biospec Products, Bartlesville, OK). Separation procedures started with a DEAE-Sepharose chromatography at pH 7.0. Elution of the active material was performed with an increasing linear gradient of NaCl. Active fractions were pooled and desalted prior to a hydroxyapatite chromatography. An optimal purification was finally achieved by affinity chromatography with a RED-Sepharose column, using NADP for specific elution. To remove the NADP from the ADHVI preparation, a HPLC gel-filtration chromatography was used. This step resulted in a gain of specific activity and allowed the determination of the native molecular mass of the enzyme.

### 2.2. ADHVI activity

Enzyme activities were determined spectrophotometrically at 25 °C with a Cary 400 spectrophotometer (Varian, Sunnyvale, CA) as described [2]. The influence of pH on the enzymatic activities was tested using 0.1 M sodium acetate (pH 5.0–5.5), 33 mM sodium phosphate (pH 6.0–7.5), 33 mM sodium pyrophosphate (pH 8.0–9.0) and 0.1 M glycine (pH 9.5–11.0). Reduction activities were performed with 1 mM pentanal and 0.5 mM NADPH, in 0.2 cm pathlength cuvettes, and oxidation activities were performed with 10 mM pentanol and 1.2 mM NADP, in 1 cm pathlength cuvettes.

One activity unit corresponded to 1  $\mu\text{mol}$  of NADP(H) formed per min. The steady-state parameters were determined by fitting the Michaelis-Menten equation with the help of the GRAFIT 4.0 program (Erithacus Software Ltd., Horley, Surrey, UK).

### 2.3. Disruption of the *ADH6* gene

The BJ2168 strain was used for the disruption of *ADH6*, that was carried out by one-step gene replacement [4] with the TRP1 gene as a marker [2].

### 2.4. Expression of *ADHVI* in different carbon sources

The yeast strain BJ2168 was grown in 2% yeast extract, 2% peptone and either 2% glucose, 2% galactose or 3% glycerol. Flasks containing 150-ml medium were inoculated with yeast cells to an initial O.D. of 0.2 at 595 nm. The cultures were shaken at 250 rpm and grown at 30 °C. Samples were taken at different phases of the growth curve and kept at –80 °C. Crude extracts were prepared with the YPER reagent as recommended (Pierce, Rockford, IL). Chemiluminescent immunodetection of the Western blot analysis using a specific antibody against *ADHVI*, served to quantify protein expression.

### 2.5. Electrophoretic analysis

Twelve percent SDS-PAGE was performed as described previously [5], and the proteins were revealed by staining with silver nitrate. Native 7% acrylamide gels were used in order to perform specific activity staining. Gels were incubated in 1.2 mM NADP, 0.1 mg/ml 5-methylphenazine methosulphate, 0.2 mg/ml Nitro Blue Tetrazolium, 50 mM Tris pH 8.6, and 100 mM pentanol was used as substrate.

## 3. Results

### 3.1. Purification and molecular characterization of *ADHVI*

Yeast *ADHVI* was purified to homogeneity in four chromatographic steps. Analysis of the first three purification steps by SDS-PAGE and silver nitrate staining showed a single band of about 40 kDa after the last chromatography (Fig. 1A). The fourth separation step consisted in a gel-filtration

chromatography which served to eliminate NADP from the preparation, and to estimate a native molecular mass of 71.3 kDa for *ADHVI* (Fig. 1B). The enzyme was, therefore, a homodimer.

### 3.2. *ADHVI* substrate specificity and kinetic parameters

Aromatic and aliphatic (linear and branched-chain) aldehydes were reduced to their corresponding alcohols by *ADHVI*. No activity was detected with ketones. For the oxidation reaction, the enzyme showed a similar substrate specificity, being active with aliphatic and aromatic alcohols but not with secondary alcohols or vicinal diols [2].

Kinetic studies, summarized in Table 1, showed that the highest catalytic efficiencies of *ADHVI* were found for pentanal and veratraldehyde, followed by cinnamaldehyde and 3-methylbutanal. Catalytic efficiencies drastically decreased for the oxidation reactions. Thus, cinnamyl alcohol reduction exhibited a  $k_{\text{cat}}/K_m$  value 50-fold lower than that for cinnamaldehyde reduction. The difference was dramatically pronounced for pentanol oxidation with a 12 000-fold decrease in  $k_{\text{cat}}/K_m$  as compared to pentanal reduction. Ethanol and 3-methylbutanol could not saturate the enzyme.

The rate of the enzymatic reactions was affected by the pH of the assay buffer. The pH optima for the oxidation of pentanol and for the reduction of pentanal were 10 and 7, respectively (Fig. 2).

The coenzyme specificity was also tested. The activity for the reduction of cinnamaldehyde with 0.5 mM NADH was less than 5% of that found when NADPH was used. Similarly, less than 5% activity was found with 5 mM NAD, compared with the NADP-dependent activity, when cinnamyl alcohol oxidation was measured. Therefore, *ADHVI* is strictly dependent of NADP(H).

### 3.3. Disruption of the *ADH6* gene

Disruption of the *ADH6* gene was accomplished by the one-step gene replacement and was confirmed by PCR with specific oligonucleotides for the *ADH6* locus [2]. Genomic DNA from the wild type strain (BJ2168) and the *adh6Δ* mutant strain



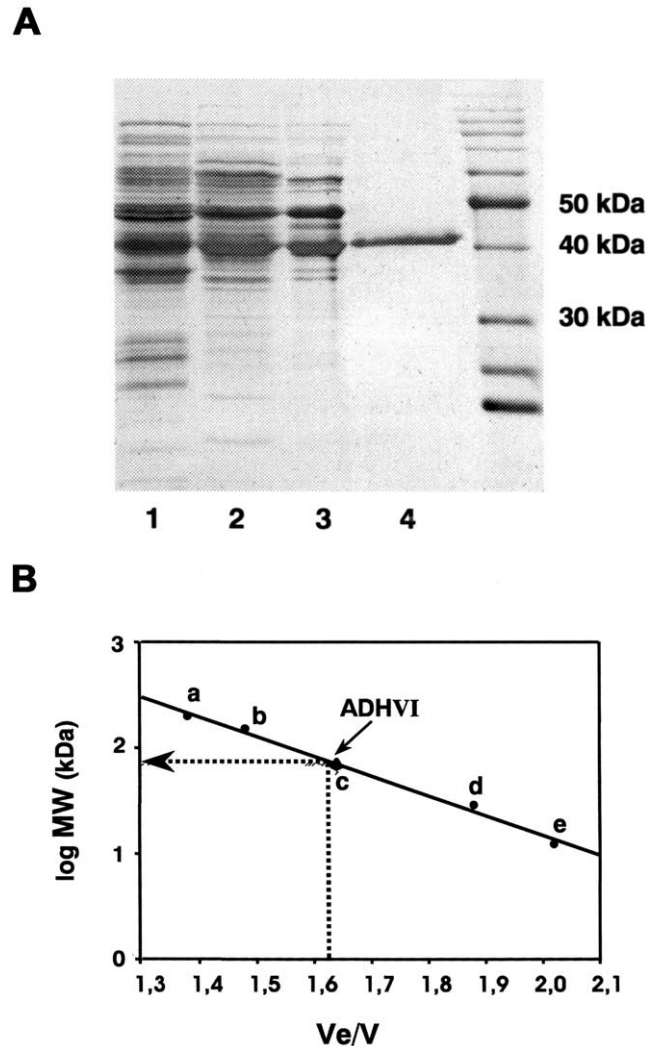


Fig. 1. Molecular properties of *S. cerevisiae* ADHVI. (A) SDS/PAGE analysis of the different purification steps, with silver nitrate staining. (1) Crude extract, 10  $\mu$ g, (2) DEAE-Sepharose chromatography, 10  $\mu$ g, (3) Hydroxyapatite chromatography, 5  $\mu$ g, (4) RED-Sepharose chromatography, 1  $\mu$ g. (B) Size-exclusion chromatography on a Superdex 200 HR column connected to an HPLC system. The standards used were (a)  $\beta$ -amylase, 200 kDa, (b) yeast alcohol dehydrogenase, 150 kDa, (c) bovine serum albumin, 66 kDa, (d) carbonic anhydrase, 29 kDa and (e) cytochrome *c*, 12.4 kDa.

(BJ18) were used for PCR analysis. The corresponding amplification for the *adh6A* locus resulted in a gain of about 500 bp due to the insertion of the TRP1 marker, which was longer than the fragment removed (Fig. 3A).

The *adh6A* strain grew in a rich medium at a similar rate as the wild-type strain. Yeast homo-

genes of wild-type and *adh6A* strains were analyzed by native gel electrophoresis, followed by specific detection of the ADHVI activity. Fig. 3B shows that NADP-dependent oxidation of pentanol was accomplished exclusively by ADHVI, an activity present in the wild-type strain but not in the *adh6A* strain.

Table 1  
Kinetic parameters of *S. cerevisiae* ADHVI

Substrate	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (/min)	$k_{cat}/K_m$ (/mM/min)
Cinnamaldehyde	$0.17 \pm 0.01$	$18\,400 \pm 600$	$107\,000 \pm 8600$
Veratraldehyde	$0.07 \pm 0.01$	$15\,800 \pm 140$	$218\,000 \pm 9500$
Pentanal	$0.06 \pm 0.01$	$22\,700 \pm 190$	$380\,000 \pm 57\,800$
3-methylbutanal	$0.13 \pm 0.04$	$14\,000 \pm 670$	$109\,000 \pm 30\,400$
NADPH	$0.03 \pm 0.01$		
Cinnamyl alcohol	$0.44 \pm 0.03$	$884 \pm 90$	$2030 \pm 250$
Pentanol	$10.5 \pm 3.4$	$335 \pm 6$	$32 \pm 10$
NADP	$0.03 \pm 0.01$		

Activities were measured in 33 mM sodium phosphate, pH 7.0, with 0.5 mM NADPH or 1.2 mM NADP. NADP and NADPH kinetics were performed with 10 mM cinnamyl alcohol and 1 mM cinnamaldehyde, respectively.

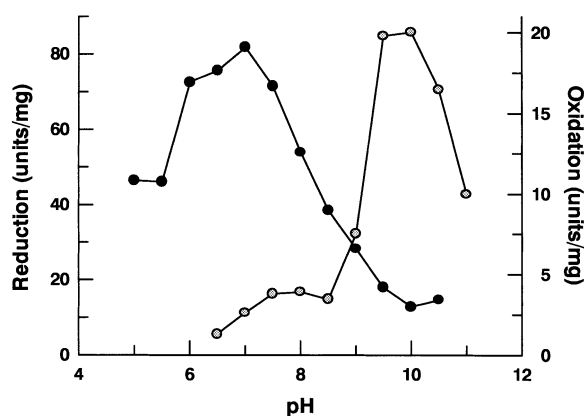


Fig. 2. Effect of pH on ADHVI activity. Reduction activity (black symbols) was measured with 1 mM pentanal and 0.5 mM NADPH. Oxidation reaction (white symbols) was performed with 10 mM pentanol and 1.2 mM NADP.

#### 3.4. Growth kinetics on alternative carbon sources

In order to quantify the ADHVI expression pattern present in cultures grown on different carbon sources, growth kinetics were monitored and samples were taken at different stages for further analysis of the reductase activity and the presence of ADHVI protein. As shown in Fig. 4, yeast cells grew to a similar density in media with glucose, galactose or glycerol. The growth rate was lower when glycerol was the carbon source.

NADPH-dependent cinnamaldehyde reductase activity was assayed in the yeast lysates of the three cultures. The ADHVI activity disappeared at early stationary phase in the cells grown in glucose and glycerol, while it was still detected in the cells

grown in galactose. Induction of the reductase activity was detected in the logarithmic phase cultures of the yeast cells grown in galactose and glycerol. In order to relate the measured activities to ADHVI protein, a parallel detection of ADHVI was performed in the different growth phases by the use of specific polyclonal antibodies against ADHVI. Yeast extracts (5  $\mu$ g protein) sampled at different growth times were subjected to SDS-PAGE and transferred to an Immobilon-P membrane. Detection of ADHVI was accomplished by incubation with specific antibodies. As shown in Fig. 4B, the increase in reductase activity in the presence of galactose paralleled the induction of ADHVI protein. However, when glycerol was the carbon source, the increase in reductase activity (Fig. 4A) did not correspond to an increase in ADHVI (Fig. 4B). In fact, the ADHVI expression was clearly repressed in glycerol, as the enzyme levels were below those found in the cells grown in glucose (Fig. 4B). This result suggests that enzymes other than ADHVI were responsible for the increased reductase activity in glycerol cultures.

#### 4. Discussion

A special effort has been made in our laboratory to identify and classify new Zn-containing members of the MDR superfamily in *S. cerevisiae*. In previous reports [1,2,6] we described the methodology employed to explore the yeast genome for new genes that could code for Zn-containing

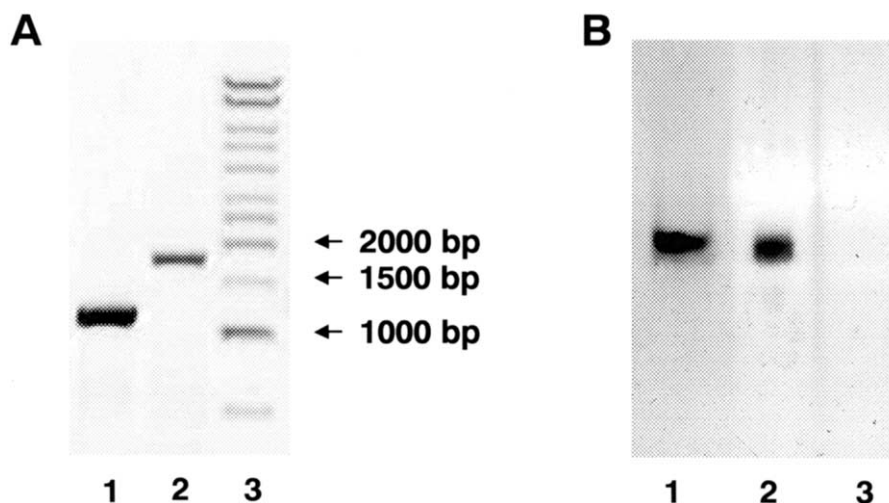


Fig. 3. Analysis of the *ADH6* disruption. (A) PCR analysis of the *ADH6* locus for the wild-type strain, lane 1, and the *adh6Δ* mutant, lane 2. Molecular weight standards were loaded on lane 3. (B) Native PAGE of pure ADHVI, lane 1, and yeast lysates from the wild-type strain, lane 2, and the *adh6Δ* mutant strain, lane 3. NADP-dependent activity staining was performed with 100 mM pentanol.

MDR. Two new enzymes were identified by using the Zn-containing ADH signature as search pattern. Cloning, over expression, purification and subsequent elucidation of the enzyme specificity led us to the characterization of a 2,3-butanediol dehydrogenase coded by *BDH1* [1], and the NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase, ADHVI, coded by *ADH6* [2]. ADHVI, together with Ycr105p (64% identity to ADHVI), have been classified as members of the cinnamyl alcohol dehydrogenase (CADH) family [7,8]. Consistent with this classification is the phylogenetic analysis shown in Fig. 5. Both, ADHVI and Ycr105p are placed in a separate branch indicating a new class, namely the CADH family, different from the already established tetrameric ADH, polyol ADH and the class III ADH. The CADH family is represented mainly by plant CADHs and by some bacterial alcohol dehydrogenases [9,10].

Here we have further characterized ADHVI, a CADH enzyme of *S. cerevisiae*. The protein is a homodimer of 80 kDa. It is active towards a wide variety of aldehydes and alcohols, as expected for an ADH, but whereas all other yeast Zn-containing MDRs (Fig. 5) use NAD(H) as coenzyme,

ADHVI is strictly specific for NADP(H). Kinetic characterization showed that the best substrates for ADHVI were pentanal and veratraldehyde among the aldehydes tested. The catalytic efficiencies decreased dramatically (50–12 000-fold) for alcohols. Ethanol is a very poor substrate for ADHVI. Substrate specificity and NADP(H) dependence strongly suggest that ADHVI would function as an aldehyde reductase in the yeast living cell.

Both activity and Western blot analyses demonstrate a strong induction of ADHVI in yeast cultures using galactose as a sole carbon source, as compared with cultures with glucose (Fig. 4). The reductase activity of logarithmic phase yeast cells also increased in cultures grown in glycerol with respect to those grown in glucose. However, the use of specific antibodies against ADHVI showed a low amount of ADHVI protein in cultures with glycerol, even lower than in glucose cultures (Fig. 4B), suggesting a repression of ADHVI by glycerol. Therefore, the increase of reductase activity in the glycerol cultures was not due to ADHVI but to the induction of additional cinnamaldehyde reductases, other than ADHVI.

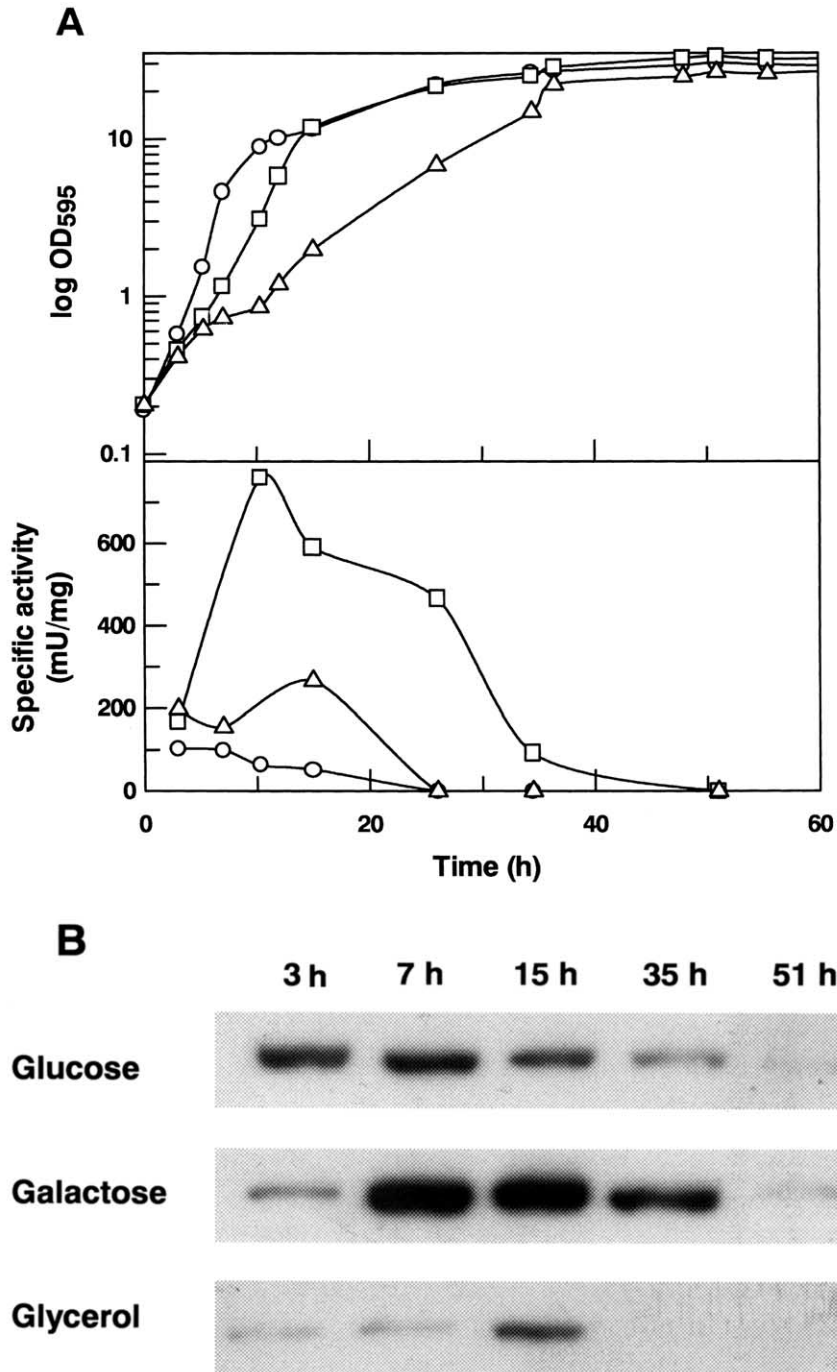


Fig. 4. Growth kinetics and ADHVI expression pattern on alternative carbon sources (A) Yeast growth was monitored at 595 nm. Specific activity was assayed with 1 mM cinnamaldehyde and 0.5 mM NADPH at pH 7.0. Yeast cells were grown on 2% glucose (circles), 2% galactose (squares) and 3% glycerol (triangles). (B) Yeast lysates (5  $\mu$ g protein) from each growth condition were subjected to a 12% acrylamide SDS/PAGE and were transferred onto an Immobilon-P membrane. The membrane was incubated with antibody against ADHVI.

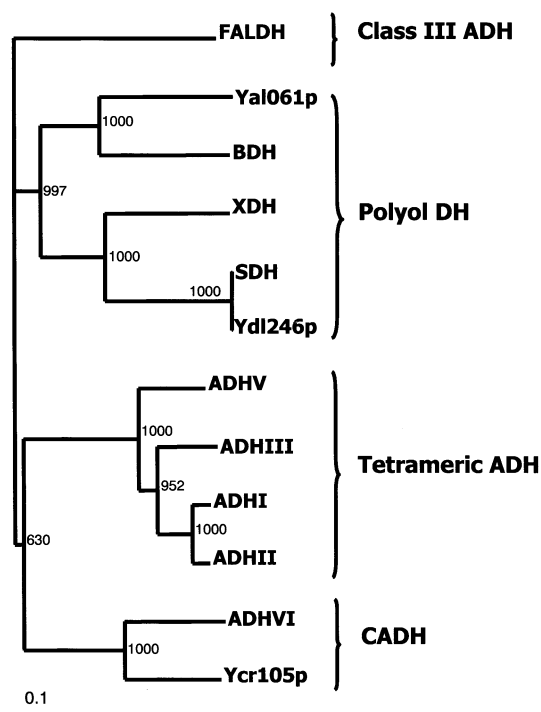


Fig. 5. Classification of yeast Zn-containing MDR alcohol dehydrogenases. Unrooted phylogenetic tree relating the Zn-containing MDR enzymes from *S. cerevisiae*. Numbers indicate the bootstrap analysis (1000 bootstrap replicates).

When cells grown in the described media reached the stationary phase, no NADPH-cinnamaldehyde reductase activity nor significant amounts of ADHVI were detected in their respective extracts (Fig. 4). These results agree with our previous observations [2] and with the information obtained from array experiments [11].

Several physiological functions assigned to enzymes of the CADH family are: monolignol synthesis in the lignin biosynthetic pathway, plant defense mechanisms, biosynthesis of the cell envelope lipids and participation in the metabolism of alkanes [9,10]. It is difficult, however, to assign a role for ADHVI when considering its structural similarity to the plant enzymes from the CADH family, with well established functions. Thus, yeast cannot synthesize lignin. In contrast, ADHVI could contribute to the yeast ability to produce fusel alcohols as a result of amino acid assimila-

tion, which requires the participation of a reductase activity. This metabolic pathway, summarized in Fig. 6, is known as the Ehrlich pathway [12,13], and starts with the deamination of leucine, valine, threonine and isoleucine, followed by decarboxylation. As a result, the yeast produces propanal, isobutanal, 2-methylbutanal and 3-methylbutanal that are quickly reduced to their corresponding alcohols. The catabolism of these amino acids involves common intermediates with the anabolic pathway, so that these alcohols could also result from the anabolic metabolism. Several reports have implicated yeast ADHI and ADHII in the last step of fusel alcohol production [14,15]. However, participation of ADHVI in this process should not be ignored. Thus, recent studies performed with mutant strains for ADHs have demonstrated an enhanced NADP(H)-dependent reductase activity, showing that enzymes different from conventional ADHs are also responsible for aldehyde reduction in yeast [16]. The high efficiency towards these aldehydes, together with the specificity for NADP(H), makes reliable the participation of ADHVI in the metabolism of fusel alcohols. As a consequence, ADHVI would play a role in the homeostasis of NADP(H).

Another proposed function for ADHVI is related with the fact that it is required for growth when veratraldehyde, toxic to the cell, is added to the medium [2]. Our results with strains either lacking *ADH6* or over expressing the gene demonstrated that ADHVI has a major role in veratraldehyde elimination [2]. Reduction of this aldehyde to the corresponding alcohol is part of the lignin biodegradation process [17]. Moreover, *S. cerevisiae* can convert ferulic acid and *p*-coumaric acid (also compounds derived from lignin biodegradation) into 4-hydroxy-3-methoxystyrene and vinylphenol respectively [18,19]. Finally, it is also known that *S. cerevisiae* is able to use lignin fractions derived from beechwood prehydrolyzates as sole carbon source [20]. In conclusion, *S. cerevisiae* possesses enzymatic systems, including ADHVI, that account for its capacity of growing in a ligninolytic environment, where other microorganisms have already started the lignin breakdown.

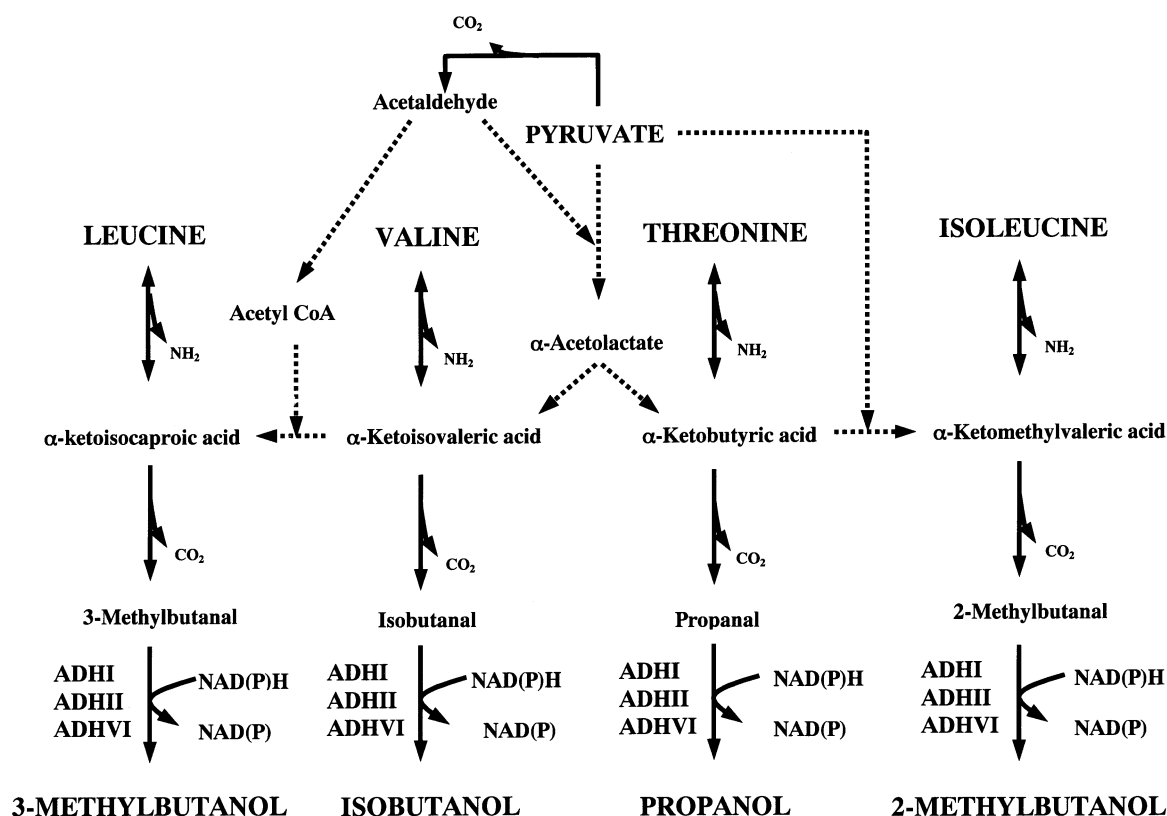


Fig. 6. Scheme for anabolic and catabolic routes leading to fusel alcohols production. Intermediate reactions not described are indicated with dotted lines. Taken from [21] in a modified form.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from the Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica (BMC2000-0132 and PB98-0855) and the European Union (Bio4CT972123).

### References

- [1] E. González, M.R. Fernández, C. Larroy, Ll. Sola, M.A. Pericas, X. Parés, J.A. Biosca, Characterization of a (2R, 3R)-2,3-butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* YAL060W gene product, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35876–35885.
- [2] C. Larroy, M.R. Fernández, E. González, X. Parés, J.A. Biosca, Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde metabolism, *Biochem. J.* 361 (2002) 163–172.
- [3] E.W. Jones, Tackling the protease problem in the *Saccharomyces cerevisiae*, *Methods Enzymol.* 194 (1991) 428–453.
- [4] R.J. Rothstein, One-step gene disruption in yeast, *Methods Enzymol.* 101 (1983) 202–211.
- [5] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [6] E. González, M.R. Fernández, C. Larroy, X. Parés, J.A. Biosca, Characterization and functional role of *Saccharomyces cerevisiae* 2,3-butanediol dehydrogenase, *Chem. Biol. Interact.* 130–132 (2001) 425–434.
- [7] H. Jörnvall, J.O. Höög, B. Persson, SDR and MDR completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature, *FEBS Lett.* 445 (1999) 261–264.
- [8] H. Jörnvall, J. Shafqat, B. Persson, Variations and constant patterns in eukaryotic MDR enzymes. Conclusions from novel structures and characterized genomes, *Chem. Biol. Interact.* 130–132 (2001) 491–498.
- [9] J.M. Wilkin, K. Soetaert, M. Stelandre, P. Buysens, G. Castillo, V. Demoulin, G. Bottu, M.A. Laneelle, M. Daffe, J. De Bruyn, Overexpression, purification and character-

- ization of *Mycobacterium bovis* BCG alcohol dehydrogenase, *Eur. J. Biochem.* 262 (1999) 299–307.
- [10] A. Tani, Y. Sakai, T. Ishige, N. Kato, Thermostable NADP(+)-dependent medium-chain alcohol dehydrogenase from *Acinetobacter* sp. strain M-1: purification and characterization and gene expression in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 5231–5235.
- [11] A.P. Gasch, P.T. Spellman, C.M. Kao, O. Carmel-Harel, M.B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, P.O. Brown, Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 4241–4257.
- [12] F. Ehrlich, Über das natürliche isomere des leucins, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 37 (1904) 1809–1840.
- [13] A.D. Webb, J.L. Ingraham, Fusel oil, *Adv. Appl. Microbiol.* 5 (1963) 317–353.
- [14] S. Collin, M. Montesinos, E. Meersman, W. Swinkels, J.P. Dufour, Yeast dehydrogenase activities in relation to carbonyl compounds removal from wort and beer, *Proceedings of the EBC Congress*, (1991) 409–416.
- [15] C. Boulton, D. Quain, *Brewing Yeast and Fermentation*, first ed., Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, 2001, pp. 117–121.
- [16] F. Evellin, P. Perpète, S. Collin, Yeast ADHI disruption: a way to promote carbonyl compounds reduction in alcohol-free beer production, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57 (3) (1999) 109–113.
- [17] J. Reiser, A. Muheim, M. Hardegger, G. Frank, A. Fietcher, Aryl-alcohol dehydrogenase from white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Gene cloning, sequence analysis, expression, and purification of the recombinant enzyme, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 28152–28159.
- [18] D. Delneri, D.C. Gardner, C.V. Bruschi, S.G. Oliver, Disruption of seven hypothetical aryl alcohol dehydrogenase genes from *Saccharomyces cerevisiae* and construction of multiple knock-out strain, *Yeast* 15 (1999) 1681–1689.
- [19] Z. Huang, L. Dostal, J.P. Rosazza, Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 2244–2250.
- [20] B. Kosíková, E. Sláviková, Growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra* and *Bullera alba* in the presence of beechwood prehydrolyzate-based lignin fractions, *Folia. Microbiol. (Praha)* 41 (1996) 430–432.
- [21] C. Boulton, D. Quain, *Brewing Yeast and Fermentation*, first ed., Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, 2001, p. 119.

**Resumen de los resultados presentados en el artículo ‘Properties and functional significance of *Saccharomyces cerevisiae* ADHVI’ *Chem. Biol. Interact.* (2003) 143-144, 229-238.**

En este trabajo se ha continuado la caracterización de Adh6p. Se han complementado los estudios cinéticos realizados en el trabajo anterior y se ha utilizado la proteína Adh6p purificada para producir anticuerpos que reconocieran de manera específica a Adh6p. Una combinación de ensayos de detección de la actividad aldehído reductasa dependiente de NADPH con ensayos de detección inmunológica de Adh6p nos ha permitido establecer un perfil de expresión en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* crecidos en diferentes fuentes de carbono.

Utilizando Adh6p pura se ha continuado el estudio de los parámetros cinéticos. Se han determinado las eficiencias catalíticas de varios sustratos a pH fisiológico y los resultados obtenidos refuerzan su función como aldehído reductasa (Tabla 1). Así la oxidación del cinamil alcohol presentaba una  $k_{cat}/K_M$  50 veces menor a la obtenida para la reducción del cinamaldehído, mientras que para las constantes cinéticas de la pareja pentanol/pentanal, la oxidación presentaba un valor de  $k_{cat}/K_M$  12.000 veces menor respecto al de la reducción. Incluso sustratos como el pentanol y el 3-metilbutanol no consiguieron saturar al enzima.

En la Figura 2 se muestra el efecto del pH sobre la actividad enzimática de Adh6p. La reducción se dio de manera óptima a pH 7 mientras que la oxidación presentó un máximo de actividad a pH 10.

El análisis de la cepa deficiente en Adh6p, cuya construcción ha sido descrita previamente [Larroy et al., 2002a], demuestra que Adh6p es el único enzima responsable de la actividad de oxidación del pentanol utilizando  $NADP^+$  como coenzima. Los extractos de la cepa silvestre y mutante *adh6* $\Delta$  fueron sometidos a una electroforesis nativa seguida de una tinción por actividad alcohol deshidrogenasa con pentanol y  $NADP^+$ . Como se muestra en la Figura 3B, sólo se pudo detectar la banda correspondiente a Adh6p.

Para cuantificar el patrón de expresión de Adh6p se crecieron cultivos de la cepa BJ2168 en diferentes fuentes de carbono (glucosa al 2%, galactosa al 2% y glicerol al 3%). Se hizo un seguimiento del crecimiento y se tomaron muestras en diferentes puntos de la curva para un posterior análisis de la actividad reductasa y de la presencia de la proteína Adh6p. Se



prepararon extractos crudos de las muestras utilizando el reactivo Y-PER y se ensayó la actividad cinamaldehído reductasa dependiente de NADPH. Un análisis electroforético en SDS-PAGE seguido de una transferencia a membrana de Inmobilon-P sirvió para la detección específica de Adh6p. Se utilizaron 5 µg de lisado de levadura y se incubaron con anticuerpo contra Adh6p que fue detectado por quimioluminiscencia.

En la Figura 4 se puede ver una clara inducción de la actividad en los cultivos crecidos en galactosa en comparación con los crecidos en glucosa que se corresponde con un aumento en la concentración de Adh6p en la célula. Sin embargo, las actividades obtenidas en las muestras tomadas de cultivos crecidos en glicerol indican un aumento de la actividad cinamaldehído reductasa dependiente de NADPH que no se corresponde con un aumento de la proteína detectada en el inmunoblot. Por otra parte, la cantidad de proteína Adh6p detectada en las muestras crecidas en glicerol es claramente inferior a las muestras detectadas en presencia de glucosa. Estos datos nos sugieren una clara represión de Adh6p cuando el glicerol es la única fuente de carbono y la existencia de una actividad cinamaldehído reductasa debida a otra/s proteína/s inducible/s en estas condiciones. Prácticamente no se detectó actividad cinamaldehído reductasa dependiente de NADPH ni proteína Adh6p cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria.

Finalmente se ha hecho una clasificación filogenética de las 12 MDRs identificadas en *Saccharomyces cerevisiae* utilizando el motivo conocido para las ADHs de cadena media que unen Zn. Como se puede ver en la Figura 5, Adh6p junto con Ycr105p (con la que presenta un 64% de identidad de secuencia) forman una rama independiente de las alcohol deshidrogenasas clase III, las poliol deshidrogenasas y las alcohol deshidrogenasas tetraméricas. Tanto Adh6p como Ycr105p estarían integradas dentro de la familia de las cinamil alcohol deshidrogenasas (CADH) junto con las cinamil alcohol deshidrogenasas descritas en plantas y otros enzimas descritos en bacteria.

## **CAPITULO II**

**Caracterización de Adh7p, una segunda alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* con actividad dependiente de NADP(H)**

# Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family

Carol Larroy, Xavier Parés and Josep A. Biosca

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

A new NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (the *YCR105W* gene product, ADHVII) has been identified in *Saccharomyces cerevisiae*. The enzyme has been purified to homogeneity and found to be a homodimer of 40 kDa subunits and a pI of 6.2–6.4. ADHVII shows a broad substrate specificity similar to the recently characterized ADHVI (64% identity), although they show some differences in kinetic properties. ADHVI and ADHVII are the

only members of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family in yeast. Simultaneous deletion of *ADH6* and *ADH7* was not lethal for the yeast. Both enzymes could participate in the synthesis of fusel alcohols, ligninolysis and NADP(H) homeostasis.

**Keywords:** cinnamyl alcohol dehydrogenase; fusel alcohols; NADP(H) homeostasis; ligninolysis.

The current version of the Yeast Proteome Database (<http://www.proteome.com>) lists approximately 260 oxidoreductases (160 of them have been characterized experimentally, and the rest predicted by sequence similarity or by other analysis) [1]. Our group is interested in the identification and characterization of novel alcohol dehydrogenase (ADH) gene products from *Saccharomyces cerevisiae* [2,3]. ADHs are oxidoreductases that catalyze the reversible oxidation of alcohols to aldehydes or ketones, with the corresponding reduction of NAD or NADP. ADHs constitute a large group of enzymes that can be subdivided into at least three distinct enzyme superfamilies: medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases, and iron-activated alcohol dehydrogenases [4,5]. The medium-chain dehydrogenase/reductase (MDR) superfamily consists of enzymes with a subunit size of approximately 350 residues, dimeric or tetrameric, with two domains in each subunit: one catalytic and one responsible for the binding of the nucleotide (NAD or NADP). Many enzymes of the MDR family have zinc in their active site, and have a sequence motif known as the zinc-containing ADH signature: GHEX<sub>2</sub>GX<sub>5</sub>(G,A)X<sub>2</sub>(I,V,A,C,S) [6]. According to the Pfam and COG databases [7,8], the *S. cerevisiae* genome codes for 21 potential MDR enzymes, with 12 of them showing the zinc ADH signature described above. These 12 zinc-containing yeast MDR include *ADH1*,

*ADH2*, *ADH3*, *ADH5*, *ADH6*, *SFA1*, *SOR1* and its 99% identical *YDL246C*, *XYL2*, *BDH1*, *YAL061W* and *YCR105W*. All these yeast MDRs, except *YCR105W* and *YAL061W*, have enzymatic activities experimentally determined. In the present study, we report the characterization of the *YCR105W* gene from *S. cerevisiae* as a new alcohol dehydrogenase. The gene was overexpressed in yeast cells and the corresponding protein product purified to homogeneity. The enzyme showed a wide substrate specificity, using NADP(H) as coenzyme. Given the similar substrate specificities and the sequence identity (64%) between the Ycr105p and the recently characterized ADHVI [3], we propose the name of *ADH7*, for the *YCR105W* gene and ADHVII for its coded protein. A null *adh7* yeast strain and a double mutant *adh6Δ adh7Δ* were constructed and their growths compared with a wild-type strain.

## MATERIALS AND METHODS

### Yeast and bacterial strains and plasmids

For cloning procedures we used the *Escherichia coli* XL1-Blue strain from Stratagene (Amsterdam, the Netherlands). The *S. cerevisiae* yeast strain S288C [9] was used to amplify the *YCR105W* gene by PCR. The protease deficient yeast BJ5459 (MATa, *ura3-52*, *trp1*, *lys2-801*, *leu2Δ1*, *his3Δ200*, *pep4::HIS3*, *prb1Δ1.6R*, *can1 GAL*) [10] was used to purify Ycr105p (ADHVII). The yeast strains BJ2168 (MATa, *leu2*, *trp1*, *ura3-52*, *prb1-1122*, *prc1-407*, *pep4-3*, *gal2*) [10] and BJ18 (MATa, *leu2*, *trp1*, *ura3-52*, *adh6::TRP1*, *prb1-1122*, *prc1-407*, *pep4-3*, *gal2*) [3] were used to delete the *YCR105W* gene.

The galactose-inducible *E. coli* yeast shuttle vector pYes2 (carrying the selective *URA3* marker and the upstream activating and promoter sequences of *GALI*) purchased from Invitrogen (Groningen, the Netherlands) was used to clone and overexpress the *YCR105W* gene in the yeast strain BJ5459. *E. coli* was grown at 37 °C in LB medium

Correspondence to J. A. Biosca, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (Barcelona), Spain.

Fax: + 34 93 5811264, Tel.: + 34 93 5813070,

E-mail: josep.biosca@uab.es

**Abbreviations:** ADH, alcohol dehydrogenase; MDR, medium-chain dehydrogenase/reductase; YPD, a rich medium (yeast extract, peptone and dextrose) used to grow yeast.

(Received 29 July 2002, revised 1 October 2002,

accepted 7 October 2002)

supplemented with 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of ampicillin to select for the desired plasmid constructs. The yeast cells were grown at 30 °C in minimal medium without uracil supplemented with 2% glucose or galactose to allow for the selection and induction of the yeast transformed with the pYes2 constructs. YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) was used to monitor the growth of the *adh7 $\Delta$*  and *adh6 $\Delta$ adh7 $\Delta$*  mutants.

### Cloning methods

All DNA manipulations were performed under standard conditions as described [11]. The *YCR105W* gene was amplified by PCR from the genomic DNA from the *S. cerevisiae* S288C strain using the oligonucleotides 5'GGCGAGCTCAAAATGCTTTACCCAGAAAAATT TGAGG-3' and 5'GGCTCTAGACTATTTATGGAA TTTCTTATC-3' that introduced *SacI* and *XbaI* sites (underlined), respectively, at their 5' ends. The PCR was started with a 'hot start' of 5 min at 95 °C that was followed by 30 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 55 °C and 1 min of extension at 72 °C, and a last cycle of 3 min extension at 72 °C. The PCR was performed in a 100- $\mu\text{L}$  volume that contained 1 unit of Vent DNA polymerase, 1  $\mu\text{M}$  of each primer, 200  $\mu\text{M}$  dNTPs and 3 mM  $\text{MgSO}_4$ .

The amplified fragment, purified from an agarose gel, was cloned into the *SacI/XbaI* sites of pYes2 and the resulting construct was called pY105. The construct was sequenced in both directions (Oswell DNA Services, Southampton, UK) to verify that there had been no mutations introduced by the PCR.

### Purification of ADHVII

BJ5459[pY105] cells over expressing ADHVII in galactose medium were chosen as starting material to purify ADHVII. They were grown in 2 L of minimal medium supplemented with 2% galactose as carbon source and all the auxotrophic requirements except for uracil (to maintain the selection for the plasmid). The cells were collected at an  $A_{595}$  of 4.3, resulting in 12.5 g, that were resuspended in one volume of 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 2 mM dithiothreitol (buffer A). The crude extract was prepared with glass beads of 0.5 mm diameter on a bead-beater (Biospec Products). One volume of buffer A was used to wash the glass beads and the total volume of homogenate was centrifuged at 29 000 g for 1 h. The supernatant was collected and dialysed against buffer A. The dialysed extract was applied to a DEAE Sepharose column (1.5  $\times$  13 cm) equilibrated in buffer A. The column was washed with 200 mL buffer A and the enzyme was eluted with a 0–0.3 M NaCl linear gradient in buffer A (300 mL). Fractions with activity were pooled, concentrated and desalted. The final 6.1 mL obtained from the DEAE chromatography were applied into a red Sepharose column (1.5  $\times$  15.5 cm) equilibrated in buffer A. After a wash with 200 mL buffer A, the enzyme was eluted with a linear gradient from 0 to 2 mM NADP in buffer A. The activity peak was collected and concentrated before being applied into a Superdex 200-HR (1  $\times$  30 cm) connected to a Waters HPLC system. Chromatography was performed in 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7, 0.15 M NaCl, 0.5 mM dithiothreitol and 20% glycerol at 0.4 mL $\cdot$ min $^{-1}$ .

This chromatography served also to estimate the enzyme molecular mass, using  $M_r$  markers from Sigma. The pure protein was stored at –20 °C in this buffer. Protein concentration was determined with the Bio-Rad reagent using bovine serum albumin as standard [12].

### Electrophoretic analysis

Denaturing SDS/PAGE was performed as described [13] in gels containing 12% acrylamide. Proteins were stained with silver nitrate. Native gel electrophoresis in 6% acrylamide was performed in Tris/boric/EDTA buffer, pH 8. Gels were incubated for 15 min on ice in 20 mM BisTris, pH 7, containing 1 mM NADPH for activity staining. A filter paper, soaked in 10 mM pentanal, 20 mM BisTris, pH 7, was placed covering the gels. After 5 min the filter paper was removed and the gel exposed to UV light. Disappearance of NADPH fluorescence, indicated aldehyde reduction [14,15].

### Enzyme activity

Kinetic parameters were determined at 25 °C in a Cary 400 spectrophotometer (Varian, USA). The reduction of aldehydes was assayed in 1 mL reaction mixture containing 33 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0, 0.2 mM NADPH and 1 mM aldehyde by measuring the decrease of absorption at 340 nm. Signal was recorded at 365 nm with cinnamaldehyde, veratraldehyde, and anisaldehyde and at 400 nm for coniferaldehyde, using previously reported molar extinction coefficients [3]. The oxidation of alcohols was performed in 0.1 M glycine, pH 10.0, 1.2 mM NADP and 10 mM of each alcohol, by measuring the rate of reduction of NADP at 340 nm. A wavelength of 365 nm was used for cinnamyl alcohol and of 400 nm for coniferyl alcohol oxidizing activities ( $\epsilon_{400} = 27.5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  at pH 10.0). One unit of activity corresponds to 1  $\mu\text{mol}$  of NADP(H) formed per min.

The steady-state kinetic parameters with their associated standard errors were determined by fitting the initial rate values to the Michaelis–Menten equation with the help of the computer program LEONORA [16].

### Construction of the *adh7 $\Delta$* and *adh6 $\Delta$ adh7 $\Delta$* mutant strains

Deletion of *YCR105W* was carried out by the one-step gene replacement [17] with the *URA3* gene as a marker. An internal coding region fragment of 443 bp was removed from the *YCR105W* gene in pY105 by digestion with *BamHI* and *BclI*. The *BamHI* fragment carrying the *URA3* marker from YDpU [18] was inserted into the *BamHI-BclI* sites after making blunt-ends. The resulting plasmidic construction was used as template to amplify by PCR the truncated gene carrying the *URA3* marker. The yeast strains BJ2168 and BJ18 were transformed with the truncated *ycr105w* gene by using the lithium acetate method [19]. The resulting mutant strains *adh7 $\Delta$*  and *adh6 $\Delta$ adh7 $\Delta$*  (named BJ05 and BJ1805, respectively) were allowed to grow on minimal medium plates supplemented with all the auxotrophic requirements except for uracil. All the resulting null mutants were verified by PCR from their genomic DNA as template.

## RESULTS AND DISCUSSION

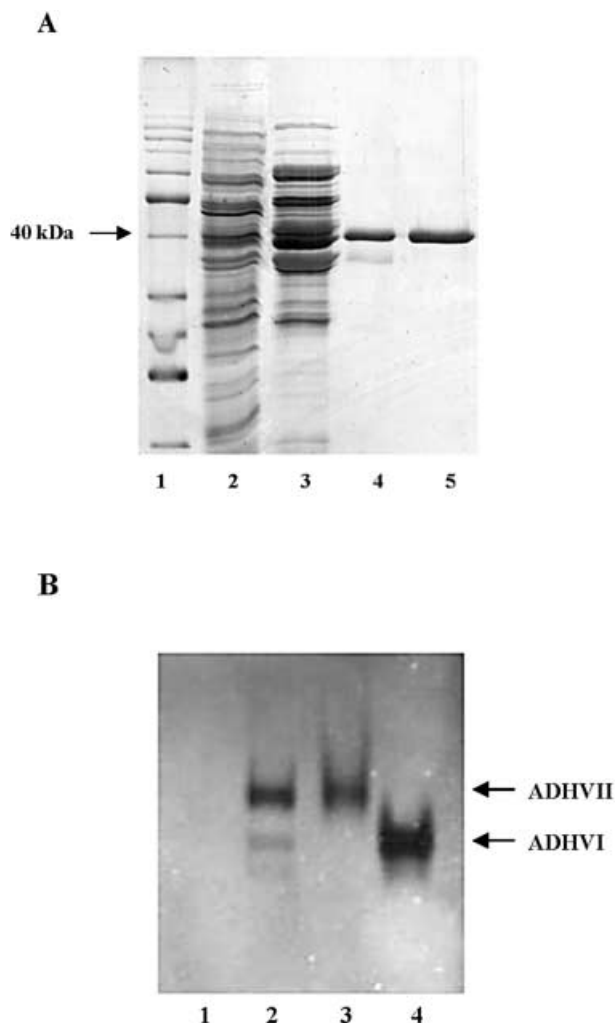
### Isolation and molecular properties of ADHVII from *S. cerevisiae*

In a previous report, we had characterized the yeast *YMR318C* open reading frame [3]. We expressed and characterized the corresponding protein, that resulted to be a MDR NADP-dependent alcohol dehydrogenase, of wide substrate specificity, named ADHVI. In that work, we noticed a 64% sequence identity between the *YMR318C* and *YCR105W* gene products, and we therefore assigned this last protein as a putative NADP(H) dependent ADH [3]. In order to confirm this assignation, we have now purified Ycr105p, which we have named ADHVII, and have studied its enzymatic activity. To have an abundance of initial material, we overexpressed ADHVII with the aid of a galactose-inducible vector in a protease-deficient yeast strain (BJ5459[pY105]). To detect ADHVII in the yeast homogenates, we measured the NADP(H)-dependent activities towards several alcohols and aldehydes, known substrates for ADHVI. The yeast extracts of the BJ5459[pY105] strain showed a five- to 10-fold increase in their NADP(H)-dependent specific activity towards several alcohols and aldehydes, compared with BJ5459[pYes2], used as a control strain. The reductase activity was about fivefold the dehydrogenase activity, cinnamaldehyde being one of the best substrates assayed. We therefore decided to use the cinnamaldehyde reductase reaction to follow the purification of ADHVII. Purification could be also followed by native PAGE and activity staining of the gel with pentanal and NADPH (Fig. 1). The enzyme was not detected on lysates from cells grown on glucose (Fig. 1B, lane 1), but its activity was clearly visible (upper band in lane 2) in the homogenates from yeast grown in galactose, because the plasmid containing *ADH7* was galactose inducible. Figure 1 also shows that ADHVI is induced by galactose (lower band in lane 2), as already reported [3]. The method used to purify ADHVII provided homogeneous material in a three-step protocol. The crude extract was fractionated with a DEAE Sepharose column followed by a red Sepharose and a gel filtration chromatography. Starting with 12.5 g of BJ5459[pY105] cells, 0.7 mg of pure ADHVII were obtained with a specific activity towards cinnamaldehyde of 90 U·mg<sup>-1</sup> (Table 1). The enzyme was stored at -20 °C with 20% glycerol and no loss of activity was observed over 1 month.

SDS/PAGE analysis of the purification of ADHVII and silver nitrate staining revealed one single band of 40 kDa in the fraction that eluted from the size exclusion chromatography (Fig. 1A). The native molecular mass of the enzyme, estimated by this last chromatography, was 81 kDa (data not shown). Consequently, the enzyme is a homodimer. Isoelectric focusing analysis in a polyacrylamide gel [20], followed by activity staining (with 100 mM pentanol and 1.2 mM NADP) revealed two major bands at pI 6.4 and pI 6.2 for the purified enzyme (results not shown).

### ADHVII as a member of the MDR family

Previous reports had classified *YCR105W* from *S. cerevisiae* as a putative member of the zinc-containing medium-chain alcohol dehydrogenase family through the presence of



**Fig. 1.** Electrophoretic analysis of ADHVII and yeast extracts. (A) SDS/PAGE of the different fractions obtained in each step of the yeast ADHVII purification. The proteins were detected by silver staining: (lane 1)  $M_r$  standards; (lane 2) crude extract, 10 µg protein; (lane 3) DEAE Sepharose chromatography, 10 µg protein; (lane 4) red Sepharose chromatography, 1 µg protein; (lane 5) Sephadex 200-HR chromatography, 1 µg protein. (B) Native gel electrophoresis (6% acrylamide) and reductase activity staining of yeast extracts and purified enzymes. The gel was incubated with 10 mM pentanal and 1 mM NADPH and activity bands were revealed as indicated in Materials and methods. (Lane 1) Crude extract of BJ5459[pY105] cells grown in 2% glucose, 5 µg protein; (lane 2) crude extract of BJ5459[pY105] cells grown in 2% galactose, 5 µg protein; (lane 3) pure ADHVII, 7 µg; (lane 4) pure ADHVI, obtained as previously described [3], 7 µg.

a specific signature (GHEX<sub>2</sub>GX<sub>5</sub>(G,A)X<sub>2</sub>(I,V,A,C,S) in its protein sequence [2,3,21,22]. A phylogenetic tree built from the zinc-containing MDR enzymes from yeast, had placed Ymr318p and Ycr105p in a subgroup of one of the three branches of the tree [2]. This grouping was consistent with the phylogenetic tree constructed from the MDRs identified in the genomes of *E. coli*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* and *C. elegans*, that placed *YCR105W* in a family of enzymes structurally related to cinnamyl alcohol dehydrogenases [22]. Figure 2 shows an alignment between the six yeast

**Table 1. Purification of *S. cerevisiae* ADHVII.** A 12.5 g sample of the protease-deficient BJ5459 yeast strain transformed with a multicopy plasmid containing *ADH7* under galactose control were used to purify ADHVII. Activity was measured with 1 mM cinnamaldehyde, 0.2 mM NADPH in 33 mM sodium phosphate, pH 7.0.

	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U·mg <sup>-1</sup> )	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	92.4	226	2.5	1	100
DEAE Sepharose	11.6	124	10.7	4.4	55
Red Sepharose	1.55	88.3	58.6	23.2	39
Superdex 200-HR	0.73	65	90.0	36.7	29

ADHs belonging to the same phylogenetic group [2], together with EgCAD2, a cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus gunii* [23] closely related to ADHVI and ADHVII. ADHVII has several features present in the zinc-binding MDRs: the putative ligands of the 'catalytic zinc', namely Cys46, His68 and Cys164; the mid chain pattern 'GX<sub>1-3</sub>GX<sub>1-3</sub>G' located in the nucleotide-binding region, represented by Gly188, Gly190 and Gly193 and the four putative ligands of the 'structural zinc' that some MDRs have: Cys100, Cys103, Cys106 and Cys114. It also exhibits Ser48 that has been implicated in the removal of the proton from the alcohol in the catalytic mechanism of several MDR ADHs, and Ser211 (corresponding to Ser223 in horse liver alcohol dehydrogenase) that determines the specificity for NADP(H) in contrast to Asp223, typical of NAD(H)-dependent ADHs (as ADHI, II, III and V). However, ADHVII (and ADHVI) exhibits an exchange at position 80 (in the numbering of horse liver ADH) that is Val in the multiple alignment of 47 members of the zinc-containing ADHs [24] but a Cys in ADHVII and Ser in ADHVI.

#### ADHVII substrate specificity and kinetic parameters

The substrate specificity of the pure enzyme was analyzed towards several substrates and the results were expressed as relative activity values (Table 2). In general, the substrate specificity was quite similar to the one found for ADHVI. Differences between ADHVI and ADHVII were in terms of their relative specificities towards linear and branched-chain alcohols and in their relative efficiency in the use of NADP(H) and NAD(H). Thus, ADHVI oxidized preferentially linear aliphatic alcohols like pentanol and hexanol, while ADHVII showed the same relative activity towards the linear and branched chain alcohols. Moreover, although ADHVII used NADP(H) as the preferred coenzyme, it could also use NAD(H). Thus, at 0.2 mM coenzyme, the reduction with NADH is 7% of that found for NADPH, in the presence of 1 mM cinnamaldehyde, while the activity found with NAD was 20% of the NADP-dependent activity in the presence of 1 mM cinnamyl alcohol. In contrast, ADHVI showed a much more strict specificity towards NADP(H) as activities with NAD(H) were less than 5% those measured with NADP(H) [3].

The kinetic parameters for ADHVII with the best substrates are given in Table 3. The highest catalytic efficiencies were observed for the reductive reactions, especially with the aliphatic aldehydes, pentanal and 3-methylbutanal. In contrast, the oxidative reactions were more than 100 times less efficient than the corresponding reductions, except for cinnamyl alcohol, towards which

the enzyme showed only a 14-fold decrease in efficiency compared with cinnamaldehyde (both measured at pH 7.0). These results and the specificity for NADP(H) suggest that the enzyme would act as an aldehyde reductase, rather than as an alcohol dehydrogenase. The catalytic efficiencies shown for the reductive reactions are similar to those found for ADHVI, although the  $k_{cat}$  and  $K_m$  values with ADHVII are approximately half the values found for ADHVI. The catalytic efficiencies towards the oxidation of cinnamyl alcohol and several aliphatic alcohols are much higher for ADHVII than for ADHVI [3].

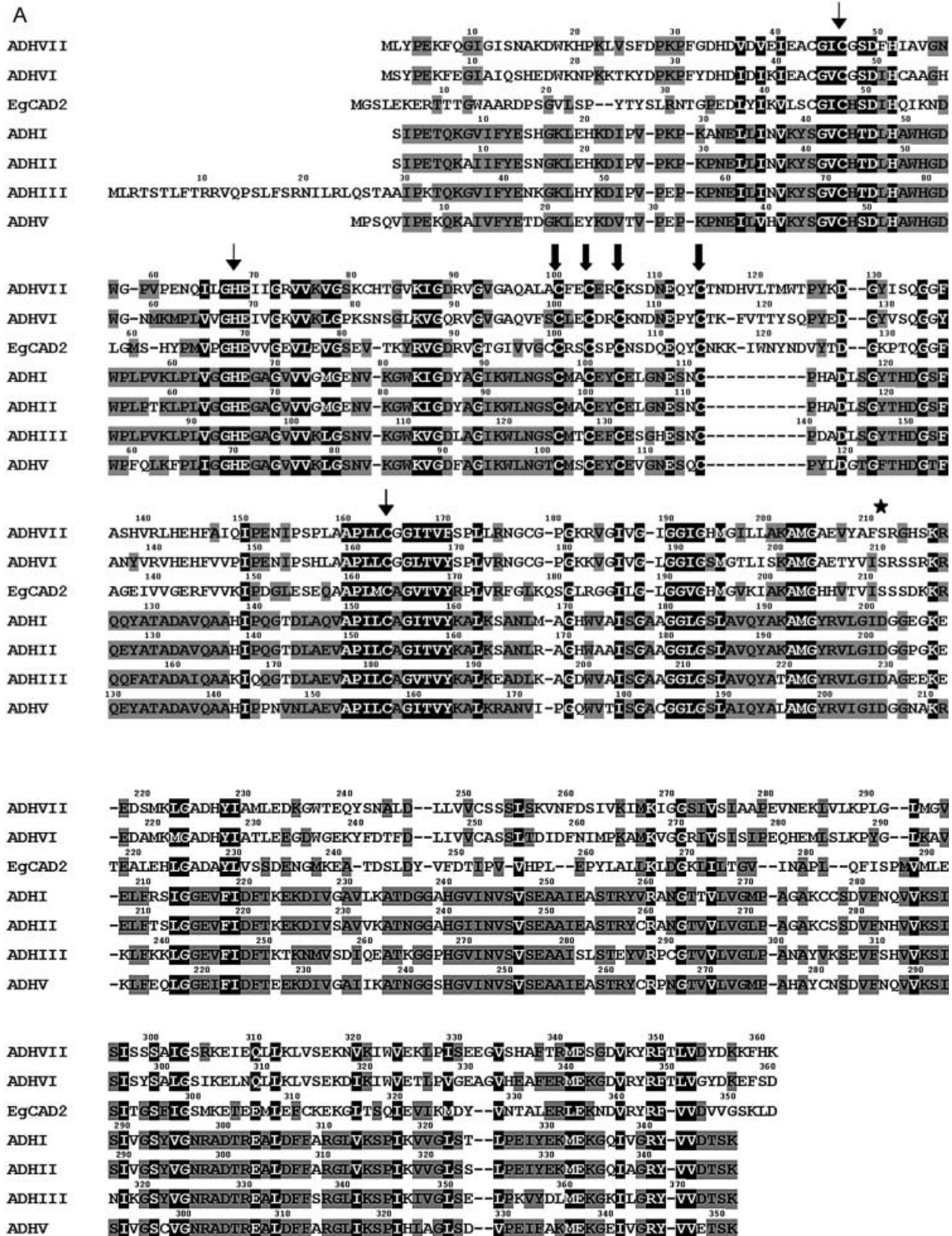
ADHVII appears to be different to the two NADP-dependent alcohol dehydrogenases from *S. cerevisiae* described recently [25,26]. Thus, it differs from the ADH isolated by Wales and Fewson [25] (a monomeric enzyme with an  $M_r$  of 46200) and with the bcADH purified by van Iersel *et al.* [26] (also monomeric with a  $M_r$  of 37000).

#### Growth of the *adh7Δ* and *adh6Δadh7Δ* mutant strains

An *ADH7* deleted mutant, *adh7Δ* (BJ05 strain), and a combined double mutant *adh6Δadh7Δ* (BJ1805 strain) were constructed from the isogenic strains BJ2168 and BJ18, respectively. The deletions of *ADH6* and *ADH7* were confirmed by PCR of the corresponding genomic DNA (Fig. 3). Specific amplifications at the *ADH6* and *ADH7* loci resulted in a gain of approximately 500 bp for the mutants due to the insertion of *TRP1* or *URA3*, which were bigger than the fragments removed. The *adh7Δ* and *adh6Δadh7Δ* mutant strains were viable and showed similar growth curves that their isogenic wild-type strain in YPD medium (data not shown).

#### Physiological function of ADHVI and ADHVII

The close structural and functional similarities between ADHVI and ADHVII suggest common physiological roles for both enzymes. Sequences showing a high degree of identity with ADHVI and ADHVII have been found by the recent 'Génolevures' project (<http://cbl.labri.fr/genolevures>) in several hemiascomycetes yeasts, suggesting a relevant function in these organisms. ADHVI and ADHVII are the two members of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family (a subdivision of the MDR superfamily [22]), in yeast. This enzymatic family probably participates in the lignin synthesis pathway in plants; however, yeast does not synthesize lignin. One possible function of ADHVI and ADHVII is a contribution to the maintenance of the proper NADP/NADPH balance.



**Fig. 2. Sequence alignment.** (A) An alignment of ADHVII and ADHVI from *Saccharomyces cerevisiae* and the close related cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus gumii* (EgCAD2), together with yeast ADHI, II, III and V was obtained with the CLUSTALW program. Thin arrows mark the aminoacids involved in the binding of the 'catalytic zinc'. The thick arrows point the Cys involved in the binding of the 'structural zinc'. Ser211 (★) (corresponding to Ser223 of horse liver ADHI) is characteristic of the NAD(P)-dependent medium-chain alcohol dehydrogenases. White residues on a black background indicate identical or similar residues present in the seven sequences. Black residues on a gray background indicate identical or similar residues present in at least four of the seven sequences. (B) Pairwise identities (upper line) and similarities (bottom line) between the aligned sequences.

B	ADHI	ADHII	ADHIII	ADHV	ADHVI	ADHVII	EgCAD2	Quaternary structure	Ref.
ADHI	100%							Tetrameric	5
ADHII	93%	100%						Tetrameric	5
	96%								
ADHIII	73%	73%	100%					Tetrameric	5
	82%	81%							
ADHV	75%	76%	66%	100%				Probably tetrameric	High identity to ADHI
	88%	88%	80%						
ADHVI	26%	25%	22%	27%	100%			Dimeric	3
	42%	41%	41%	43%					
ADHVII	26%	25%	23%	27%	64%	100%		Dimeric	This work
	43%	42%	40%	44%	80%				
EgCAD2	26%	26%	24%	26%	34%	32%	100%	Dimeric	23
	41%	41%	40%	42%	52%	51%			

Fig. 2. (Continued).

**Table 2. Substrate specificity of yeast ADHVII.** Reduction activities were measured with 1 mM substrate, 0.2 mM NADPH in 33 mM sodium phosphate, pH 7.0. The activity towards cinnamaldehyde was taken as 100%, corresponding to a specific activity of 90 U·mg<sup>-1</sup>. Oxidation activities were measured with 10 mM substrate, except for octanol (1 mM), 1.2 mM NADP in 0.1 M glycine at pH 10.0. The activity towards cinnamyl alcohol was taken as 100%, being the specific activity 46 U·mg<sup>-1</sup>. ND, not detected.

Reduction	Relative activity	Oxidation	Relative activity
Cinnamaldehyde	100	Cinnamyl alcohol	100
Phenylacetaldehyde	90	2-Phenylethanol	23
Benzaldehyde	45	Benzyl alcohol	78
Coniferaldehyde	15	Coniferyl alcohol	7
Veratraldehyde	79	Eugenol	ND
Anisaldehyde	83	Ethanol	2
Vanillin	84	Propanol	16
Propanal	24	Butanol	42
Butanal	19	Pentanol	46
Pentanal	153	Hexanol	45
Hexanal	88	Octanol	30
Heptanal	86	2-Methylpropanol	28
Octanal	59	(2S)-Methylbutanol	39
2-Methylpropanal	63	3-Methylbutanol	40
2-Methylbutanal	89	2-Propanol	ND
3-Methylbutanal	79	2-Butanol	1
<i>Trans</i> -2-nonenal	33	Butane-1,2-diol	2
Furfural	54	Butane-1,3-diol	5
Acetone	ND	Butane-1,4-diol	8

Although the NADPH formed, mostly by the pentose phosphate pathway [27], is used mainly in the biosynthesis of amino acids and lipids, other mechanisms can exist to adjust the ratio of phosphorylated coenzymes.

Given the substrate profile and catalytic efficiencies displayed, ADHVI and ADHVII could be involved in the formation of fusel alcohols. Thus, 2-methylpropanal, 2- and 3-methylbutanal and 2-phenylacetaldehyde are the immediate precursors of the corresponding alcohols ('fusel alcohols') and those aldehydes are among the best substrates of ADHVI and ADHVII. Fusel alcohols confer major organoleptic properties to alcoholic beverages, and are produced by *S. cerevisiae* (and other yeasts) during fermentation. Although the NAD(H)-dependent ADHs have been implicated in this route [28], probably with the aim of regenerating NAD, ADHVI and ADHVII could

also be involved but, in this case, with the purpose of regenerating NADP. The manipulation of the levels of ADHVI and ADHVII could be used by the fermentation industry to alter the organoleptic properties of the fermented beverages.

ADHVI and ADHVII are also active towards several compounds produced during ligninolysis, such as veratraldehyde and anisaldehyde. As the reduction of both aldehydes to their corresponding alcohols are metabolic activities that occur in this pathway [29,30], ADHVI and ADHVII could participate in this route.

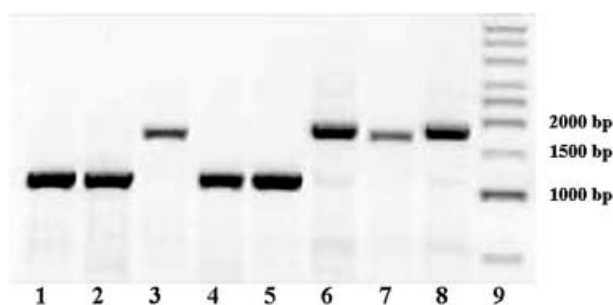
In summary, we have here demonstrated that the product of the *YCR105W* gene is ADHVII, an NADP-dependent alcohol dehydrogenase, similar to the product of the previously described *YMR318C* gene, ADHVI. These two enzymes are the only representatives of the cinnamyl alcohol



**Table 3. Kinetic parameters of yeast ADHVII.** Enzymatic activities were measured in 33 mM sodium phosphate, pH 7.0, with 0.2 mM NADPH for reduction, and 0.1 M glycine, pH 10.0, with 1.2 mM NADP for oxidation. NADP and NADPH kinetics were performed in 5 mM cinnamyl alcohol and 1 mM cinnamaldehyde, respectively. NS, not saturated.

Substrate	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{min}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ )
Cinnamaldehyde	0.043 ± 0.002	7913 ± 121	182094 ± 6359
Veratraldehyde	0.058 ± 0.005	6000 ± 137	103736 ± 7488
Pentanal	0.049 ± 0.005	11915 ± 353	242584 ± 19509
3-Methylbutanal	0.048 ± 0.006	9581 ± 285	201718 ± 19940
NADPH	0.011 ± 0.001		
NADH	NS		
Cinnamyl alcohol	0.08 ± 0.01	3404 ± 100	42371 ± 5170
Cinnamyl alcohol <sup>a</sup>	0.11 ± 0.01	1622 ± 35	13861 ± 1135
Phenylethanol	2.2 ± 0.3	1132 ± 32	517 ± 50
Pentanol	0.99 ± 0.03	918 ± 9	923 ± 26
3-Methylbutanol	1.61 ± 0.07	2866 ± 46	1776 ± 52
3-Methylbutanol <sup>a</sup>	4.6 ± 0.3	173 ± 4	37.5 ± 2.2
NADP	0.013 ± 0.001		

<sup>a</sup> Activity measured in 33 mM sodium phosphate, pH 7.0.



**Fig. 3. Analysis of the deletion of ADH6 and ADH7 genes.** Agarose gel of genomic DNA of the yeast strains BJ2168: *ADH6 ADH7*, lanes 1 and 2; BJ18: *adh6Δ ADH7*, lanes 3 and 4; BJ05: *ADH6 adh7Δ*, lanes 5 and 6; and BJ1805: *adh6Δ adh7Δ*, lanes 7 and 8; amplified by PCR with two pairs of oligonucleotides that hybridize at the *ADH6* and *ADH7* locus, respectively. (9)  $M_r$  standards.

dehydrogenase family in *S. cerevisiae*, and they could participate in ligninolysis and fusel alcohol synthesis pathways.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Dirección General de Enseñanza Superior y Científica (BMC2000-0132 and PB98-0855).

## REFERENCES

- Hodges, P.E., McKee, A.H.Z., Davis, B.P., Payne, W., E. & Garrels, J.I. (1999) The Yeast Proteome Database (YPD): a model for the organization and presentation of genome-wide functional data. *Nucleic Acids Res.* **27**, 69–75.
- González, E., Fernández, M.R., Larroy, C., Solà, L.I., Pericás, M., Parés, X. & Biosca, J.A. (2000) Characterization of a (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* *YAL060W* gene product. Disruption and induction of the gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 35876–35885.
- Larroy, C., Fernández, M.R., González, E., Parés, X. & Biosca, J.A. (2002) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *YMR318C* (*ADH6*) gene product as a broad specificity NADPH-

dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. *Biochem. J.* **361**, 163–172.

- Jörnvall, H., Persson, B. & Jeffery, J. (1987) Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **167**, 195–201.
- Reid, M.F. & Fewson, C.A. (1994) Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**, 13–56.
- Persson, B., Hallborn, J., Walfridsson, M., Hahn-Hägerdal, B., Keränen, S., Penttilä, M. & Jörnvall, H. (1993) Dual relationships of xylitol and alcohol dehydrogenases in families of two protein types. *FEBS Lett.* **324**, 9–14.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Etwiler, L., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Howe, K.L., Marshall, M. & Sonnhammer, E.L. (2002) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **30**, 276–280.
- Tatusov, R.L., Natale, D.A., Garkavtsev, I.V., Tatusova, T.A., Shankavaram, U.T., Rao, B.S., Kiryutin, B., Galperin, M.Y., Fedorova, N.D. & Koonin, E.V. (2001) The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res.* **29**, 22–28.
- Winston, F., Dollard, C. & Ricupero-Hovasse, S.L. (1995) Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* **11**, 53–55.
- Jones, E.W. (1991) Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **194**, 428–453.
- Sambrook, J., Frisch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Seymour, J.L. & Lazarus, R.A. (1989) Native gel activity stain and preparative electrophoretic method for the detection and purification of pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *Anal. Biochem.* **178**, 243–247.
- van Iersel, M.F., Brouwer-Post, E., Rombouts, F.M. & Abee, T. (2000) Influence of yeast immobilization on fermentation and aldehyde reduction during the production of alcohol-free beer. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 602–607.
- Cornish-Bowden, A. (1995) *Analysis of Enzyme Kinetic Data*, 1st edn. Oxford University Press, New York.

17. Rothstein, R.J. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101**, 202–211.
18. Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P.A. & Hilger, F. (1991) The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**, 475–477.
19. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163–168.
20. Robertson, E.F., Dannelly, H.K., Malloy, P.J. & Reeves, H.C. (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* **167**, 290–294.
21. Jörnvall, H., Höög, J.O. & Persson, B. (1999) SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett.* **445**, 261–264.
22. Jörnvall, H., Shafqat, J. & Persson, B. (2001) Variations and constant patterns in eukaryotic MDR enzymes. Conclusions from novel structures and characterized genomes. *Chem. Biol. Interact.* **130–132**, 491–498.
23. Grima-Pettenati, J., Feuillet, C., Goffner, D., Borderies, G. & Boudet, A.M. (1993) Molecular cloning and expression of a *Eucalyptus gunnii* cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Mol. Biol.* **21**, 1085–1095.
24. Sun, H.W. & Plapp, B.V. (1992) Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family. *J. Mol. Evol.* **34**, 522–535.
25. Wales, M.R. & Fewson, C.A. (1994) NADP-dependent alcohol dehydrogenases in bacteria and yeast: purification and partial characterization of the enzymes from *Acinetobacter calcoaceticus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **140**, 173–183.
26. van Iersel, M.F., Eppink, M.H., Van Berkel, W.J., Rombouts, F.M. & Abee, T. (1997) Purification and characterization of a novel NADP-dependent branched-chain alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4079–4082.
27. Gancedo, C. & Serrano, R. (1989) *Energy-Yielding Metabolism in The Yeasts*, Vol. 3, 2nd edn. (Rose, A.H. & Harrison, J.S., eds), pp. 205–259. Academic Press, New York.
28. Boulton, C. & Quain, D. (2001) *Brewing Yeast and Fermentation*, 1st edn, pp. 117–121. Blackwell Science Ltd, Oxford.
29. Delneri, D., Gardner, D.C., Bruschi, C.V. & Oliver, S.G. (1999) Disruption of seven hypothetical aryl alcohol dehydrogenase genes from *Saccharomyces cerevisiae* and construction of a multiple knock-out strain. *Yeast* **15**, 1681–1689.
30. Huang, Z., Dostal, L. & Rosazza, J.P. (1993) Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2244–2250.

**Resumen de los resultados presentados en el artículo ‘Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family’. *Eur. J. Biochem.* (2002), 269, 5738-5745.**

En este trabajo se presenta la caracterización de Adh7p, la proteína codificada por el gen *YCR105W*, que comparte un 64 % de identidad con Adh6p. La purificación se realizó a partir de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que sobreexpresaba el enzima. El producto final resultó ser una ADH homodimérica con subunidades de 40 kDa y con actividad alcohol deshidrogenasa NADP(H)-dependiente.

Como se ha descrito en el Capítulo I, se utilizó el motivo característico de las alcohol deshidrogenasas de cadena media capaces de unir Zn para identificar ORFs que codificaran por miembros de la familia MDR. En la Figura 2A se presenta un alineamiento de secuencias de las 7 ADHs descritas en levadura (incluida Adh7p descrita en este trabajo) y un enzima representante de la familia de las cinamil alcohol deshidrogenasas (EgCAD2) ya que tanto Adh6p como Adh7p presentan una mayor identidad de secuencia con los enzimas de la familia de las CADH que con los enzimas de la familia de las ADHs de levadura (Figura 2B). En este alineamiento se identifican los motivos característicos de las alcohol deshidrogenasas de cadena media. Todas las secuencias presentan los aminoácidos requeridos para coordinar el Zn catalítico y el Zn estructural. Además se remarca la posición 223 que para enzimas activas con  $\text{NAD}^+$  presenta un residuo aspártico o glutámico y para enzimas dependientes de  $\text{NADP}^+$  este residuo suele ser una serina. Tras la identificación, purificación y caracterización de Adh6p (Capítulo I) se decidió continuar explorando las ADH de cadena media con actividad dependiente de NADP(H).

Se sobreexpresó el gen *YCR105W* en la cepa BJ5459, deficiente en proteasas. Se utilizó el vector pYes2 inducible por galactosa. Utilizando los sustratos con los que Adh6p resultó activa, se identificó el producto del gen *YCR105W* como una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP(H) y siguiendo la nomenclatura de *Saccharomyces cerevisiae* se la denominó Adh7p.

Para llegar a una total homogeneidad en la purificación de Adh7p se utilizaron varias etapas cromatográficas. El extracto crudo de levadura obtenido mediante rotura mecánica con bolas de vidrio, fue centrifugado para recuperar la parte soluble. El lisado fue cargado en una DEAE-Sepharose de la que se obtubieron dos picos con actividad cinamaldehído reductasa: un

primer pico que correspondió a Adh6p y un segundo pico correspondió a Adh7p. El pico de proteína de interés fue cargado en una Red-Sepharose y eluido con un gradiente creciente de NADP<sup>+</sup>. Para mejorar la actividad específica de la proteína y eliminar el exceso de NADP<sup>+</sup> procedente de la anterior cromatografía se sometió la muestra a una etapa de HPLC de gel filtración con la columna Superdex 200-HR.

En la Tabla 1 se encuentran resumidas las etapas de la purificación. La proteína Adh7p presentó una actividad específica de 90 U/mg para el cinamaldehído y NADPH, y se alcanzó un grado de pureza de 37 veces. Tal como se observa en la electroforesis por SDS-PAGE (Figura 1), se llegó a homogeneidad en la purificación. La Figura 1 B confirma la pureza de Adh7p ya que se consiguió separar completamente de Adh6p.

Con la proteína Adh7p purificada se determinó la especificidad de sustrato. En la Tabla 2 se puede ver como, en general, los resultados obtenidos son muy similares a los previamente descritos para Adh6p ya que ambas enzimas son capaces de reducir aldehídos aromáticos, lineales o ramificados a sus correspondientes alcoholes, y viceversa. Además, la reducción de aldehídos resultó más eficiente que la oxidación de sus correspondientes alcoholes (hasta un factor de 100).

Mediante la técnica de remplazamiento de gen en un único paso, se construyeron las cepas mutantes *adh7Δ* y *adh6Δadh7Δ* isogénicas a la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* BJ2168. Las deleciones se confirmaron mediante PCR del DNA genómico ya que la inserción de los marcadores de deleción *TRP1* y *URA3* en los genes *ADH6* y *ADH7* correspondientes, generaba una ganancia en el tamaño del producto amplificado (Figura 3). Las cepas mutantes *adh7Δ* y *adh6Δadh7Δ* resultaron viables y su crecimiento en medio rico fue similar al de la cepa silvestre.

## **CAPITULO III**

**Estudio cristalográfico de la estructura tridimensional de la  
Adh6p de *Saccharomyces cerevisiae***

# ***Apo* and *Holo* Structures of an NADP(H)-dependent Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae***

**Eva Valencia<sup>1</sup>, Carolina Larroy<sup>2</sup>, Wendy F. Ochoa<sup>1</sup>, Xavier Parés<sup>2</sup>  
Ignacio Fita<sup>1</sup> and Josep A. Biosca<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>*Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC) Jordi-Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain*

<sup>2</sup>*Department of Biochemistry and Molecular Biology Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain*

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

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** yeast ADH; crystal structure; cinnamyl alcohol dehydrogenase; NADP(H); half-of-the-sites reactivity

\*Corresponding author

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

E-mail address of the corresponding author: josep.biosca@uab.es

## **Introduction**

Enzymes with alcohol dehydrogenase activity are widespread among several superfamilies, in particular medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR), from the oxidoreductases class. The MDR superfamily, with over one thousand entries in the protein sequence databases (see, for instance, entrance 00107 in Pfam Protein Families Database),<sup>1</sup> includes enzymes that participate in a large diversity of physiological functions such as alcoholic fermentation, detoxification of aldehydes and alcohols, biosynthesis of lignin, protection

from oxidative damage or biosynthesis of fatty acids. MDR enzymes, detected in most of the genome projects, have a subunit size of about 350 residues and are grouped in eight protein families, four of them containing zinc:<sup>2-4</sup> (i) dimeric alcohol dehydrogenases (ADH); (ii) tetrameric alcohol dehydrogenases (YADH); (iii) polyol dehydrogenases (PDH); and (iv) cinnamyl alcohol dehydrogenases (CAD). Crystal structures of several members from the ADH, YADH and PDH families are known, but no structure from the CAD family has yet been reported.

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

*Saccharomyces cerevisiae* contains in its genome 12 MDRs with the zinc-binding signature: Sfa1p (which belongs to the ADH family), Adh1p, Adh2p, Adh3p and Adh5p (YADH family), Sor1p, Sor2p, Xyl2p, Bdh1p and Yal061p (PDH family) and, finally, Adh6p and Adh7p, which share over 60% sequence identity and have been characterized recently as belonging to the CAD family, by their primary structure and enzymatic activities (Figure 1).<sup>10,11</sup> ScAdh6p and ScAdh7p use NADP(H) as a cofactor and display a broad substrate specificity with aromatic and aliphatic (linear and branched-chain) primary alcohols and aldehydes, and high activity with cinnamyl alcohol, cinnamyl aldehyde and their derivatives. Most likely, ScAdh6p is not involved in lignin biosynthesis, since this is a pathway not demonstrated in *S. cerevisiae*. Furthermore, the enzyme shows little activity with sinapylaldehyde or coniferylaldehyde (two lignin precursors).<sup>10</sup> However, ScAdh6p might contribute to lignin degradation, as it can act on products

derived from the biodegradation of lignin, such as veratraldehyde and anisaldehyde.<sup>10</sup> In any case, ScAdh6p exhibits a high level of sequence similarity with some plant CAD enzymes involved in lignification, i.e. 53% with CAD2 from *Eucalyptus gunnii*.<sup>12</sup>

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

## Results and Discussion

### Overall ScAdh6p structure

The structures of three ScAdh6p crystals, two trigonal and one monoclinic, have been determined and refined at a resolution of about 3.0 Å (Table 1). The molecular structure corresponding to the trigonal crystals without NADP<sup>+</sup> added comprises all the amino acid residues of one ScAdh6p subunit, Met1-Asp360, two zinc ions and two phosphate (or sulphate) groups (Figures 2(a) and 3(a)). In this trigonal structure, the loops Cys250-Asn260 and Ile277-Lys292 presented alternative conformations, each with about 50% occupancy. In the trigonal crystals obtained by co-crystallization with NADP<sup>+</sup>, the ScAdh6p structure is very similar, including the alternative conformations in the two loops, with a root-mean-square deviation (r.m.s.d.) for all the C<sup>α</sup> atoms of 0.32 Å. However, in these crystals an NADP<sup>+</sup> molecule, with about 50% occupancy, was found instead of the phosphate groups (Figure 3(b)). The model corresponding to the monoclinic crystal comprises all the amino acid residues and the two zinc atoms from each of the two subunits found in the asymmetric unit (Table 1). In these monoclinic crystals, the cofactor binding site of one subunit was empty, while the site in the second subunit contained a strong density that was suited for an NADP<sup>+</sup> molecule, except that it lacked the region corresponding to the nicotinamide moiety (Figure 3(c)). Similarly, a phospho-ADP-ribose molecule has been found in

**Figure 1.** Phylogenetic tree of CADs. The 74 sequences more similar to ScAdh6p (as detected by BLASTP with E-values below 10<sup>-39</sup>) were aligned by using the CLUSTAL W program.<sup>45</sup> These sequences contained the sequence pattern for CADs derived by Nordling *et al.*,<sup>2</sup> except 12 bacterial proteins that substitute the first Cys of the pattern by an Ala/Ser residue. Phylogenetic analysis was carried out by the neighbour-joining method using the program MEGA2,<sup>46</sup> with 10,000 bootstrap samplings. Plant enzymes are distributed in two clusters: one containing enzymes involved in lignin synthesis (Plant I), such as CAD2 from *Eucalyptus gunnii*,<sup>12</sup> and the second containing ELI3 proteins and enzymes annotated either as cinnamyl alcohol dehydrogenases, or as mannitol dehydrogenases (such as MTD from *Apium graveolens*<sup>9</sup>) (Plant II). ScAdh6p is in one cluster with four more fungi enzymes (Fungi). All remaining proteins of the tree are from bacteria, except Q9U1F0, from *Leishmania major*, and Q8TTM5, from the Archaea *Methanosarcina acetivorans* (Bacteria\*). The sequences are named by their accession numbers or by their Swissprot or TrEMBL abbreviations.

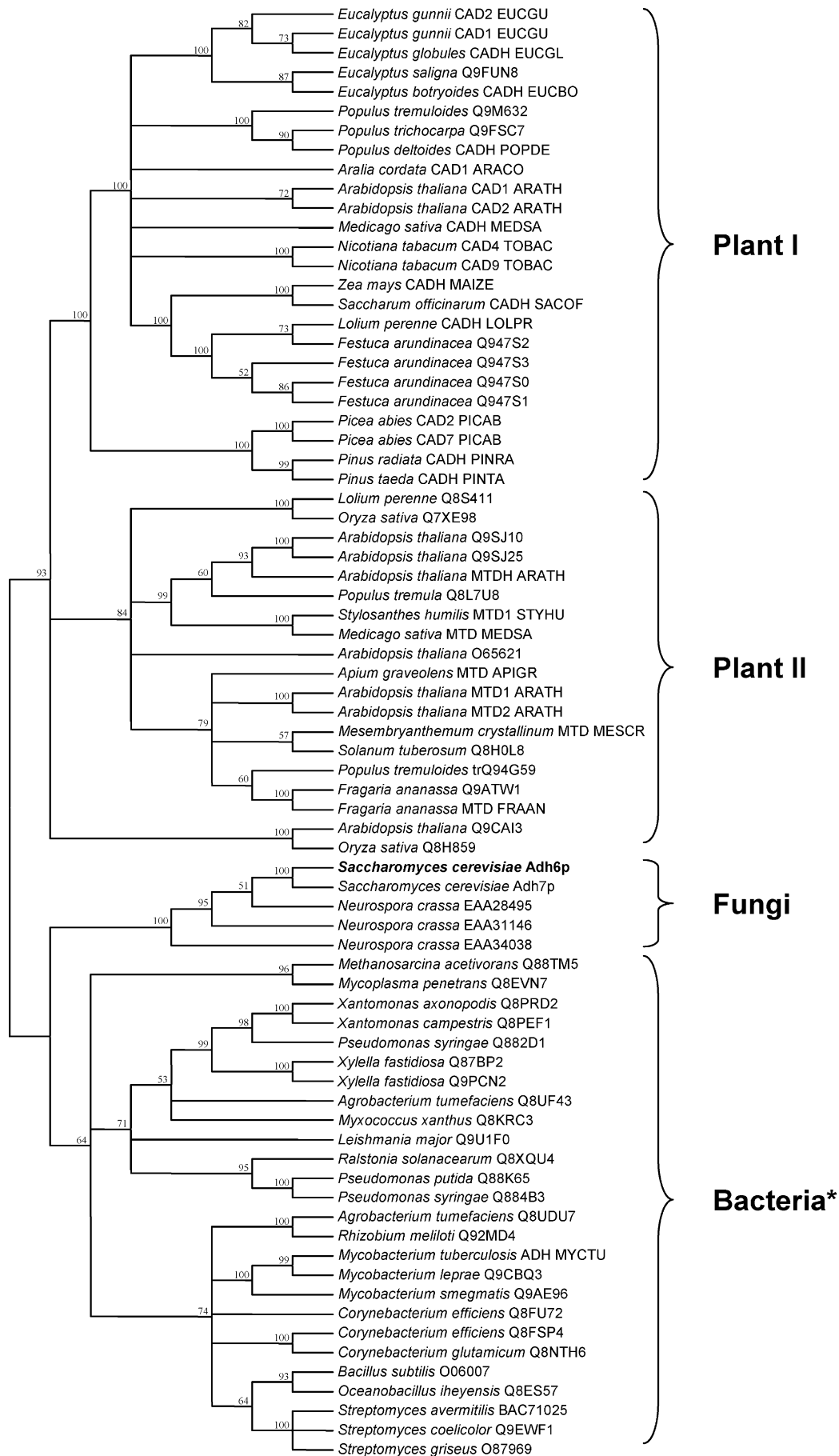
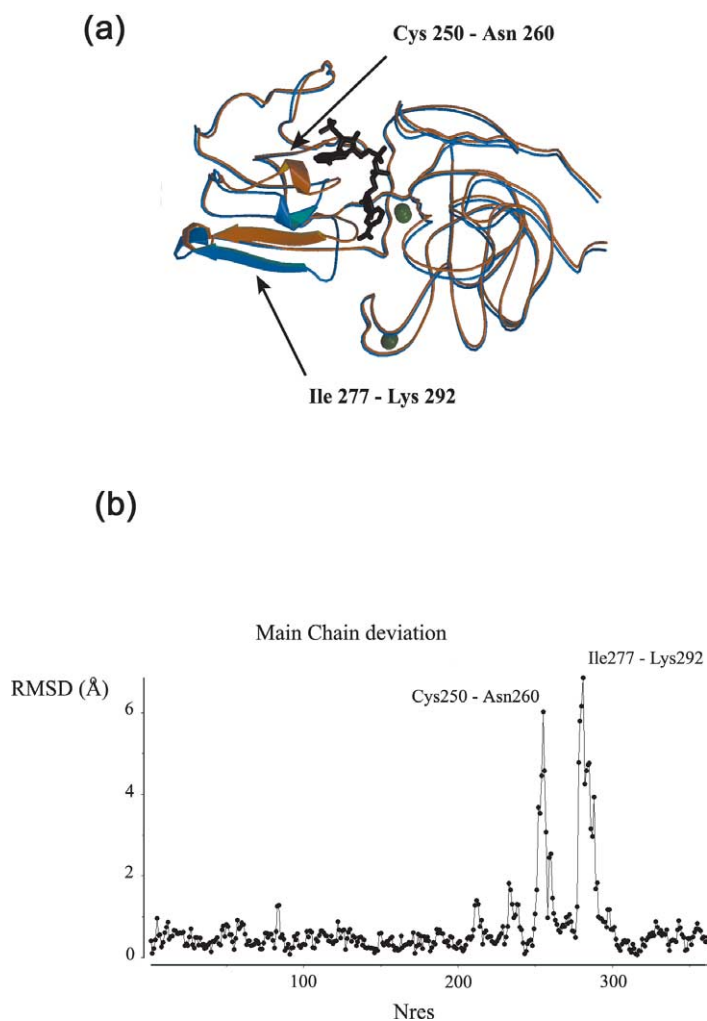


Figure 1 (legend opposite)





**Figure 2.** *Apo* and *holo* conformations of ScAdh6p. (a) Superimposition of the ScAdh6p subunits in the apo (blue) and the holo (brown) conformations. Zinc ions are represented as green spheres and the NADP<sup>+</sup> cofactor found in the holo monomer is displayed. Secondary structural elements are indicated explicitly only for the two mobile loops Cys250-Asn260 and Ile277-Lys292. (b) r.m.s.d. between main-chain C<sup>α</sup> atoms of the ScAdh6p subunits in the apo and holo conformations. The absence of significant domain movements between both conformations and the large displacement of the mobile loops is evident in (a) and (b).

the active site of the crystal structure of spinach acetoxyacid isomerase,<sup>13</sup> suggesting the hydrolysis of the nicotinamide group of NADP<sup>+</sup> during the purification and/or crystallization procedures.

The C<sup>α</sup> superimposition of the two crystallographically independent subunits found in the monoclinic crystals, with an r.m.s.d. of 1.19 Å, indicated significant differences only for loops Cys250-Asn260 and Ile277-Lys292, with displacements as large as 6.0 Å and 6.9 Å for residues 255 and 280, respectively (Figure 2(b)). The r.m.s.d. decreases to 0.36 Å when the two loops are excluded from the superimposition, which reflects the fact that the relative disposition of domains remains unchanged between both subunits. In the subunit containing the phospho-ADP-ribose moiety, the two loops close the binding site, interacting with the adenine base, the pyrophosphate group and the two ribose molecules (Figure 2(a)). Therefore, due to the loops and to the cofactor site occupancy differences, the ScAdh6p molecule in the monoclinic crystal can be considered a structural heterodimer in which subunits have adopted the *apo* (A) and *holo* (H) conformations, respectively (Figure 4(a)). Furthermore, the disposition of loops in the A and H conformations coincide with the alternative

conformations, seen in the trigonal crystals, for the same two loops. Therefore, the structure in the trigonal crystal must consist of a mixture, in about equal amounts, of subunits with the A and H conformations. For an ScAdh6p molecule, having the two subunits in the A conformation appears sterically unfeasible, because loop Ile277-Lys292 would clash with the same loop in the second subunit (Figure 4(b)). Consequently, also in the trigonal crystals, ScAdh6p molecules should be present mainly as structural heterodimers of subunits in the A and H conformations. In the trigonal crystals with NADP<sup>+</sup> added, the subunit in the H conformation would be the one containing the NADP<sup>+</sup> cofactor. In the trigonal crystals without NADP<sup>+</sup> added, the subunit in the H conformation could be stabilized by the presence of the phosphate groups. If both subunits in a ScAdh6p molecule were to adopt the H conformation, some of the hydrogen bonds between subunits, seen in the heterodimer, would break apart (Figure 4(c)). Therefore, structural heterodimers, with one subunit in the A and one subunit in the H conformation appear to be the most stable situation for ScAdh6p molecules. This tendency towards molecular asymmetry would favour cofactor binding to only one of the subunits in the dimer, which

**Table 1.** Data and model refinement statistics

	Data collection statistics		
	Trigonal		Monoclinic
	SAD ScAdh6p	ScAdh6p/NADP <sup>+</sup>	ScAdh6p
<b>A. Data collection statistics</b>			
Space group	<i>P</i> <sub>3</sub> <sub>2</sub> <sub>1</sub>	<i>P</i> <sub>3</sub> <sub>2</sub> <sub>1</sub>	<i>C</i> <sub>2</sub>
Cell parameters (°)			
<i>a</i> (Å)	101.9	102.1	234.9
<i>b</i> (Å)	101.9	102.1	100.3
<i>c</i> (Å)	149.15	149.72	52.4
$\gamma$ (deg.)	120.0	120.0	
$\beta$ (deg.)			92.2
Resolution range (Å) <sup>a</sup>	22.0–3.1	29.0–3.0	29.0–3.0
Unique reflections	15,485	18,395	24,484
$R_{\text{sym}}^b$ (%)	12.2 (25.0)	15.1 (30.0)	5.0 (20.0)
Completeness (%)	96.7 (96.0)	99.5 (99.9)	98.8 (93.4)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	11.5 (1.0)	12.5 (1.0)	8.0 (1.0)
<b>B. Data refinement statistics</b>			
$R_{\text{work}}^c$ (%)	26.2	26.5	22.7
$R_{\text{free}}^d$ (%)	31.9	29.6	27.9
Solvent content (% v/v)	78	78	68
Asymmetric unit content			
Protein subunits	1	1	2
Protein residues	360	360	2 × 360
Zn <sup>2+</sup>	2	2	2 × 2
NADP <sup>+</sup>	(?) <sup>e</sup>	0.5 <sup>f</sup>	–
Phospho-ADP-ribose	–	–	1
PO <sub>4</sub> <sup>–</sup>	2 × 0.5 <sup>e</sup>	–	–
Geometry deviation:			
r.m.s.d. bonds (Å)	0.008	0.008	0.008
r.m.s.d. angles (deg.)	1.5	1.4	1.4

<sup>a</sup> Values in parentheses correspond to data in the highest-resolution shell.

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

<sup>c</sup>  $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$ , where  $F_{\text{obs}}$  and  $F_{\text{calc}}$  are the observed and calculated structure factors, respectively.

<sup>d</sup>  $R_{\text{free}}$  same definition as  $R_{\text{work}}$  for a cross-validation set of 5% of the reflections.

<sup>e</sup> A low occupancy of the nucleotide seems still present in these crystals (Figure 3).

<sup>f</sup> The partial occupancy is likely reflecting the presence of structural heterodimers with an even presence of subunits in the *apo* and *holo* conformations (see the text).

suggests that the first molecule of the cofactor would bind much more strongly than the second. These features are compatible with a half-of-the-sites reactivity mechanism, a term coined to describe multimeric enzymes that react at only half of their active sites.<sup>14</sup>

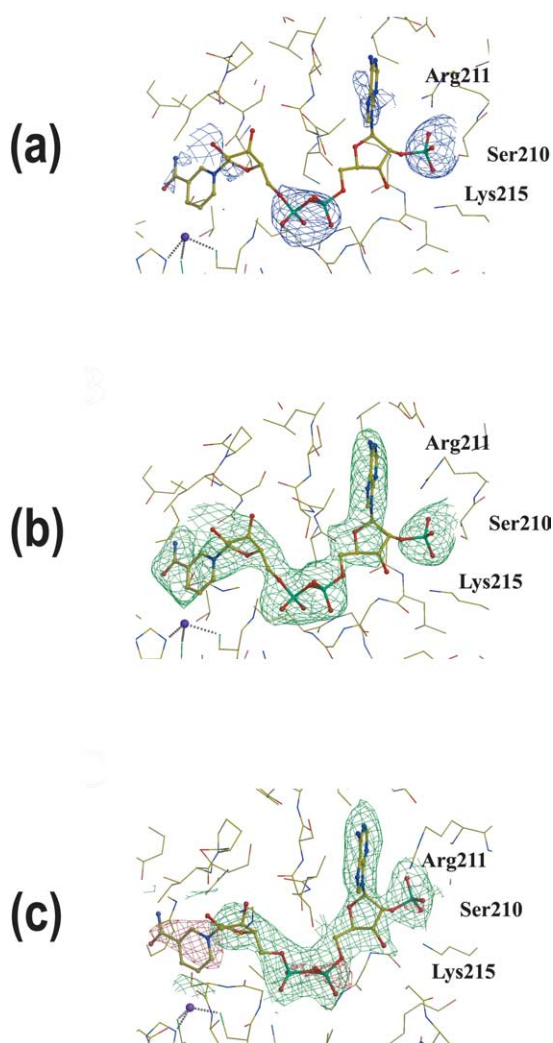
Loops Cys250-Asn260 and Ile277-Lys292 are involved in crystal packing interactions in the monoclinic crystals, but not in the trigonal crystals (Figure 5). This, together with the absence of domain displacements between the A and H conformations, allows the coincidence of the crystallographic 2-fold axis with the approximate binary axis of the heterodimer and explains the disorder found in the trigonal crystals.

Despite the low level of sequence identity (<22%) with all protein structures available, ScAdh6p subunits present a topology similar to that of other MDRs (Figure 6) with a catalytic domain (residues Met1-Cys163 and Leu301-Asp360) and a coenzyme-binding domain (residues Gly164-Ala300) separated by a deep cleft (Figure 2(a)). Superimposition of the ScAdh6p subunit in the

H conformation with the corresponding structures of horse liver alcohol dehydrogenase (PDB code 2OHX) and *Clostridium beijerinckii* secondary alcohol dehydrogenase (PDB code 1KEV) gave, in both cases, an r.m.s.d. value of about 2.8 Å for 330 equivalent residues.<sup>15</sup> The superimposition of the A conformations of ScAdh6p and ketose reductase from *Baemissia argentifolii* (PDB code 1E3J), gave an r.m.s.d. value of 2.5 Å. However, contrary to what has been found for ScAdh6p, coenzyme binding induces significant interdomain movements in many MDR structures,<sup>16–18</sup> though this is not always the case.<sup>19</sup> Sequence alignments (Figure 6) show an insertion of six residues (from Pro124 to Tyr129 in ScAdh6p), which might confer rigidity to ScAdh6p.

### Cofactor binding and specificity

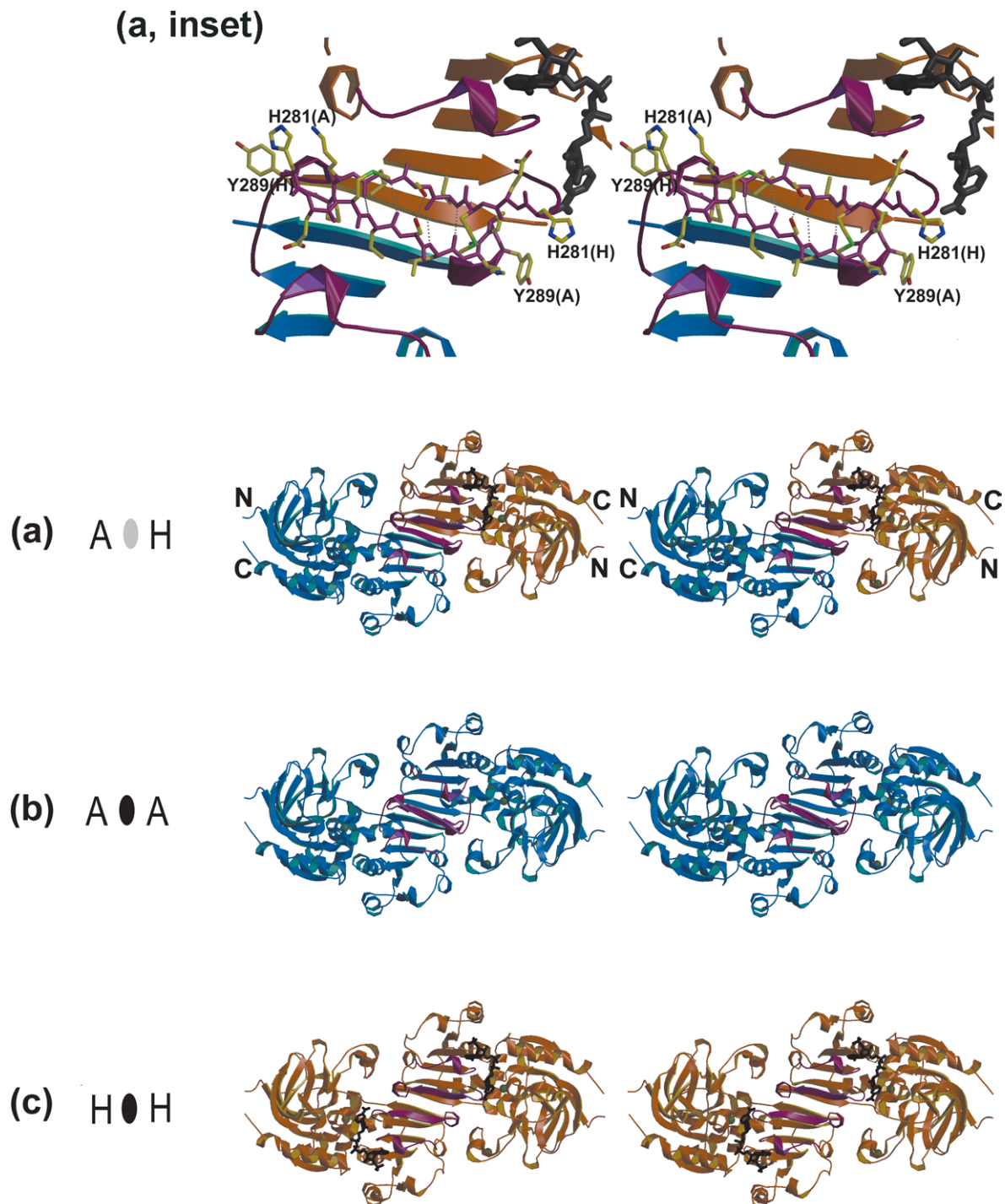
An NADP<sup>+</sup> and a phospho-ADP-ribose molecules were found, as indicated before, bound to ScAdh6p in the trigonal and monoclinic crystals, respectively. Both molecules show extended



**Figure 3.** Electron density for the ScAdh6p cofactor binding site. The ScAdh6p cofactor binding site as found: (a) in the trigonal crystals without NADP<sup>+</sup> added; (b) in the trigonal crystals with NADP<sup>+</sup> added; and (c) in the subunit having the holo conformation from the monoclinic crystals. In the three cases, a complete NADP<sup>+</sup> cofactor is displayed with ball-and-sticks coloured according to the atom type. Non-protein density is displayed using a chicken-wire representation. Coordination of the catalytic zinc ion, depicted as a blue sphere, is indicated with broken lines. The presence of phosphate (or sulphate) groups together with a low occupancy of the whole cofactor can be assumed in (a). Density corresponds well with an NADP<sup>+</sup> molecule having about 50% occupancy in the trigonal crystals with NADP<sup>+</sup> added (b). Density in an omit map (green) is absent for the NADP(H) moiety corresponding to the nicotinamide group, and density in this region becomes negative (red) in an  $F_o - F_c$  map when the nicotinamide group is included in the model (c). Therefore, a phospho-ADP-ribose, likely derived from an NADP<sup>+</sup> molecule by hydrolysis of the nicotinamide group, appears to occupy the cofactor binding site of the *holo* subunit in the monoclinic crystals (see the text). In the three crystal structures, density is found in the location corresponding to the terminal phosphate group when the NADP<sup>+</sup> is bound. Instead, no density is found in the corresponding location in the *apo* subunit of the monoclinic crystal (not shown). Residues Ser210, Arg211 and Lys215, which interact with the terminal phosphate group, are labelled.

conformations, with the two ribose moieties likely having C2'-*endo* sugar ring puckerings, as commonly found in holo MDR structures.<sup>20–21</sup> Cofactor binding is defined by an extensive array of polar and hydrophobic interactions with a major participation of residues from the two mobile loops Cys250-Asn260 and Ile277-Lys292 (Figure 6). Loop Cys250-Asn260 interacts exclusively with the phospho-ADP-ribose moiety. In turn, loop Ile277-Lys292 interacts mostly with the nicotinamide group that, similar to other MDRs, is close to the catalytic zinc ion and to the sulfur atom of the conserved residue Cys163.<sup>18</sup> The direct interaction of the mobile loops with the cofactor might facilitate the dissociation of products, a frequently rate-limiting step in MDR enzymes.<sup>22</sup>

NAD(H)-dependent MDRs have a conserved negatively charged residue at the C-terminal end of the  $\beta$ B strand,<sup>23</sup> which forms hydrogen bonds with the 2' and 3'-hydroxyl groups of the adenosine ribose from the coenzyme. In contrast, NADP(H)-dependent enzymes have a small and neutral residue at this position,<sup>24</sup> such as glycine in amphibian ADH8<sup>25</sup> or Ser210 in ScAdh6p, since an aspartic or a glutamic acid residue would interfere sterically and electrostatically with the NADP(H) terminal phosphate group.<sup>26</sup> In ScAdh6p, the hydroxyl group of Ser210 hydrogen bonds two oxygen atoms from the terminal phosphate group, which binds also to the guanidinium group of Arg211 and to the  $\epsilon$ -amino group of Lys215 (Figures 3 and 7). These tripod-like interactions leave only one of the phosphate oxygen atoms exposed towards the solvent and without interaction with the protein. It had been suggested that the presence of one or two basic residues is important for NADP(H) specificity.<sup>27</sup> and this is the situation in ScAdh6p with Arg211 and Lys215. Remarkably, Lys215 is a conserved residue in most NAD(H)-dependent ADHs. In NADP(H)-dependent ADHs from bacteria,<sup>28–30</sup> NADP(H) binding involves a contiguous Ser and Arg residues and a Tyr that makes a hydrogen bond to the ribose phosphate group.<sup>29</sup> In turn, in amphibian ADH8 the preference for NADP(H) is achieved by the disposition and the interactions of residues Gly223, Thr224, and His225.<sup>25</sup> Therefore, the binding strategy of the terminal phosphate group by ScAdh6p is different, though the sequence changes required are very few, in particular due to the recruitment of the conserved Lys215 for a new role in NADP(H) binding. These results agree well with modeling and biochemical studies on CAD2 from *Eucalyptus gunnii*, where it was concluded that Ser212 and Arg217 (equivalent to Ser210 and Lys215 in ScAdh6p) had to participate in the binding of the terminal phosphate group of NADP(H).<sup>31,32</sup> Sequence comparisons between the CAD enzymes (Figure 1) show that binding of the cofactor terminal phosphate group would likely follow the same pattern as in ScAdh6p. A conspicuous exception is MTD from *Apium graveolens*,<sup>9</sup> with NAD-dependent mannitol dehydrogenase

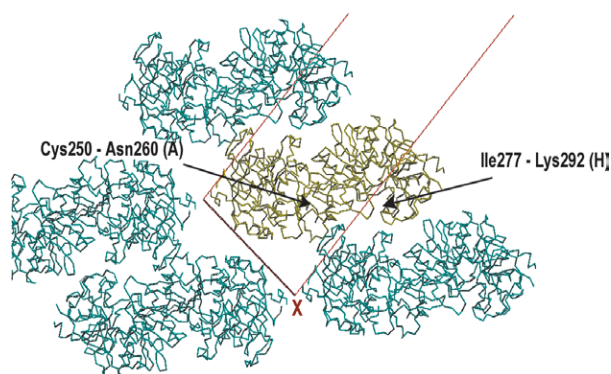


**Figure 4.** Stereo views of the ScAdh6p dimers: the view is down the molecular 2-fold axis. Subunits having the *apo* conformation are coloured blue and those in the *holo* conformation are coloured brown with the NADP<sup>+</sup> cofactor shown explicitly. (a) The experimentally determined structural heterodimer. Departure from the strict molecular symmetry seems required to allow the antiparallel pairing of strand His281-Tyr289 between the two subunits in the dimer (inset). In turn, *apo-apo* homodimers (b) would present steric problems, while *holo-holo* homodimers (c) seem to break apart the four hydrogen bonds found in the heterodimer between strands His281-Tyr289.

activity, where an aspartic acid residue occupies the position equivalent to Ser210 in ScAdh6p.

The structural data (see the previous section) suggest that cofactor binding in the first site would be stronger than in the second site. However, the steady-state kinetic analysis<sup>10</sup> performed with NADPH and cinnamaldehyde did not show

any sign of negative cooperativity up to 1 mM NADPH. Therefore, we decided to study the stoichiometry of cofactor binding and the corresponding dissociation constant, by monitoring the quenching on the fluorescence of ScAdh6p upon NADPH binding. The analysis of the experimental data according to the method of Stinson &



**Figure 5.** Crystal packing in the monoclinic crystals. In the monoclinic crystals, with a solvent content of 68% (v/v), molecules are closely packed only when viewed down the *b* axis. This close packing involves contacts of the mobile loops, in particular of loop Cys250-Asn260, which allows discrimination of a unique orientation of the heterodimer, as found in the monoclinic crystals.

Holbrook (see Materials and Methods) (Figure 8) yielded a  $K_D$  of 7.7  $\mu\text{M}$  and an abscissa intercept of 6.47  $\mu\text{M}$  (Figure 8, inset), that would correspond to the concentration of binding sites. Considering that the dimeric ScAdh6p concentration used was 6.25  $\mu\text{M}$ , the resulting stoichiometry is of approximately one NADPH molecule per dimer of ScAdh6p at the concentrations of NADPH used in the experiment. This indicates that the enzyme appears to work with only one functional active site.

### The catalytic site

The active site of ScAdh6p is situated in the cleft between the catalytic and coenzyme-binding domains, centred around the catalytic zinc ion. The catalytic zinc ion displays a tetrahedral coordination with residues Cys46, His68, Cys163 and a solvent molecule in the *apo* and *holo* forms (visible in both the trigonal and the monoclinic structures) (Figure 9). This catalytic zinc ion binding mode is structurally equivalent to the one shown by the *apo* and *holo* forms of HLADH.<sup>18</sup>

In order to generate a model for the ternary complex, cinnamaldehyde has been “docked” to the active site of ScAdh6p-NADP<sup>+</sup> in such a way that

the carbonyl oxygen atom would coordinate to the Zn atom, and locating the C1 atom close to the nucleotide cofactor (Figure 9). The Figure shows the ScAdh6p residues in close contact to cinnamaldehyde, corresponding to the inner, middle and outer parts of the substrate-binding site. While some of these residues are structurally analogous to those found in the active centre of HLADH (specially those located in the inner part), some others do not have correspondence, since some positions of the substrate-binding site in HLADH belong to the loop 116-138 not present in ScAdh6p. In fact, the funnel-shaped active site of ScAdh6p is larger than the active site of HLADH, mainly because part of the loop 116-138 from HLADH restrains the entrance to the active site. The large size of the active site of ScAdh6p is in agreement with the broad substrate specificity shown by the enzyme and its activity with bulky aromatic compounds.<sup>10</sup> Thus, both active sites are lined mostly with hydrophobic side-chains, being the polar groups brought about by the residues that coordinate the catalytic Zn, the nicotinamide moiety of the coenzyme and the side-chain of Ser48. In general, the residues involved in the binding of the catalytic and structural Zn, and those of the substrate-binding pocket predicted by McKie *et al.*<sup>31</sup> in their modelling study with CAD2 from *Eucalyptus gunnii*, correspond well to the residues found here in the ScAdh6p structure, suggesting that the pattern is common in the CAD enzymes.

### Conclusions

The ScAdh6p crystal structures are the first determined from the CAD family, which completes the availability of structural information for at least one representative from each of the four families of the zinc-binding MDR enzymes. ScAdh6p exhibits the well-characterized structural features of zinc-containing dimeric MDRs, but with important peculiarities. Thus, the size and shape of the active site appear adapted to the bulky and hydrophobic substrates of CADs. The specificity towards NADP(H) is achieved mainly by tripod-like interactions of the cofactor terminal phosphate group with side-chains from Ser210, Arg211 and Lys215. The interconversion between the *apo* and *holo*

**Figure 6.** Structure-based alignment of MDR sequences. The alignment was obtained from the DALI server<sup>15</sup> and refined manually. The main secondary structural elements for each sequence were displayed by using the ESPRIPT program.<sup>47</sup> The structural elements are from the *holo* form of ScAdh6p (PDB code 1PIW), the *apo* form from *Baemissia argentifolia* ketose reductase (BaKR, PDB code 1E3J), the *holo* form from *Clostridium beijerinckii* ADH (CbADH, PDB code 1KEV) and the *holo* form from horse liver ADH (HLADH, PDB code 2OHX). Residues highlighted in red are conserved among all the sequences, while residues highlighted in green are conserved in at least three of the sequences. Triangles indicate the residues involved in the subunit interactions between the *apo* and *holo* subunits of the dimer (in red are the interactions that would be lost upon the hypothetical NADP<sup>+</sup>-binding to both subunits). Circles indicate the residues involved in the binding of NADP<sup>+</sup> by hydrogen bonding and hydrophobic contacts (further described in Figure 7). The secondary structural elements of the nucleotide-binding domain are labelled after Eklund *et al.*<sup>48</sup> for HLADH.  $\eta$  denotes  $\alpha_{3,10}$  helices.

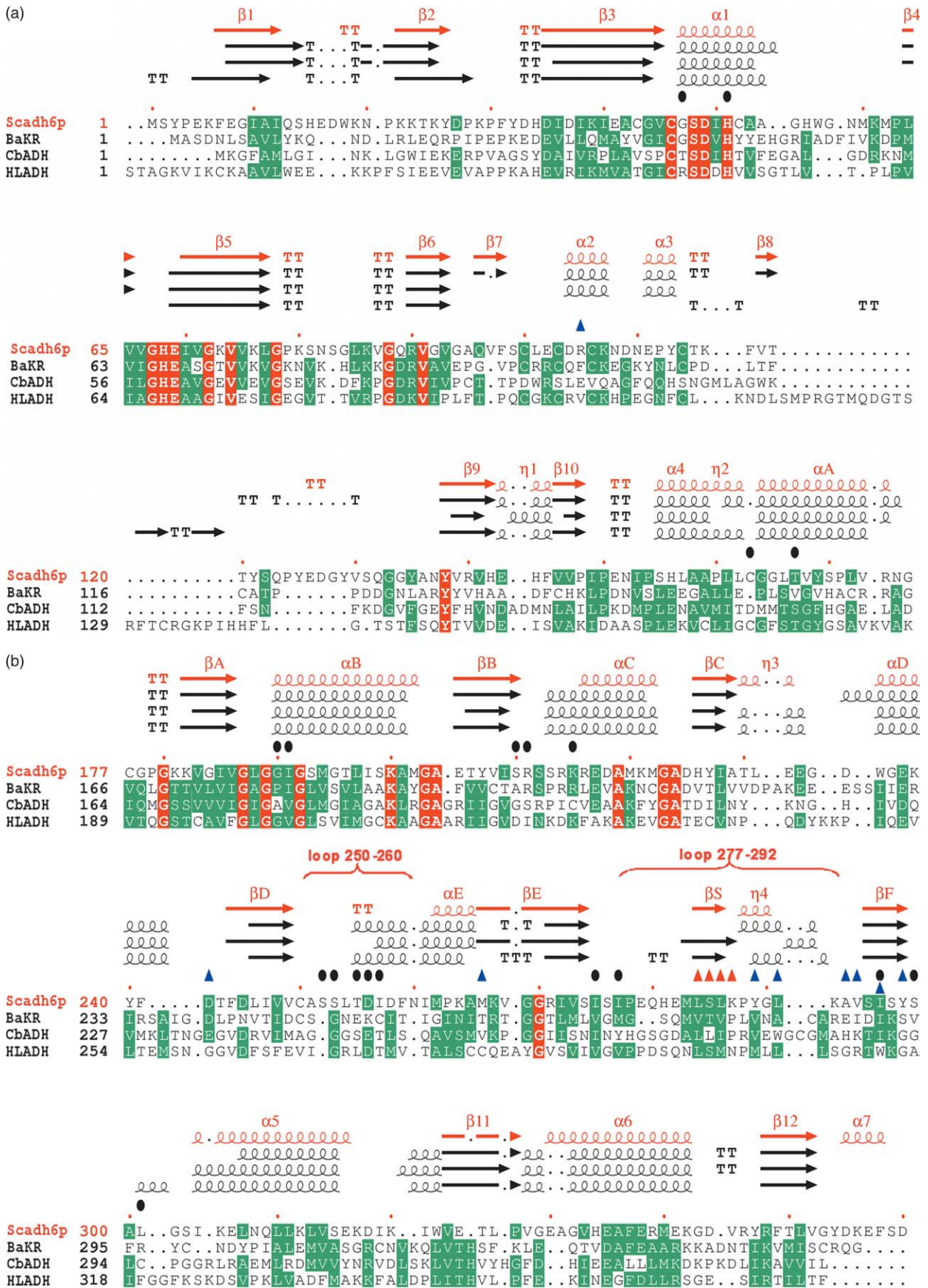
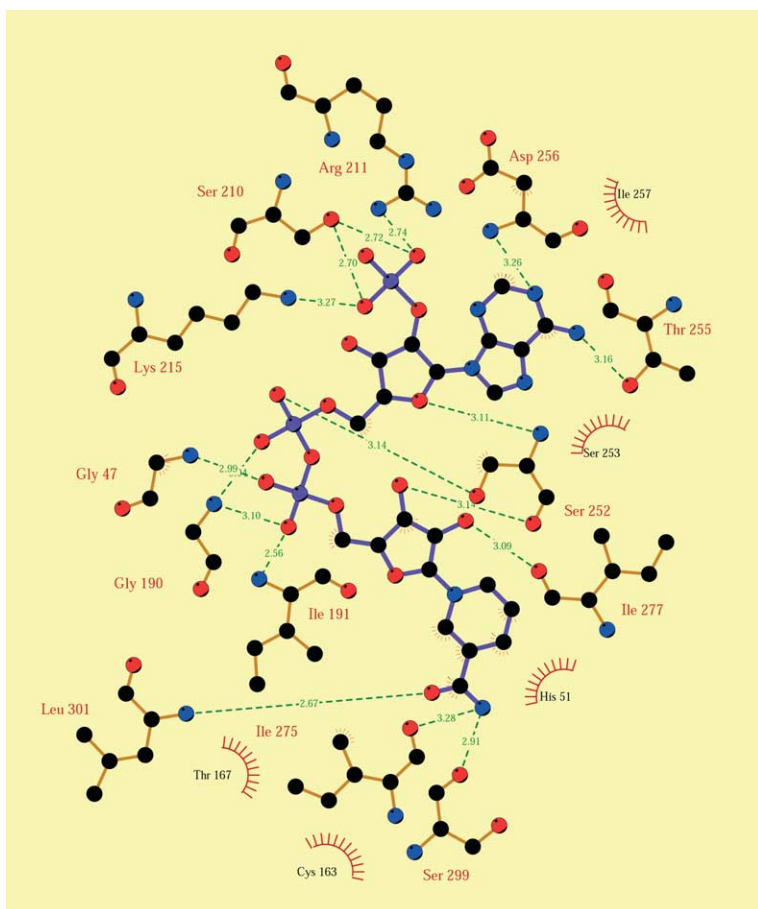


Figure 6 (legend opposite)



**Figure 7.** A diagram of interactions between ScAdh6p and NADP<sup>+</sup>. LIGPLOT<sup>49</sup> describing the interactions of the bound NADP<sup>+</sup> molecule. Only side-chains of residues Ser210, Arg211 and Lys215 interact with the terminal phosphate group of the NADP<sup>+</sup> cofactor. Residues Ser210 and Arg211 are sequence variations specific for ScAdh6p, while residue Lys215 is conserved among NAD(H)-dependent ADHs. The nitrogen atom of the carboxamide group of the nicotinamide moiety is hydrogen bonded to the carbonyl oxygen atoms of Ile275 and Ser299, while the oxygen atom is hydrogen bonded to the main-chain nitrogen atom of Leu301. The pyrophosphate oxygen atoms of the coenzyme establish hydrogen bonds to main-chain nitrogen atoms of Gly47, Gly190 and Ile191, and to the side-chain of Ser252. The O-2' and O-3' atoms of the nicotinamide-ribose are forming hydrogen bonds with the main-chain carbonyl atoms of Ile277 and Ser252.

conformations does not require changes in the relative disposition of domains, while two loops, Cys250-Asn260 and Ile277-Lys292, experience large movements. However, the most striking observation is that ScAdh6p molecules appear to be present mostly as structural heterodimers composed of one subunit in the *apo* conformation and the second subunit in the *holo* conformation, respectively. While homodimers with the *apo-apo* conformations would be sterically unfeasible, the *holo-holo* homodimers might be energetically unfavourable due to the absence of some of the intersubunit hydrogen bonds present in the heterodimer. Taken together, the structural results, the absence of negative cooperativity in the steady-state kinetics,<sup>10</sup> and the demonstration of a single NADPH molecule binding per dimer, are consistent with a half-of-the-sites reactivity mechanism resulting from a pre-existing (prior to cofactor binding) tendency for the asymmetry in the enzyme. A pre-steady-state kinetics study appears now necessary to explore in depth the molecular mechanism of the enzyme.

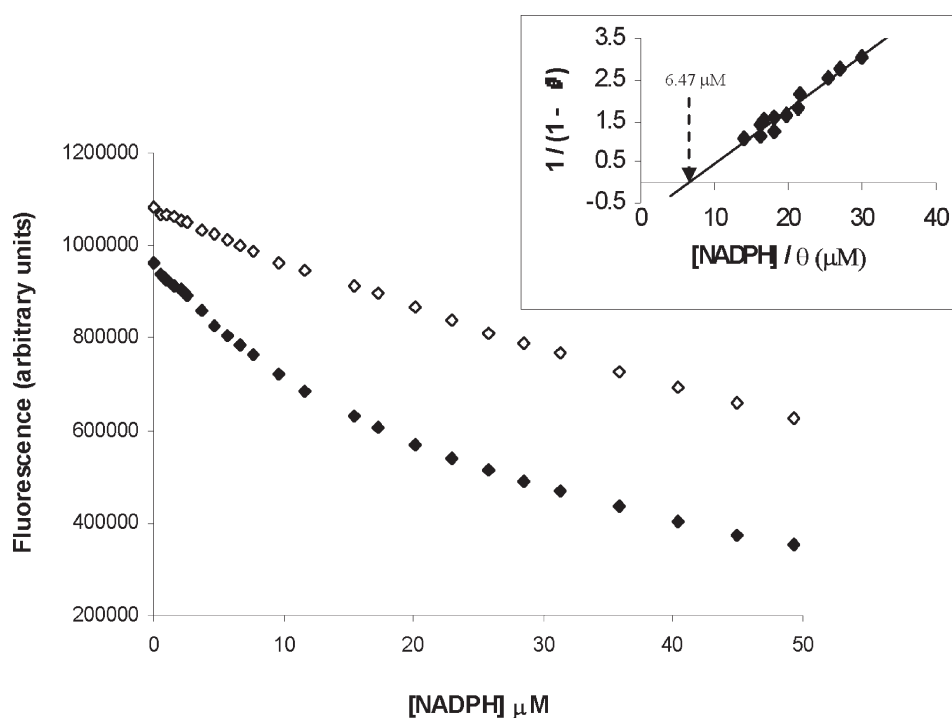
## Materials and Methods

### Protein purification and crystallization

ScAdh6p was obtained following a previously

described protocol,<sup>33</sup> but using a different yeast strain, named BL9. To eliminate a contaminating protein (saccharopine dehydrogenase, identified by mass spectrometry) that co purifies with ScAdh6p, the BL9 strain was constructed by disrupting the corresponding gene (*LYS9*) in the BJ2168 strain.<sup>34,35</sup> The oligonucleotides 5' GCGGAGCTCCGTTTTGTTGCTAGGATCTGG 3' and 5' GCGAAGCTTCCTTTAGATAGATGCCG 3' were used to amplify *LYS9* by PCR. The resulting fragment was cloned into the SacI and HindIII sites of the PCR-Script vector (Stratagene), that was digested with BamHI, removing 230 bp from *LYS9*, and followed by the insertion of the *URA3* marker. Finally, the construct *lys9* :: *URA3* was amplified by PCR with the above oligonucleotides and used to transform the BJ2168 yeast strain by the lithium acetate protocol,<sup>36</sup> resulting in a disrupted *lys9* (checked by PCR) strain (BL9). In order to overexpress ScAdh6p, BL9 was transformed with the vector pAA318 (derived from the yeast expression vector pAAH5),<sup>37</sup> that contained the *ADH6* gene under the *ADH1* promoter. The BL9 [pAA318] strain was grown until the late exponential phase in selective medium containing glucose, resulting in 27 g of cells. ScAdh6p was purified by the sequential use of DEAE-Sepharose, Red-Sepharose and, finally, by gel-filtration HPLC to eliminate the NADP<sup>+</sup> used to elute the enzyme from the affinity column.<sup>10</sup>

Samples of ScAdh6p were used, as reported previously,<sup>33</sup> in crystallization screenings with the hanging-drop, vapour-diffusion method, producing trigonal crystals (Table 1). The best-diffracting crystals were obtained in about two days at room temperature with 1  $\mu$ l of a 10 mg/ml protein solution and 1  $\mu$ l of the



**Figure 8.** Fluorescence quenching on NADPH binding to ScAdh6p. Change of the protein fluorescence intensity (in arbitrary units) of ScAdh6p (◆) and BSA (◇) upon addition of NADPH. The excitation wavelength was 280 nm and the emission wavelength was measured at 340 nm. ScAdh6p was used at a concentration of 6.25  $\mu\text{M}$  (dimer) in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7), and 0.1 M NaCl, at 25  $^{\circ}\text{C}$ . Bovine serum albumin (BSA) was used in the same buffer at the same protein concentration as ScAdh6p, to take into consideration non-specific effects. The inset corresponds to the Stinson & Holbrook plot<sup>43</sup> for the binding of NADPH to ScAdh6p (corrected for non-specific effects with the BSA data). The abscissa intercept, 6.47  $\mu\text{M}$ , represents the total concentration of binding sites that, considering the ScAdh6p concentration used, yields a stoichiometry of one molecule of nucleotide bound per dimer of ScAdh6p. A  $K_D$  of 7.7  $\mu\text{M}$  for the binding of NADPH to ScAdh6p is obtained from the reciprocal of the slope.

reservoir solution containing 1.6 M ammonium sulphate (AS) and 0.1 M Hepes (pH 7.0) (Table 1). A second crystal form, previously unreported, was obtained with the hanging-drop, vapour-diffusion method when a solution of 10.5 mg/ml protein was precipitated with 30% (w/v) PEG 4000 buffered by 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5). These new crystals were monoclinic, space group C2, and grew in about a week to maximum sizes of 0.2 mm  $\times$  0.3 mm  $\times$  0.5 mm (Table 1). Attempts to prepare binary complexes with NADP<sup>+</sup> or NADPH by either soaking or co-crystallization gave crystals, isomorphous to the trigonal ones, when ScAdh6p was incubated overnight with 3.5 mM NADP<sup>+</sup> (Table 1).

### Data collection

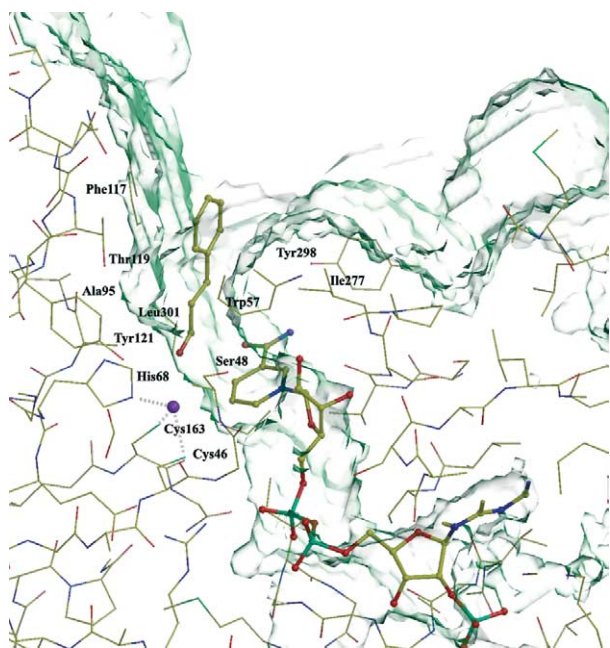
Data collection for the ScAdh6p trigonal crystals (without NADP<sup>+</sup> added), was performed at the zinc absorption K-edge peak wavelength, previously determined by an X-ray fluorescence analysis that confirmed the presence of the metal in the enzyme.<sup>33</sup> Crystals, soaked in a 20% (v/v) glycerol cryoprotectant solution, were flash-cooled at the temperature of boiling nitrogen. Diffraction data, collected using a MAR CCD detector in the beamline BM14 at the ESRF (Grenoble, France), was processed with programs DENZO and SCALEPACK (Table 1).<sup>38</sup> Data collection (ESRF beamline ID14EH4) and data processing for the monoclinic and for the trigonal (with NADP<sup>+</sup> added) crystals were performed similarly, except for the wavelength used (Table 1).

### Structure determination and refinement

The first ScAdh6p structure was solved with the anomalous signal at the Zn<sup>2+</sup> edge obtained from the trigonal crystals by single anomalous dispersion (SAD), with the program SOLVE-v2.02.<sup>39</sup> Two anomalous scatterers with high occupancies were found in the crystal asymmetric unit, which corresponded to the two zinc ions found per protein subunit (Table 1). Phases, consistently better for space group P3<sub>2</sub>21 than for its enantiomer P3<sub>1</sub>21, were improved by density modification (performed with program RESOLVE<sup>40</sup>), in particular solvent flattening, likely due to the high volume solvent content of these crystals (78%, v/v). The quality of this experimental electron density map, at 3.1 Å resolution, allowed us to follow most of the protein main-chain path with confidence. Only in the N and C-terminal regions and in the vicinity of a crystal 2-fold axis, which was coincident with the molecular 2-fold axis, was density difficult to interpret. The model built into the experimental map, using the graphics program O,<sup>41</sup> included residues Lys6-Ser252, Ile257-Ser276 and Ala293-Glu357 or 332 residues from a total of 360 possible (Figure 2). Using this incomplete model, the structures of both the trigonal crystals with NADP<sup>+</sup> added and of the monoclinic crystals were solved by molecular replacement with program AMoRe.<sup>42</sup> In the monoclinic crystals, the asymmetric unit contained two ScAdh6p subunits with a volume solvent content of 68% (v/v) (Table 1).

For the three crystal structures, refinement was carried





**Figure 9.** Docking of a substrate in the catalytic centre of ScAdh6p. View of the ScAdh6p active centre in the *holo* conformation, with the NADP<sup>+</sup> cofactor shown explicitly, and a cinnamaldehyde molecule modelled inside the substrate-binding pocket. The molecular accessible surface is displayed as a transparent surface and residues forming the active centre and the substrate-binding site are labelled. Coordination of the catalytic zinc ion, with residues Cys46, His68 and Cys163, is indicated with broken lines. The nature and disposition of residues that form the, mostly hydrophobic, funnel-shaped substrate-binding site in ScAdh6p appear well suited for large, cinnamaldehyde-like, substrates.

out following standard protocols and using iteratively the program CNS,<sup>43</sup> with the bulk solvent correction and alternating with manual rebuilding using program O. Refinement of the isotropic individual *B*-factors was performed only in the final rounds. Due to the limited resolution available in the three crystal structures, of about 3 Å, no water molecules have been included explicitly (Table 1). In the refined trigonal structures loops Cys250-Asn260 and Ile277-Lys292 presented alternative conformations. Attempts to explain this disorder by using a lower space group symmetry (*P*32) or with the low symmetry together with twinning were not consistent with the persistence of the alternative conformations in the maps or with the data analysis.

#### Protein Data Bank accession codes

Coordinates and structure factors are deposited in the Protein Data Bank with accession codes 1QIN (trigonal crystal without NADP<sup>+</sup>), 1PS0 (trigonal crystal with NADP<sup>+</sup>) and 1PIW (monoclinic crystal).

#### NADPH binding to ScAdh6p

NADPH binding to ScAdh6p was followed by measuring the quenching in protein fluorescence upon binding of NADPH. Fluorescence experiments were performed on a Perkin-Elmer 650-40 spectrofluorometer. The excitation wavelength was 280 nm and the emission

wavelength was monitored at 340 nm. The spectrofluorometer cuvette contained 6.25 μM homogeneous ScAdh6p, to which 5 μl aliquots from concentrated NADPH solutions were added up to a concentration of NADPH of 50 μM. The concentration of protein was determined by quantitative amino acid analysis, and fluorescence intensities were corrected for dilution. Concentrations of NADPH were determined by measuring absorbance at 340 nm using a molar extinction coefficient of 6220 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. All fluorescence intensities were determined at 25 °C in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7), 0.1 M NaCl. A control experiment, with increasing concentrations of NADPH and BSA at the same protein concentration as ScAdh6p, was done to correct for non-specific binding and inner-filter effects.

The dissociation constant (*K*<sub>D</sub>) and stoichiometry ( $\rho$ ) for the binding of NADPH to ScAdh6p were calculated by using the graphic procedure described by Stinson & Holbrook,<sup>44</sup> and the equation:

$$1/(1 - \theta) = [\text{NADPH}]_t / (K_D \theta) - \rho [\text{ScAdh6p}]_t / K_D$$

where  $\theta$  is the fractional occupancy by nucleotide.  $\theta$  was determined by the ratio  $\Delta F / \Delta F_{\text{max}}$ , where  $\Delta F_{\text{max}}$  was estimated from the asymptote to the plot of the specific fluorescence intensity (difference between the NADPH binding to ScAdh6p and the corresponding experiment with BSA) as a function of the concentration of NADPH.  $\Delta F$  is the difference between the initial fluorescence of ScAdh6p with no NADPH added and the observed fluorescence at each nucleotide concentration, corrected for the fluorescence intensity measured with BSA at the same concentration of nucleotide.

#### Acknowledgements

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

#### References

- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Etwiller, L. & Eddy, S. R. (2002). The Pfam protein families database. *Nucl. Acids Res.* **30**, 276–280.
- Nordling, E., Jornvall, H. & Persson, B. (2002). Family characterizations including genome comparisons and active site modeling. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4267–4276.
- Jornvall, H., Shafqat, J. & Persson, B. (2001). Variations and constant patterns in eukaryotic MDR enzymes. Conclusions from novel structures and characterized genomes. *Chem. Biol. Interact.* **130–132**, 491–498.
- Riveros-Rosas, H., Julian-Sanchez, A., Villalobos-Molina, R., Pardo, J. P. & Pina, E. (2003). Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3309–3334.
- Luderitz, T. & Grisebach, H. (1981). Enzymic synthesis of lignin precursors. Comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol:NADP<sup>+</sup> dehydrogenase from spruce (*Picea abies* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Biochem.* **119**, 115–124.

6. Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 519–546.
7. Pilate, G., Guiney, E., Holt, K., Petit-Conil, M., Lapierre, C., Leple, J. C. *et al.* (2002). Field and pulp- ing performances of transgenic trees with altered lignification. *Nature Biotechnol.* **20**, 607–612.
8. Somssich, I. E., Wernert, P., Kiedrowski, S. & Hahlbrock, K. (1996). *Arabidopsis thaliana* defense- related protein ELI3 is an aromatic alcohol:NADP(+) oxidoreductase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 14199–14203.
9. Williamson, J. D., Stoop, J. M., Massel, M. O., Conkling, M. A. & Pharr, D. M. (1995). Sequence analysis of a mannitol dehydrogenase cDNA from plants reveals a function for the pathogenesis-related protein ELI3. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 7148–7152.
10. Larroy, C., Fernandez, M. R., Gonzalez, E., Pares, X. & Biosca, J. A. (2002). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. *Biochem. J.* **361**, 163–172.
11. Larroy, C., Pares, X. & Biosca, J. A. (2002). Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5738–5745.
12. Grima-Pettenati, J., Feuillet, C., Goffner, D., Borderies, G. & Boudet, A. M. (1993). Molecular cloning and expression of a *Eucalyptus gunnii* cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Mol. Biol.* **21**, 1085–1095.
13. Thomazeau, K., Dumas, R., Halgand, F., Forest, E., Douce, R. & Biou, V. (2000). Structure of spinach acetohydroxyacid isomeroreductase complexed with its reaction product dihydroxymethylvalerate, manganese and (phospho)-ADP-ribose. *Acta Crystallog. sect. D*, **56**, 389–397.
14. Fersht, A. (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science*, 3rd edit. Freeman and Co, New York.
15. Holm, L. & Sander, C. (1996). Alignment of three-dimensional protein structures: network server for database searching. *Methods Enzymol.* **266**, 653–662.
16. Eklund, H., Samama, J. P., Wallén, L., Brändén, C. I., Åkeson, Å. & Jones, T. A. (1981). Structure of a triclinic ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **146**, 561–587.
17. Colonna-Cesari, F., Perahia, D., Karplus, M., Eklund, H., Brändén, C. I. & Tapia, O. (1986). Interdomain motion in liver alcohol dehydrogenase. Structural and energetic analysis of the hinge bending mode. *J. Biol. Chem.* **261**, 15273–15280.
18. Eklund, H. & Brändén, C. I. (1987). Alcohol dehydrogenase. In *Biological Macromolecules and Assemblies* (Jurnak, F. A. & McPherson, A., eds), John Wiley & Sons Inc., London.
19. Sanghani, P. C., Robinson, H., Bosron, W. F. & Hurley, T. D. (2002). Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of apo, binary, and inhibitory ternary complexes. *Biochemistry*, **41**, 10778–10786.
20. Hurley, T. D., Bosron, W. F., Hamilton, J. A. & Amzel, L. M. (1991). Structure of human beta 1 beta 1 alcohol dehydrogenase: catalytic effects of non-active-site substitutions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 8149–8153.
21. Xie, P., Parsons, S. H., Spechard, D. C., Bosron, W. F. & Hurley, T. D. (1997). X-ray structure of human class IV sigmasigma alcohol dehydrogenase. Structural basis for substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **272**, 18558–18563.
22. Hurley, T. D., Edenberg, H. J. & Bosron, W. F. (1990). Expression and kinetic characterization of variants of human  $\beta 1\beta 1$  alcohol dehydrogenase containing substitutions at amino acid 47. *J. Biol. Chem.* **265**, 16366–16372.
23. Bellamacina, C. R. (1996). The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB J.* **10**, 1257–1269.
24. Wierenga, R. K., Terpstra, P. & Hol, W. G. (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* **187**, 101–107.
25. Rosell, A., Valencia, E., Pares, X., Fita, I., Farrés, J. & Ochoa, W. F. (2003). Crystal structure of the vertebrate NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADH8). *J. Mol. Biol.* **330**, 75–85.
26. Fan, F., Lorenzen, J. A. & Plapp, B. V. (1991). An aspartate residue in yeast alcohol dehydrogenase I determines the specificity for coenzyme. *Biochemistry*, **30**, 6397–6401.
27. Carugo, O. & Argos, P. (1997). NADP-dependent enzymes. I: Conserved stereochemistry of cofactor binding. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **28**, 10–28.
28. Burdette, D. S., Vieille, C. & Zeikus, J. G. (1996). Cloning and expression of the gene encoding the *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E secondary-alcohol dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *Biochem. J.* **316**, 115–122.
29. Korkhin, Y., Kalb(Gilboa), A. J., Peretz, M., Bogin, O., Burstein, Y. & Frolow, F. (1998). NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*. *J. Mol. Biol.* **278**, 967–981.
30. Kumar, A., Shen, P. S., Descoteaux, S., Pohl, J., Bailey, G. & Samuelson, J. (1992). Cloning and expression of an NADP(+)-dependent alcohol dehydrogenase gene of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 10188–10192.
31. McKie, J. H., Jaouhari, R., Douglas, K. T., Goffner, D., Feuillet, C., Grima-Pettenati, J. *et al.* (1993). A molecular model for cinnamyl alcohol dehydrogenase, a plant aromatic alcohol dehydrogenase involved in lignification. *Biochim. Biophys. Acta*, **1202**, 61–69.
32. Lauvergeat, V., Kennedy, K., Feuillet, C., McKie, J. H., Gorrichon, L., Baltas, M. *et al.* (1995). Site-directed mutagenesis of a serine residue in cinnamyl alcohol dehydrogenase, a plant NADPH-dependent dehydrogenase, affects the specificity for the coenzyme. *Biochemistry*, **34**, 12426–12434.
33. Valencia, E., Rosell, A., Larroy, C., Farrés, J., Biosca, J. A., Fita, I. *et al.* (2002). Crystallization and preliminary X-ray analysis of NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Rana perezi*. *Acta Crystallog. sect. D*, **59**, 334–337.
34. Jones, E. W. (1991). Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **195**, 428–453.
35. Rothstein, R. J. (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101**, 202–211.
36. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163–168.
37. Ammerer, G. (1983). Expression of genes in yeast

- using the ADCI promoter. *Methods Enzymol.* **101**, 192–201.
38. Otwinowski, Z. (1993). Oscillation data reduction program. In *Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing* (Sawyer, L., Isaacs, N. & Bailey, S., eds), pp. 56–62, SERC Daresbury Laboratory, England.
39. Terwilliger, T. C. & Berendzen, J. (1999). Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallog. sect. D*, **55**, 849–861.
40. Terwilliger, T. C. (2000). Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallog. sect. D*, **56**, 965–972.
41. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallog. sect. A*, **47**, 110–119.
42. Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallog. sect. A*, **50**, 157–163.
43. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W. *et al.* (1998). Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallog. sect. D*, **54**, 905–921.
44. Stinson, R. A. & Holbrook, J. J. (1973). Equilibrium binding of nicotinamide nucleotides to lactate dehydrogenase. *Biochem. J.* **131**, 719–728.
45. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, J. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673–4680.
46. Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. & Nei, M. (2001). MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, **17**, 1244–1245.
47. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I. & Metoz, F. (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*, **15**, 305–308.
48. Eklund, H., Nordström, B., Zeppezauer, E., Söderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T. *et al.* (1976). Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2–4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **102**, 27–59.
49. Wallace, A. C., Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* **8**, 127–134.

*Edited by R. Huber*

*(Received 30 January 2004; received in revised form 11 June 2004; accepted 16 June 2004)*

**Resumen de los resultados presentados en el artículo ‘*Apo and Holo structures of an NADP(H)-dependent cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae**’. *J. Mol. Biol* (2004), 341(4), 1049-1062.**

En este trabajo se presenta la estructura tridimensional de la proteína Adh6p de *Saccharomyces cerevisiae* a una resolución de 3.0 Å. Para ello se obtuvieron varios cristales de Adh6p; cristales trigonales de Adh6p, cristales trigonales de Adh6p unidos al coenzima NADP<sup>+</sup> y cristales monoclinicos unidos a NADP<sup>+</sup>.

La estructura global deducida del cristal trigonal de Adh6p contiene los 360 residuos correspondientes a una subunidad, dos iones de zinc y dos grupos fosfato. La estructura global del cristal trigonal de Adh6p co-cristalizado con NADP<sup>+</sup> es muy similar a la encontrada para el primer cristal trigonal, dado que presentan una desviación en los C $\alpha$  de tan sólo 0.32 Å. Sin embargo el cristal monoclinico de Adh6p presenta una unidad asimétrica que incluye la totalidad de los aminoácidos del homodímero de Adh6p con dos iones de zinc en cada subunidad. El espacio ocupado por los grupos fosfato en el cristal trigonal de Adh6p, en este caso estaba ocupado por una molécula de NADP<sup>+</sup> con una ocupación del 50%. Además, a esta molécula de NADP<sup>+</sup> le faltaba la densidad correspondiente a la nicotinamida, su estructura era, por tanto, fosfo-ADP-ribosa (Figura 3).

A pesar de la baja identidad de secuencia de Adh6p con otras proteínas de la superfamilia presentes en la base de datos estructural, el enzima mantiene las pautas características de las MDRs. La Figura 2a muestra como Adh6p está organizada en dos dominios, el dominio catalítico que engloba los aminoácidos Met1-Cys163 y Leu301-Asp360, y el dominio de unión al coenzima formado por los residuos Gly164-Ala300 que presenta el plegamiento de Rossmann, separados por una profunda hendidura. El zinc estructural está coordinado por cuatro cisteínas (residuos 100, 103, 106 y 114) mientras que el zinc catalítico presenta una coordinación tetraédrica equivalente a la encontrada para la HLADH (residuos Cys46, His68, Cys163) y una molécula de solvente.

La superimposición del esqueleto C $\alpha$  de las dos subunidades encontradas en el cristal monoclinico presenta un r.m.s.d. de tan sólo 1.19 Å, que excluyendo a los loops Cys250-Asn260 y Ile272-Lys292 disminuye a 0.36 Å. Sin embargo, el r.m.s.d. que presentan estos loops alcanza 6 Å para el residuo Tyr255 y 6.9 Å para el residuo Gln280 (Figura 2b). En la subunidad que contiene la molécula de fosfo-ADP-ribosa estos loops se encuentran cerrando el centro de unión, interaccionando con el anillo de adenina, el grupo pirofosfato y las dos moléculas de

ribosa (Figura 2a). El movimiento de estos loops es el responsable de la ocupación al 50% del lugar de unión al coenzima, determinando a su vez la conformación estructuralmente heterodimérica compuesta por una subunidad *apo* (A) y una subunidad *holo* (B) (Figura 4b). Esta disposición de los loops limita la composición de los dímeros. Así, una composición de subunidades A-A sería estéricamente inviable dado que el loop Ile277-Lys292 de una subunidad debería emplazarse sobre el loop Ile277-Lys292 de la otra subunidad (Figura 4c). La formación de un homodímero estructural H-H es posible aunque poco probable dado que esta disposición obliga a la pérdida de varias interacciones entre ambas subunidades, debilitando así el conjunto estructural (Figuras 4c y 6).

Se describe el centro de unión al cofactor, constituido por una serie de interacciones polares e hidrofóbicas con una gran participación de los loops Cys250-Asn 260 y Ile277-Lys292 (Figuras 6 y 7). Al igual que en otras MDRs que utilizan NADP(H) como coenzima, Adh6p presenta un residuo neutro de pequeño volumen en el extremo C-terminal de la segunda hoja  $\beta$ . De esta manera se evita que un residuo más voluminoso y cargado como el Asp, habitual en MDRs que utilizan el NAD(H) como coenzima, interaccione estérica y electrostáticamente con el grupo fosfato del NADP<sup>+</sup>. En el caso de Adh6p, este residuo es la Ser210, que junto con los residuos Arg211 y Lys215 establecen interacciones con el grupo fosfato con una distribución en forma de trípode.

En la Figura 9 se presenta un modelado de una molécula de cinamaldehído, uno de los sustratos de Adh6p, emplazado en el centro activo de la subunidad H de Adh6p. Esta visión global del bolsillo de unión permite describir un centro activo más amplio que para la HLADH, formado mayoritariamente por cadenas laterales hidrofóbicas.

Los resultados derivados del análisis estructural, que indican una conformación estructural A-H de las subunidades, sugieren que uno de los centros de unión al coenzima tendría una mayor afinidad que el otro. Los estudios de la estequiometría de unión al cofactor mediante el ‘quenching’ que provoca la unión de éste a la molécula de Adh6p, nos han permitido cuantificar la unión. En la Figura 8 se muestra el resultado de estos estudios donde claramente se aprecia que la unión del coenzima se da únicamente en una de las dos subunidades de Adh6p, con una constante de disociación de 7.7  $\mu$ M. Por lo tanto, parece posible que el enzima Adh6p mantenga su asimetría durante la catálisis, presentando un mecanismo de ‘half-of-the-sites reactivity’.

## **CAPITULO IV**

**Estudios funcionales de Adh6p y Adh7p de *Saccharomyces cerevisiae***

## Introducción

En este Capítulo se recogen una serie de experimentos cuyos resultados nos permiten hipotetizar sobre el papel funcional de las alcohol deshidrogenasas con actividad dependiente de NADP(H), Adh6p y Adh7p, en la levadura. Teniendo en cuenta la especificidad de sustrato de estas dos MDRs se han analizado papeles fisiológicos relacionados con los metabolitos encontrados en *Saccharomyces cerevisiae*. Además, la dependencia de estas enzimas por el coenzima NADP(H), así como la necesidad de la célula de mantener el balance redox NADP<sup>+</sup>/NADPH nos ha hecho plantearnos una posible implicación de estas ADHs en dicha función. Por otra parte, también se ha estudiado la posible implicación de Adh6p en diferentes mecanismos de la respuesta celular al estrés, en base a trabajos publicados de expresión mediante la técnica de los microarrays.

## Materiales y Métodos

### **Crecimiento de cepas *adh6Δ*, *adh7Δ* y *adh6Δadh7Δ* en presencia de veratraldehído**

Para estudiar el efecto del veratraldehído en el crecimiento de las diferentes cepas mutantes, se prepararon diferentes erlenmeyers de 500 ml con 100 ml de medio YPD. Para cada una de las cepas estudiadas (Wt, *adh6Δ*, *adh7Δ* y *adh6Δadh7Δ*) se analizaron cuatro concentraciones de veratraldehído diferentes (0, 5, 10 y 15 mM). Tanto el crecimiento como la concentración de veratraldehído presente en el medio se determinaron tal y como se ha descrito previamente [Larroy et al., 2002a].

### **Análisis de la expresión de Adh6p y Adh7p en diferentes condiciones de estrés**

Se ha realizado el análisis de la actividad cinamaldehído reductasa y se han estudiado los niveles de proteína Adh6p presentes en cultivos crecidos en condiciones de estrés oxidativo, estrés osmótico y en cultivos crecidos en diferentes fuentes de nitrógeno mediante Western-blot. Todos los análisis se han llevado a cabo por triplicado.

### **Preparación de los extractos totales de *Saccharomyces cerevisiae***

Las muestras de los cultivos sometidos a diferentes condiciones de estrés fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su análisis. En algunos casos se ha realizado una lisis mecánica de las células, mientras que en otros, la lisis ha sido provocada por detergentes.

1) Lisis mecánica: Se descongelaron las células en hielo y se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 7.5, DTT 0.5 mM). Se añadieron bolas de vidrio y se vorteo la mezcla durante 1 minuto, repitiendo el proceso 3 veces más. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 20.000 g durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante.

2) Lisis con detergente: Se descongelaron las células en hielo y se resuspendieron en 250 µl de solución de lisis Y-PER (Yeast Protein Extraction Reagent de Pierce). 20 minutos en agitación suave a temperatura ambiente fueron suficientes para romper la pared celular y la membrana plasmática de las células de levadura. Finalmente se centrifugaron las muestras a 20.000 g durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante.

### **Análisis de la actividad cinamaldehído reductasa**

La actividad cinamaldehído reductasa dependiente de NADPH se ensayó siguiendo la desaparición del coenzima NADPH, tal y como está descrito en el Capítulo I [Larroy et al., 2002a].

### **Producción de anticuerpos policlonales contra Adh6p y Adh7p**

La producción de anticuerpos se llevó a cabo en el *Servei de producció d'anticossos* del IBMB-CSIC (Barcelona). Para cada una de las proteínas se han utilizado dos conejos a los que se les realizaron 4 inyecciones de 100 µl de proteína a una concentración de 0.2 mg/ml, escalonadas en dos meses. Los anticuerpos obtenidos se alicuotaron y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. La sensibilidad de los anticuerpos policlonales obtenidos se analizó por Western-Blot y se llegó a detectar 1 ng de proteína pura (tanto para Adh6p como para Adh7p). Sin embargo, en extractos totales de proteína de *Saccharomyces cerevisiae* únicamente fue posible detectar la proteína Adh6p. Para Adh7p fue imposible su detección en extractos totales dada su muy baja expresión en todas las condiciones de crecimiento ensayadas.



### **Análisis de la expresión de Adh6p y Adh7p por Western-blot**

Los lisados obtenidos en los diferentes ensayos realizados se sometieron a una electroforesis en SDS-PAGE [Laemmli, U.K., 1970]. En cada carril se cargaron 5 µg de proteína total para cada homogenado. Las proteínas separadas en un gel de acrilamida al 12%, se transfirieron a una membrana de Immobilon-P (Millipore), previamente hidratada en metanol, durante 1 hora a 100 V. Para la detección de las proteínas mediante quimioluminiscencia, se procedió de la siguiente manera:

- El bloqueo de la membrana se realiza con 5% de leche en polvo desnatada disuelta en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, pH 7.4 ). Aunque 2 horas de incubación a temperatura ambiente son suficientes, rutinariamente este paso se realizó a 4°C durante la noche.
- Incubación con el anticuerpo primario: se ha utilizado una dilución 1/10000 de anticuerpo anti-Adh6p y 1/5000 de anti-Adh7p en PBS con leche en polvo desnatada al 5% y Tween 20 al 0.1% (TPBS/leche5%). La incubación se realiza a temperatura ambiente durante 1 hora.
- Lavados: para eliminar cualquier traza del anticuerpo primario se lava la membrana con TPBS/leche5% durante 10 minutos. Este paso se realiza 3 veces.
- Incubación con el anticuerpo secundario: se ha utilizado el anticuerpo de rata anti Igs de conejo conjugado a peroxidasa de Bio-Rad a una dilución 1/5000 en TPBS/leche5%. La incubación se realiza durante una hora.
- Lavados: antes de proceder a la detección se eliminan los restos de anticuerpo secundario. Se realizan 3 lavados con TPBS/leche5%, seguidos de 2 lavados con TPBS, durante 10 minutos cada uno.
- Detección Quimioluminiscente: se ha utilizado el sustrato luminol combinado con un componente potenciador de BioRad. Se incuba la membrana en una mezcla 1:1 del sustrato y la solución potenciadora durante 5 minutos. Se escurre la membrana para eliminar el exceso de sustrato y se coloca entre dos hojas transparentes dentro de un cassette de detección. Finalmente se expone la membrana a un film (Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL de Amersham) y se procede al revelado.

### **Crecimiento de las cepas FY834α y FY18 en presencia de agentes inductores del estrés oxidativo**

Primero se optimizaron las concentraciones de trabajo para los dos inductores del estrés oxidativo estudiados, la diamida y la menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona). Se prepararon 4 erlenmeyers de 100 ml con 50 ml de medio YPD que se inocularon con la cepa Wt (FY834α) a

una densidad óptica inicial de 0.2 y se crecieron a 30°C y 250 r.p.m.. Al cabo de 2 horas, cuando el cultivo ya se había duplicado e iniciaba su fase de crecimiento exponencial se añadió diamida a una concentración final de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 mM (a partir de un stock 50 mM) o bien menadiona a una concentración final de 0, 0.1, 0.25, 0.5, 2 y 10 mM (a partir de las soluciones patrón 10 mM y 1 M). Tanto la diamida como la menadiona (sal sódica) se prepararon en agua inmediatamente antes de su uso y se filtraron para esterilizarlas. El crecimiento se monitorizó siguiendo la densidad óptica del cultivo a 595 nm.

Con las condiciones ya definidas se realizaron las curvas de crecimiento y la toma de muestras en diferentes estadios de la propagación celular. La inducción del estrés oxidativo por parte de la diamida y de la menadiona se realizó para la cepa FY834 $\alpha$  (Wt) y para la cepa mutante isogénica FY18 ( $\Delta adh6$ ). Los cultivos se realizaron en erlenmeyers de 500 ml con 200ml de medio YPD. A un inóculo inicial de 0.2 de densidad óptica para ambas cepas, se le dejó crecer durante dos horas y se le aplicó el tratamiento con el agente causante del estrés oxidativo: 6 ml de diamida 50 mM (1.5 mM final) o 6 ml de YPD (cultivo control), o bien, 1.6 ml de menadiona 25 mM (0.2 mM final) o 1.6 ml de YPD (cultivo control). Se realizó un seguimiento del cultivo a lo largo de toda la curva de crecimiento durante el cual se recogieron muestras. Las células, una vez sedimentadas, se guardaron a -80°C hasta su posterior análisis.

### **Análisis de la proteína Adh6p en cultivos crecidos en diferentes fuentes de nitrógeno**

Se analizó la expresión de Adh6p en las cepa FY834 $\alpha$  (Wt) en un medio de cultivo en el que la fuente de nitrógeno provenía únicamente de los diferentes aminoácidos suministrados, a excepción del control realizado con sulfato amónico. Los cultivos se realizaron en erlenmeyers de 500 ml con 250 ml de medio mínimo selectivo (MMS: 1.7% de base de nitrógeno sin aminoácidos ni sulfato amónico, 2% de glucosa, 2 g/l del aminoácido escogido como fuente de nitrógeno y 20  $\mu$ g/ml para el resto de aminoácidos) y se crecieron a 30°C y 250 r.p.m.. La fuente de nitrógeno se suministró a una concentración de 2 g/l, excepto para los ensayos con tirosina donde la concentración utilizada fue 0.5 g/l. Se realizó un inóculo inicial de densidad óptica 0.1 a excepción de los cultivos crecidos con isoleucina o metionina como fuente de nitrógeno, para los que se realizó un inóculo inicial de 0.2 que sí permitía al cultivo continuar con el crecimiento.

El análisis de la expresión se realizó en dos momentos de la curva de crecimiento, por lo que se sedimentaron las células a densidad óptica aproximada de 0.5-1 (fase exponencial temprana) y 2-2.5 (fase estacionaria). Las muestras se conservaron a -80°C hasta el momento de su análisis.

### **Análisis de la actividad reductasa/deshidrogenasa en extractos de *Saccharomyces cerevisiae***

Se analizó la actividad reductasa dependiente de NADP(H) en extractos totales de las cepas FY834 $\alpha$  (Wt) y FY18 (*adh6* $\Delta$ ). La levadura se creció en erlenmeyers de 100 ml con 30 ml de medio YPD a 30°C y 250 r.p.m. Se realizó un inóculo inicial a una densidad óptica de 0.1 y los cultivos se dejaron crecer hasta alcanzar la fase logarítmica (densidad óptica de 2). Se sedimentaron las células y se conservaron a -80°C hasta su utilización. Las células se lisaron con la solución Y-PER. El lisado obtenido se centrifugó durante 5 min a 20.000g y se recuperó el sobrenadante.

#### **Análisis de la actividad reductasa dependiente de NAD(H) y NADP(H)**

Se midió la actividad reductasa dependiente de NADH y de NADPH para los aldehídos 3-metilbutanal, 3-metiltiopropanal (metional) y veratraldehído en las cepas Wt y *adh6* $\Delta$ .

#### **Análisis de las proteínas con actividad deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> en *Saccharomyces cerevisiae***

La sensibilidad y calidad de la tinción por actividad de oxidación es mejor que la tinción por actividad de reducción, por lo que se tiñó el gel por oxidación de alcoholes. La detección de las proteínas se realizó incubando el gel en la oscuridad en tampón Tris 50 mM a pH 8.6 al que se le añadió NADP<sup>+</sup> a una concentración final de 0.5 mM y alcohol a 1-100 mM para reproducir la actividad de oxidación. Además a la solución también se le añadió 65  $\mu$ M de PMS y 0.25 mM de NBT, de esta manera el NADPH producido en la oxidación del alcohol reduce al PMS, que una vez reducido, reduce a su vez al NBT que forma un precipitado azul. El revelado se paró sumergiendo el gel en agua.

### **Análisis de los niveles de alcoholes superiores en la levadura *Saccharomyces cerevisiae***

El análisis de los niveles de alcoholes superiores presentes en los cultivos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se realizó en el *Servei d'Anàlisi Química* de la UAB mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a un sistema de detección por espectrometría de masas. En cromatografía de gases, la inyección de muestras con alto contenido en agua y sales presenta la problemática de una degradación progresiva de la fase estacionaria, que como

consecuencia provoca una disminución en la resolución de picos y una baja reproducibilidad de los resultados. Puesto que las muestras provenían de un cultivo en medio acuoso y con cierta fuerza iónica, antes de ser inyectadas al cromatógrafo de gases debían seguir un tratamiento para desionizarlas, dado que las sales presentes podrían dañar al sistema tras repetidas inyecciones. Para ello se utilizó una mezcla de resinas de intercambio fuerte, una aniónica y otra catiónica.

### **Crecimiento de los cultivos**

Los cultivos de las cepas FY834 $\alpha$  (Wt) y FY18 (*adh6* $\Delta$ ) se crecieron en erlenmeyers de 500 ml con 250 ml de medio mínimo selectivo (MMS, descrito anteriormente). Como fuente de nitrógeno se utilizaron de forma independiente los aminoácidos leucina, isoleucina y tirosina a una concentración en el medio de cultivo de 2 g/l. Se prepararon cultivos saturados para ambas cepas crecidos en medio mínimo con sulfato amónico como fuente de nitrógeno, suplementado con todos los aminoácidos, y se utilizaron para hacer un inóculo inicial de una densidad óptica de 0.1 (a excepción del crecimiento con isoleucina como fuente de nitrógeno, donde el inóculo inicial fue de una densidad óptica de 0.25). El crecimiento se realizó a 30°C y 250 r.p.m y se recogieron muestras del cultivo a lo largo de la curva de crecimiento, se sedimentaron las células y el sobrenadante fue sometido al tratamiento de desionización.

### **Preparación de las resinas para desionización**

Se ha utilizado la resina catiónica Lewatit monoplus SP112 y la resina aniónica Lewatit MP600 WS, ambas de Bayer. Antes de su primera utilización estas resinas deben procesarse, empezando por una limpieza y siguiendo con su activación.

Se llenó un vaso de precipitados con una cuarta parte de resina y se añadió HCl 4-10 % para la resina catiónica (o NaOH 2-4% para la resina aniónica) hasta cubrir la resina. Se introdujo una varilla magnética y se dejó en agitación suave durante 30 minutos. Se decantó la solución y se repitió el proceso 4 veces. Para eliminar los restos de ácido o base se realizaron lavados con agua repetidas veces durante 15 minutos. Seguidamente, se filtró la resina y sobre el mismo filtro se repitieron los lavados con agua. Para finalizar, las resinas se secaron a 60 °C durante dos días.

### **Desionización de las muestras**

Las muestras recién recogidas, se trataron con una mezcla 1:1 de las resinas aniónica y catiónica. A una muestra de 9 ml de medio de cultivo se le añadió 1 ml de patrón interno ( 2-

pentanol, 2400 ppm) y el volumen se traspasó a un envase de vidrio. Se añadieron 80 mg de cada resina, se tapó para evitar la evaporación de los volátiles y con una varilla magnética, se agitó suavemente durante 1 hora para permitir el intercambio de iones. Se recuperó la muestra, se filtró (filtros de 0.22  $\mu\text{m}$ ) y se traspasó a un vial de cromatografía, donde se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la inyección.

### **Cromatografía de gases**

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5859 Series II acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar Hewlett Packard 5859X con extensión a masas 2000. La columna utilizada para la correcta separación de los volátiles estudiados fue la columna apolar HP-5MS de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de revestimiento. Se inyectaron 2  $\mu\text{l}$  de muestra a  $250^{\circ}\text{C}$  y para la separación de los volátiles se siguió el siguiente programa: temperatura inicial de  $35^{\circ}\text{C}$  mantenida durante 10 minutos, incremento de temperatura a  $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta  $270^{\circ}\text{C}$  y finalmente una isoterma a  $270^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos. La detección se realizó en el modo de impacto electrónico, primero en la modalidad de scan para identificar los compuestos de la muestra, y después, en la modalidad de SIM (single ion monitoring) en los iones 43, 55 y 57 para su cuantificación.

La utilización de patrones comerciales sometidos al mismo tratamiento de desionización, nos permitió establecer que el método era no-cuantitativo, por lo que no podíamos determinar exactamente la cantidad de alcoholes presentes en los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*. Sobre el cromatograma obtenido con los patrones tratados, se realizó una integración manual de los picos obtenidos, y las áreas de los picos, estandarizadas con el área del pico del patrón interno cromatográfico, resultaron proporcionales a la concentración del alcohol o aldehído inyectado. Por lo tanto, aunque no podíamos cuantificar exactamente los niveles de alcohol y aldehído producidos durante la fermentación de la levadura, sí podíamos realizar una comparación directa entre diferentes muestras.

### **Análisis de la proteína Adh6p en una cepa *adh1* $\Delta$**

Se ha estudiado la expresión de Adh6p midiendo la actividad de reducción dependiente de NADPH con aldehídos como el 3-metilbutanal y el veratraldehído, que son específicos para Adh6p. Los estudios se han realizados con las cepas FY834 $\alpha$  y FYA1 (isogénica a FY834 $\alpha$  pero delecionada para *ADH1*), cedida por la Dra. Eva González. También se ha analizado la

presencia de la proteína mediante el análisis por Western-blot y mediante el análisis en electroforesis en condiciones nativas revelado por tinción de actividad (descritos anteriormente).

Las cepas FY834 $\alpha$  (Wt) y FYA1 (*adh1* $\Delta$ ) se crecieron en erlenmeyers de 500 ml con 200 ml de medio YPD. Los inóculos iniciales de aproximadamente 0.1 de densidad óptica se crecieron a 30°C y 250 r.p.m., y se tomaron muestras del cultivo a diferentes puntos de la curva de crecimiento. Las células de levadura se sedimentaron por centrifugación (10 min a 4000 r.p.m.) y se guardaron a -80°C hasta su análisis.

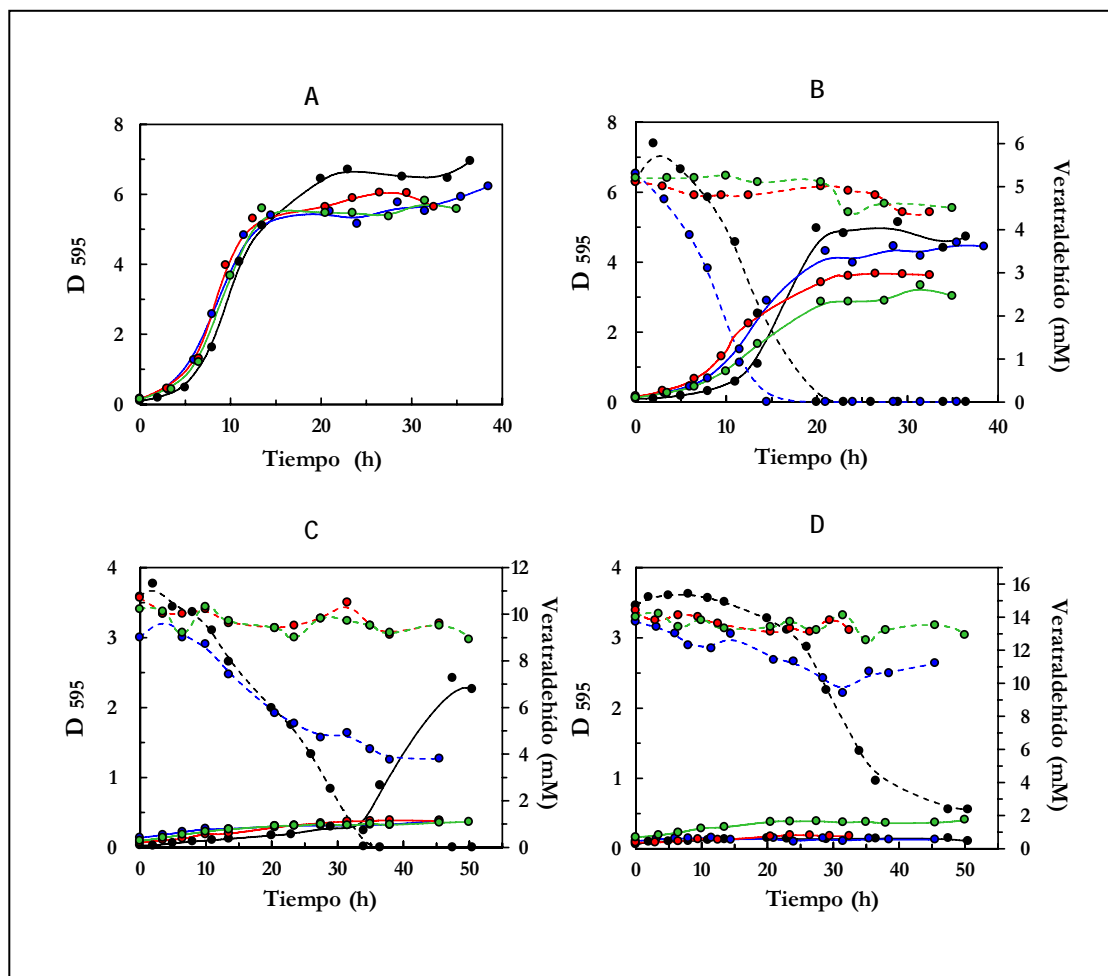
#### **Análisis de la expresión de Adh6p en electroforesis en condiciones nativas**

Los lisados obtenidos se sometieron a una electroforesis en acrilamida en condiciones nativas. En cada carril se cargaron 100  $\mu$ g de proteína total para cada homogenado. Las proteínas separadas en un gel de acrilamida al 6% se sometieron al revelado por tinción de actividad de oxidación (descrito anteriormente).

## Resultados

### Crecimiento en presencia de veratraldehído

En el Capítulo I de esta Tesis se ha analizado la contribución de Adh6p en la desintoxicación de aldehídos dañinos para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, como el veratraldehído. Puesto que Adh7p presenta una identidad del 64% con Adh6p y su especificidad de sustrato es muy similar, decidimos estudiar su capacidad como enzima desintoxicador. Para ello se hicieron crecimientos de las cepas BJ2168 (Wt), BJ18 (*adh6*Δ), BJ05 (*adh7*Δ) y BJ1805 (*adh6*Δ*adh7*Δ) en medio rico en presencia de diferentes concentraciones de veratraldehído (0, 5, 10 y 15 mM). El seguimiento del crecimiento, así como la concentración de veratraldehído presente en los cultivos se muestra en la Figura 1. A 5 mM de aldehído ya vemos cómo el crecimiento de las cepas deficientes en Adh6p es inferior al control. En la cepa doble mutante el efecto es más marcado. En cuanto a la concentración de veratraldehído, sólo las cepas que presentaban deficiencia en Adh6p fueron incapaces de eliminarlo. Cuando aumentamos la concentración de veratraldehído en el medio de cultivo a 10 mM, podemos apreciar una ligera participación por parte de Adh7p. Este efecto no es sólo notable en el crecimiento, donde sólo la cepa Wt fue capaz de crecer una vez hubo eliminado todo el aldehído del medio, sino que a nivel de eliminación de veratraldehído, la cepa Wt eliminó todo el tóxico pero sin embargo la cepa *adh7*Δ, aunque eliminó parte del tóxico, no pudo deshacerse totalmente de él. A 15 mM de veratraldehído es evidente que Adh7p también juega un papel en la desintoxicación del veratraldehído, aunque no es tan notable como el de Adh6p. A ésta concentración tan elevada de tóxico, ninguna de las cepas pudo llevar a cabo el crecimiento y tan sólo la cepa Wt pudo degradar parte del veratraldehído del medio, indicando de esta manera que la falta de Adh7p en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* provoca un deterioro en su sistema de defensa frente al estrés provocado por dicho aldehído.



**Figura 1:** Análisis del crecimiento de las cepas Wt (negro), *adh6*Δ (rojo), *adh7*Δ (azul) y *adh6*Δ*adh7*Δ (verde) en medio YPD suplementado con varias concentraciones de veratraldehído. La curva de crecimiento (líneas sólidas) y la concentración de veratraldehído (líneas discontinuas) se muestran en las cuatro condiciones testadas: 0 mM veratraldehído (A), 5 mM veratraldehído (B), 10 mM veratraldehído (C) y 15 mM veratraldehído (D).

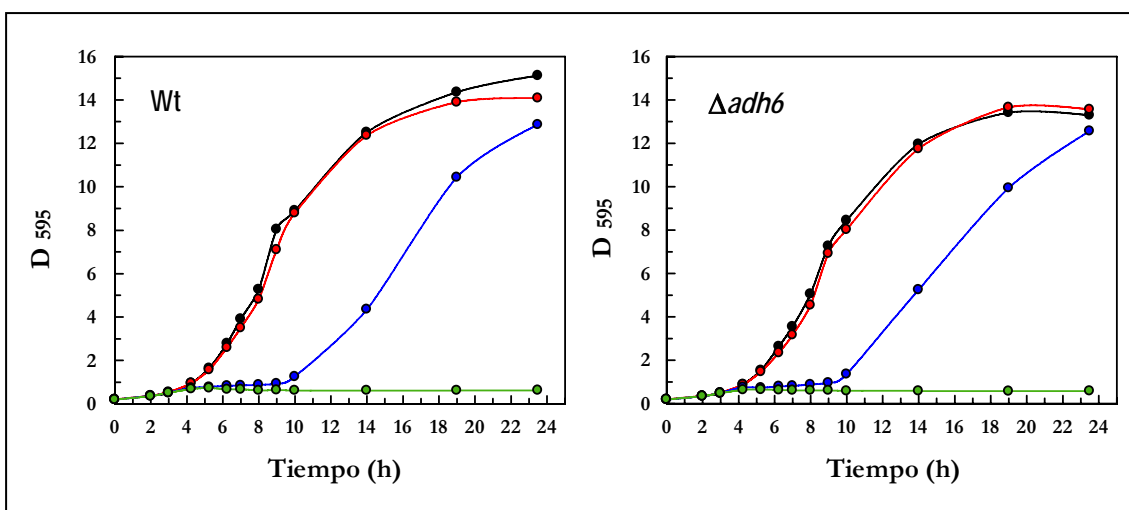
## Estudios en condiciones de estrés oxidativo

### Agente inductor: diamida

En la bibliografía se pueden encontrar trabajos que estudian el estrés oxidativo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diamida como agente inductor. La concentración de diamida utilizada para generar el estrés oxidativo varía entre 0.5 mM y 2.5 mM dependiendo de la cepa utilizada en el estudio [Nguyen et al., 2001; Thorpe et al., 2004]. Para establecer la concentración de diamida que se utilizaría en los estudios de expresión de Adh6p, se realizaron unas curvas de crecimiento para las cepas FY834α (Wt) y FY18 (*adh6*Δ) utilizando diferentes concentraciones del agente inductor.



Se crecieron cultivos de 50 ml de YPD a los que se les provocó el estrés oxidativo cuando la fase exponencial acababa de arrancar. Tal y como muestra la figura 2, a medida que aumenta la concentración de diamida, el crecimiento celular se ve afectado ya que se aprecia un retraso respecto al cultivo control sin diamida. Es más, a una concentración de 2 mM se inhibe completamente el crecimiento. No se apreciaron diferencias en el crecimiento de las cepas estudiadas, indicando que el papel que Adh6p pueda tener en el proceso de defensa frente al estrés oxidativo no tiene un efecto directo en el crecimiento ya que su ausencia no ha impedido a la levadura mantener un comportamiento similar al de la cepa control.

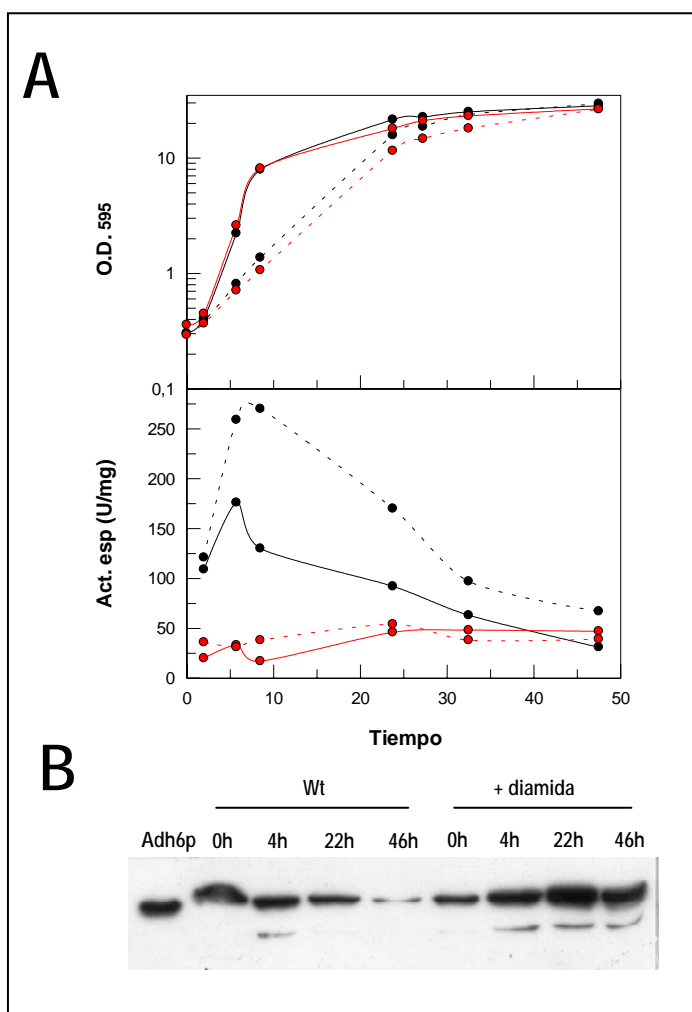


**Figura 2:** Seguimiento del crecimiento de la cepa control FY834 $\alpha$  (Wt) y la cepa mutante FY18 ( $adh6\Delta$ ) a las que se le ha adicionado diamida a diferentes concentraciones: 0 mM (negro), 0.5 mM (rojo), 1 mM (azul) y 2 mM (verde).

Para los estudios comparativos de expresión se provocó un estrés oxidativo a 1.5 mM de diamida ya que a esta concentración de agente inductor se apreciaba el retraso más marcado en el crecimiento de la levadura. Se realizaron curvas de crecimiento para las cepas FY834 $\alpha$  (Wt) y FY18 ( $adh6\Delta$ ), cada una de ellas crecida en YPD como control y YPD al que se le añadió 1.5 mM de diamida. Se recogieron muestras de cada cultivo en diferentes fases del crecimiento (exponencial temprana, exponencial y estacionaria) y se analizó la actividad cinamaldehído reductasa dependiente de NADPH y los niveles de proteína Adh6p mediante Wester-blot.

En la Figura 3 se muestran los resultados del análisis. En la figura 3A vemos como los crecimientos de las dos cepas en presencia de diamida son idénticos. Por lo tanto la deficiencia de Adh6p en condiciones de estrés oxidativo no le causa a la célula ninguna alteración en su crecimiento. En cuanto a las actividades específicas, el estrés oxidativo causado por la diamida incrementa en aproximadamente un factor de 2-3 la actividad cinamaldehído reductasa dependiente de NADPH, tal como se observa al comparar los dos cultivos de la cepa Wt. Así mismo, cabe destacar que dicha inducción en la actividad es máxima durante la fase

exponencial y decae a medida que el cultivo entra en fase estacionaria. En los cultivos con la cepa *adh6* $\Delta$ , no sólo los valores de actividad son 5-10 veces menores, ratificando que Adh6p es la principal responsable de la actividad cinamaldehído reductasa dependiente de NADPH en *Saccharomyces cerevisiae* [Larroy et al., 2002a], sino que además, no es apreciable ningún incremento en la actividad específica determinada con lo que podríamos deducir que la inducción de la actividad cinamaldehído reductasa dependiente de NADPH que hemos detectado en la cepa Wt es sólo debida a que Adh6p está siendo inducida.



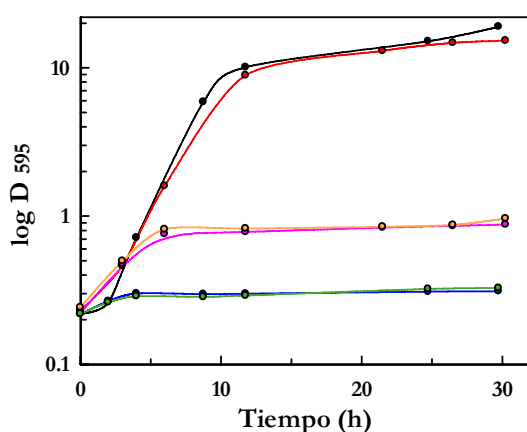
**Figura 3:** Curvas de crecimiento y patrón de expresión de Adh6p para las cepas Wt y *adh6* $\Delta$  en presencia de 1.5 mM diamida. (A) Cinética del crecimiento de las cepas Wt (negro) y  $\Delta$ adh6 (rojo) en medio YPD (líneas sólida) y medio YPD al que se le ha adicionado diamida (línea discontinua). La actividad específica se determinó con cinamaldehído 1 mM y NADPH 0.5 mM a pH 7.0. (B) Lisados de las muestras tomadas a diferentes tiempos de crecimiento, sometidos a SDS-PAGE al 12% de acrilamida, y transferidos a una membrana de Inmobilon-P. La membrana se incubó con anticuerpo anti-Adh6p y la detección se realizó por quimioluminiscencia.

En la figura 3B se observa que los niveles de Adh6p intracelulares han incrementado tras el tratamiento con diamida. No obstante, el pico de máxima actividad específica en la cepa Wt se ha detectado entre las 3 y las 6 horas de tratamiento, mientras que el western-blot revela un incremento en los niveles de Adh6p máximo a las 24 horas de tratamiento. Más aun, a las 6 horas de tratamiento los niveles de proteína son muy similares en ambos cultivos cuando las actividades específicas son 170 mU/mg en la cultivo control y 270 mU/mg en el cultivo tratado

con diamida. Esto nos estaría indicando que la actividad cinamaldehído reductasa NADPH-dependiente aumenta rápidamente como consecuencia del estrés oxidativo provocado, sin embargo esta respuesta no sigue un paralelismo con la cantidad de proteína Adh6p presente en la célula. Dado que se ha demostrado que el aumento de la actividad analizada es únicamente debida a Adh6p, estos resultados implicarían un mecanismo de regulación post-traducciona. De hecho, en la fase estacionaria del cultivo tratado, la cantidad de proteína detectada específicamente con anticuerpos anti-Adh6p es 5-10 veces superior a la detectada al iniciarse el tratamiento pero, sin embargo, las actividades específicas encontradas son muy similares.

### Agente inductor: menadiona

La menadiona es un conocido agente inductor del estrés oxidativo [Zadzinski et al., 1998]. Al igual que para los estudios realizados con diamida primero se ensayó la concentración adecuada del inductor para las cepas de trabajo ya que la bibliografía nos daba un amplio margen dependiendo de la cepa utilizada. Desde concentraciones del orden de  $\mu\text{M}$  [Cyrne et al., 2003] pasando por 1 mM [Gasch et al., 2000] hasta 30 mM [Singh, K.K., 2000]. Se crecieron 6 cultivos de la cepa Wt en YPD y una vez hubo arrancado el crecimiento, se añadió menadiona a diferentes concentraciones. En la figura 4 se puede ver como a medida que aumenta la concentración de menadiona el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ve afectado como consecuencia del estrés oxidativo provocado.



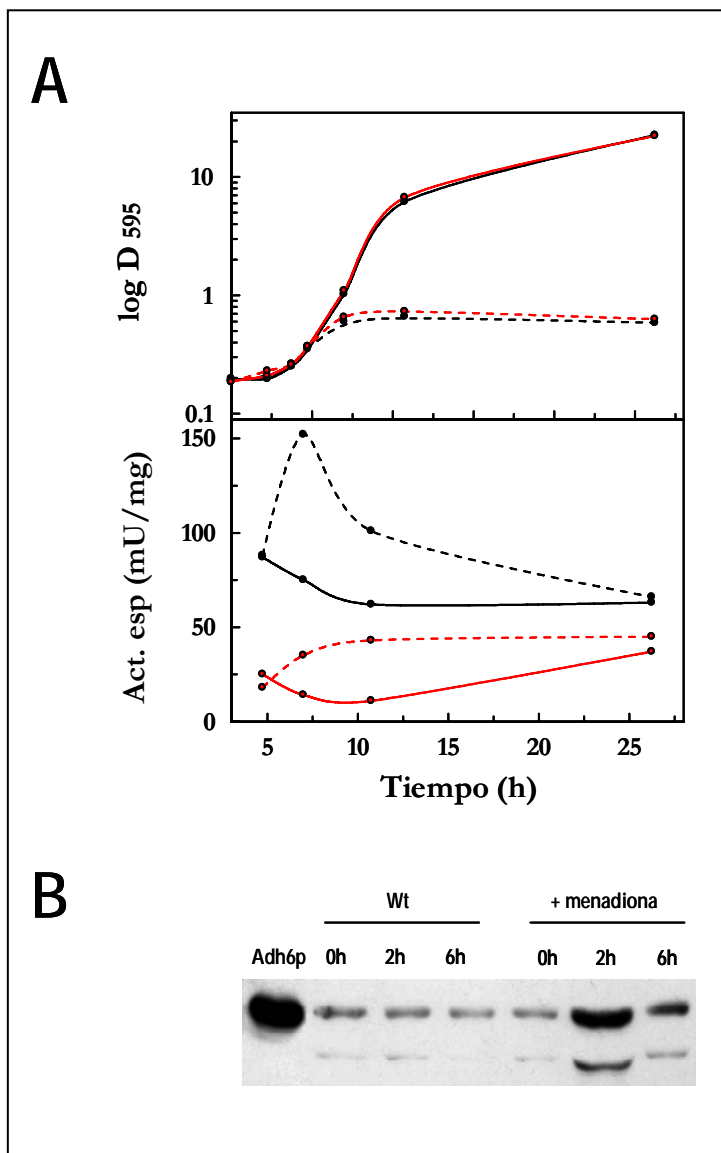
**Figura 4:** Seguimiento del crecimiento de la cepa FY834 $\alpha$  (Wt) crecida en medio YPD al que se le ha añadido menadiona a diferentes concentraciones: 0 mM (negro), 0.1 mM (rojo), 0.25 mM (rosa), 0.5 mM (naranja), 2 mM (azul) y 10 mM (verde).

Para los estudios comparativos de expresión de Adh6p se utilizó una concentración de menadiona de 0.2 mM en el cultivo. Se realizaron curvas de crecimiento para las cepas FY834 $\alpha$  (Wt) y FY18 (*adh6* $\Delta$ ), cada una de ellas crecidas en YPD (cultivo control) y en YPD/menadiona. Se realizó un seguimiento de la densidad del cultivo y se recogieron muestras

a lo largo de toda la curva para analizar la actividad específica cinamaldehído reductasa dependiente de NADPH y los niveles de Adh6p presentes en la célula.

La figura 5 muestra los resultados obtenidos. Al igual que para el estrés oxidativo provocado por la diamida, la menadiona no alteró el crecimiento de la cepa mutante. Es decir, la deficiencia de *ADH6* no repercute directamente en el crecimiento de la levadura (figura 5A). Los resultados de las actividades específicas muestran un claro pico de inducción para la cepa Wt en presencia de menadiona. Tomando la cepa *adh6Δ* como control, podemos ver que no hay inducción de la actividad cinamaldehído reductasa dependiente de NADPH, en consecuencia, la inducción que se aprecia en la cepa Wt ha de ser debida a la presencia de *ADH6* y su producto génico. La inducción de la actividad que realiza Adh6p alcanza un factor de 2 en la fase exponencial pero recupera los valores del cultivo control al llegar a saturación.

El análisis de los niveles de Adh6p (figura 5B) se corresponden con los datos de la actividad específica. En el western-blot se aprecia un claro incremento de Adh6p a las 2 horas de tratamiento, coincidiendo con el pico de máxima actividad específica. A las 6 horas de cultivo todavía se aprecia un ligero incremento que también es apreciable en forma de actividad cinamaldehído reductasa. A diferencia de los resultados encontrados para el agente inductor diamida, los resultados obtenidos con menadiona siguen un perfecto paralelismo entre la actividad encontrada y los niveles de proteína detectados. Hay una inducción de *ADH6* que se traduce en un incremento de su producto génico, Adh6p, y en un aumento de la actividad reductasa dependiente de NADPH. Aunque la adición de menadiona a los cultivos provoca una alteración del crecimiento que no se recupera con el tiempo, los efectos sobre *ADH6* y Adh6p se limitan a los primeros estadios del estrés. Sin embargo, el comportamiento de la levadura en presencia de diamida es opuesto. El retardo que se produce en el crecimiento de las cepas en presencia de diamida genera un aumento de la actividad reductasa dependiente de NADPH que, al igual que la curva de crecimiento, recupera la normalidad después del choque oxidativo. Sin embargo, los niveles de Adh6p no sólo aumentan al iniciarse la respuesta contra el estrés oxidativo, sino que continua acumulándose en la célula proteína con una baja actividad específica (figura 5B).

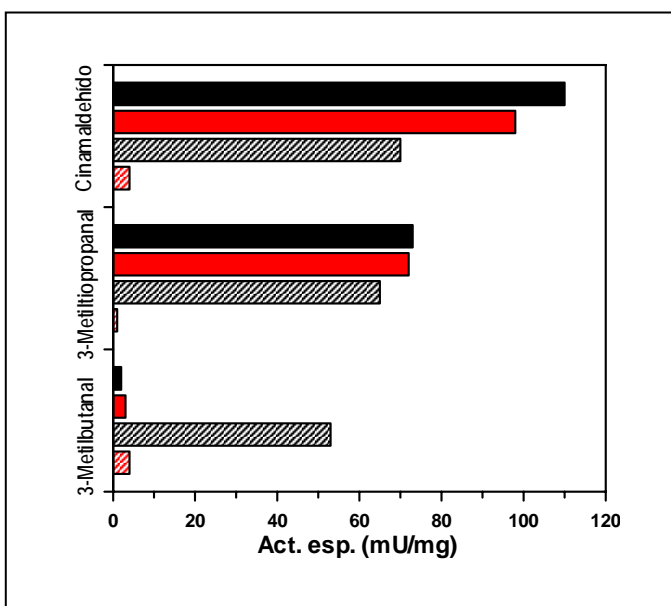


**Figura 5:** Curvas de crecimiento y patrón de expresión de Adh6p para las cepas Wt y *adh6Δ* en presencia de menadiona 0.2 mM. (A) Cinética del crecimiento de las cepas Wt (negro) y *adh6Δ* (rojo) en medio YPD (líneas sólidas) y medio YPD al que se le ha adicionado menadiona (línea discontinua). La actividad específica se determinó con cinamaldehído 1 mM y NADPH 0.5 mM a pH 7.0. (B) Lisados de las muestras tomadas a diferentes tiempos de crecimiento, sometidos a un SDS-PAGE al 12% de acrilamida y transferidos a una membrana de Inmobilon-P. La membrana se incubó con anticuerpo anti-Adh6p y la detección se realizó por quimioluminiscencia.

## Estudio comparativo de la actividad reductasa en la cepa silvestre y la cepa *adh6Δ*

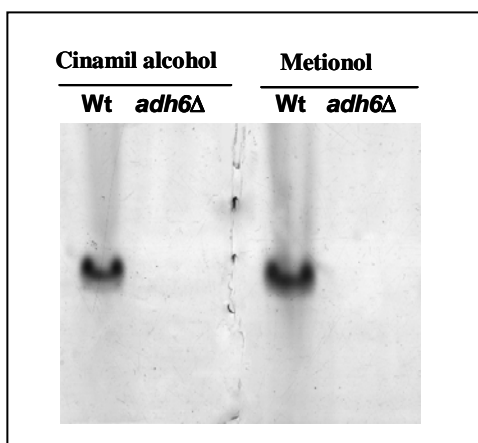
Para establecer la participación de Adh6p en la actividad celular reductasa dependiente de NADP(H) se analizó dicha actividad con varios aldehídos en las cepas FY834α (Wt) y FY18 (*adh6Δ*) crecidas en medio rico (YPD). Las actividades específicas encontradas en los extractos de ambas cepas demuestran que Adh6p es la responsable de prácticamente toda la actividad reductasa dependiente de NADP(H) para el cinamaldehído, 3-metilbutanal y 3-metiltiopropanal (figura 6). Tanto el cinamaldehído como el 3-metiltiopropanal son aldehídos que pueden ser reducidos con una eficiencia similar, por deshidrogenasas con dependencia para el coenzima

NADH. Sin embargo, el 3-metilbutanal es únicamente reducido por enzimas dependientes de NADPH. Además, Adh6p sería el enzima responsable de más del 90% de dicha reducción en las condiciones analizadas.



**Figura 6:** Actividades específicas de reducción en extractos de levadura para las cepas FY834α (Wt), en negro y FY18 (*adh6Δ*), en rojo. Se han medido las actividades dependientes de coenzima NADH (barras sólidas) y NADPH (barras con trama en diagonal).

Para confirmar este hecho, se realizó una electroforesis en condiciones nativas con los extractos de las cepas Wt y *adh6Δ*. Para identificar las proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* activas con 3-metiltiopropanol (metionol) y NADP<sup>+</sup> como coenzima, se realizó una tinción de oxidación con dichos sustratos, utilizando como control una tinción con cinamil alcohol y coenzima NADP<sup>+</sup>, que es un buen sustrato para Adh6p.



**Figura 7:** Gel nativo revelado con tinción de oxidación dependiente de NADP<sup>+</sup> con cinamil alcohol y metionol. Se han analizado 100μg de extracto de las cepas FY834α (Wt) y FY18 (*adh6Δ*)

Como se observa en la figura 7, la tinción con cinamil alcohol tiñó a Adh6p (banda ausente en la cepa *adh6Δ*) de forma exclusiva, al igual que ocurrió con la tinción con metionol. Por lo tanto, Adh6p es la proteína responsable de la oxidación y, dada la reversibilidad de la reacción, la reducción de los correspondientes aldehídos. Además el gel nativo no revela

ninguna otra proteína con actividad dependiente de  $\text{NADP}^+$  con estos sustratos. Por lo tanto, Adh6p sería el único enzima implicado en la oxidación/reducción dependiente de  $\text{NADP(H)}$  de estos alcoholes/aldehídos en las condiciones empleadas, tal y como ya indicaban las actividades específicas encontradas en ambas cepas (figura 6).

### **Análisis del papel Adh6p en el metabolismo de los alcoholes superiores**

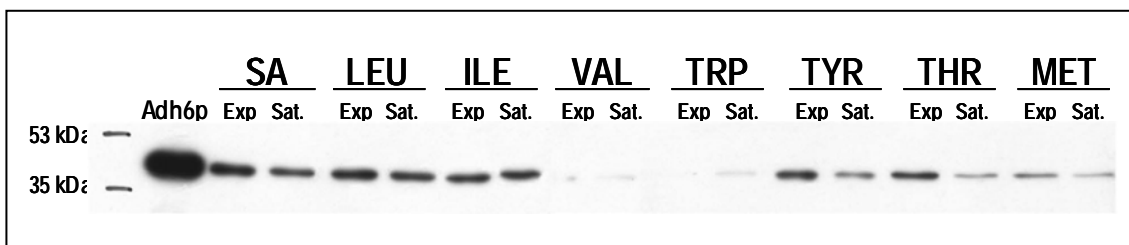
Dentro de los sustratos empleados por Adh6p (Larroy et al., 2002a; Larroy et al., 2002b) nos ha llamado la atención los alcoholes y aldehídos alifáticos lineales y ramificados como pentanal, hexanal, 2-metilpropanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal que además de ser muy buenos sustratos para el enzima ( $k_{\text{cat}}/K_M$  del orden de  $100,000\text{-}400,000 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ), son productos que se encuentran en la levadura como resultado de la fermentación alcohólica. Los datos de actividad específica y las constantes catalíticas obtenidas nos hicieron pensar que Adh6p podría tener cierta importancia en el metabolismo de estos volátiles. Además, las actividades dependientes de  $\text{NADP(H)}$  encontradas en los extractos de la cepa Wt con aldehídos o alcoholes de la ruta de producción de alcoholes superiores (Figura 6 de la Introducción) demuestran que éstas son debidas prácticamente en su totalidad a Adh6p, dado que disminuyen drásticamente en la cepa *adh6Δ*. El catabolismo de los aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae* pasa por una transaminación, seguida de una descarboxilación para finalizar con la reducción de los aldehídos resultantes a sus correspondientes alcoholes. Sería en esta última etapa donde esperamos que Adh6p pueda ejercer una de sus posibles funciones *in vivo*.

Para incrementar la participación de las vías catabólicas de los aminoácidos en el metabolismo de la levadura, se utilizó un medio de cultivo en el que la única fuente de nitrógeno provenía del aminoácido proporcionado. Los productos derivados de estas vías asimiladoras de nitrógeno son alcoholes con unas propiedades aromáticas de gran relevancia en las fermentaciones alcohólicas de bebidas como el vino, el cava, la cerveza, ...etc [Van Nedervele et al., 1997; Vuralhan et al., 2003]. Sin embargo, los aldehídos precursores son compuestos con características poco deseables y con un bajo umbral de detección. Estos alcoholes y aldehídos se pueden determinar mediante la cromatografía de gases y nos propusimos intentar establecer la participación de Adh6p en estas vías catabólicas desde diferentes puntos de vista. Partiendo de cultivos crecidos con una determinada fuente de nitrógeno, intentamos detectar si se producía una inducción en los niveles de proteína Adh6p. También se estudió si la delección de *ADH6* tenía un fenotipo claro en el crecimiento y si había diferencias en la composición de volátiles entre una cepa Wt y otra *adh6Δ*.

## 1) Niveles de Adh6p:

Se crecieron cultivos para la cepa FY834 $\alpha$  (Wt) de 250 ml de medio mínimo selectivo con glucosa como fuente de carbono y el aminoácido escogido, como fuente de nitrógeno. Se llevó a cabo un seguimiento de la curva de crecimiento y se tomaron muestras de las células en dos etapas del crecimiento (exponencial-temprana y saturación). Las células se lisaron y se analizaron los niveles de Adh6p mediante detección específica con anticuerpos anti-Adh6p.

Las muestras fueron sometidas a un SDS-PAGE al 12% de acrilamida que se transfirió a una membrana de Inmobilon-P. La detección específica de Adh6p se muestra en la figura 8. Tomando el cultivo crecido en sulfato amónico como control, se observa como la fuente de nitrógeno suministrada al cultivo provoca diferentes patrones de expresión de Adh6p. Al crecer la levadura con leucina o isoleucina como fuente de nitrógeno, los niveles de Adh6p son muy similares a los encontrados en las condiciones control. Para el resto de los aminoácidos analizados se ha encontrado una disminución en los niveles de Adh6p. Para los cultivos crecidos con tirosina o treonina se observa una ligera disminución, que es más clara cuando el aminoácido empleado es la metionina. Cuando la valina o el triptófano son la fuente de nitrógeno, prácticamente no se detecta Adh6p.



**Figura 8:** Análisis por Western-blot de las muestras recogidas en los cultivos crecidos con diferentes fuentes de nitrógeno. La muestra Exp está tomada en la fase exponencial-temprana mientras que la muestra Sat. se recogió al inicio de la fase de saturación. 5  $\mu$ g de proteína total procedente de los lisados celulares se sometieron a SDS-PAGE al 12% de acrilamida que fue transferido a una membrana de Inmobilon-P. La detección específica de Adh6p se reveló por quimioluminiscencia.

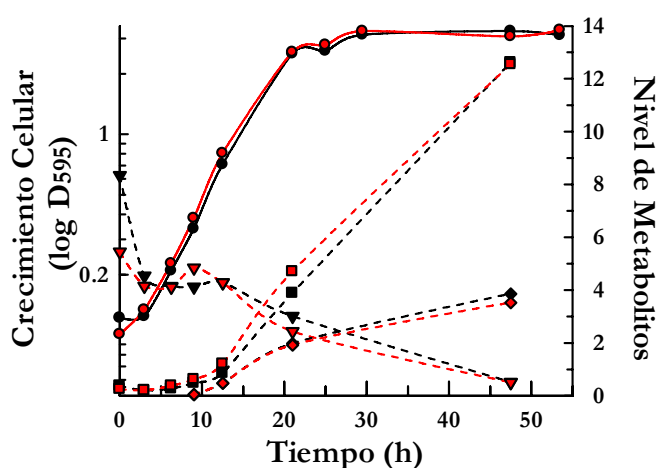
## 2) Niveles de volátiles:

Se crecieron las cepas FY834 $\alpha$  (Wt) y FY18 (*adh6* $\Delta$ ) en cultivos de 250 ml de medio mínimo selectivo con glucosa como fuente de carbono y leucina, isoleucina o tirosina como fuente de nitrógeno. Se realizó un seguimiento de la curva de crecimiento y se tomaron muestras del medio líquido a diferentes puntos de la curva. Las muestras fueron tratadas inmediatamente



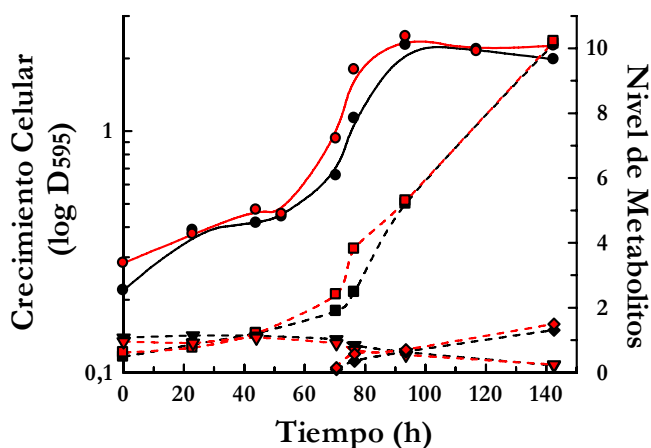
después de su recolección para evitar, en la medida de lo posible, la pérdida de los volátiles y fueron congeladas hasta el momento de ser analizadas por cromatografía de gases en el *Servei d'Anàlisi Química* de la UAB.

La figura 9 corresponde al análisis de volátiles de los cultivos de las cepas *Wt* y *adh6Δ* crecidos en medio mínimo selectivo con glucosa como fuente de carbono y leucina como única fuente de nitrógeno. Como producto derivado de la asimilación del nitrógeno proporcionado por la leucina, se genera el esqueleto carbonado de dicho aminoácido. Tras una descarboxilación se forma mayoritariamente el 3-metilbutanal que pasará a su correspondiente alcohol, el 3-metilbutanol. Ambas cepas siguieron una fermentación similar dado que los niveles de etanol son idénticos a lo largo de toda la curva de crecimiento. El 3-metilbutanal es el producto mayoritario al inicio del crecimiento, pero a medida que pasa el tiempo, todo el aldehído es convertido en 3-metilbutanol. Sorprendentemente, la cuantificación realizada no reveló ninguna diferencia entre ambas cepas.



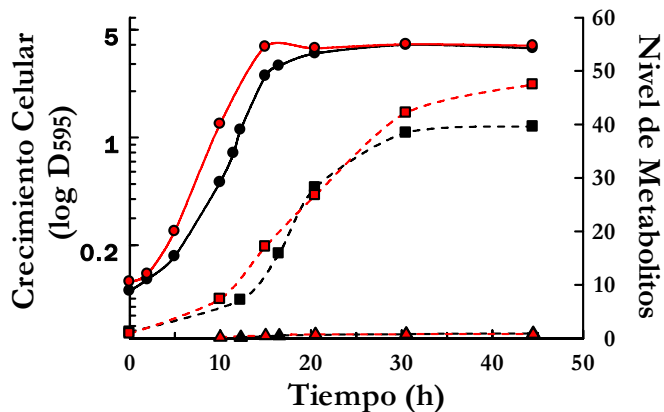
**Figura 9:** Niveles de volátiles en las cepas FY834 $\alpha$  (*Wt*, en negro) y FY18 (*adh6Δ*, en rojo) crecidos con leucina como fuente de nitrógeno. El crecimiento está representado por círculos. Los compuestos analizados por cromatografía de gases se muestran en unidades arbitrarias: etanol (cuadrados), 3-metilbutanal (triángulos invertidos) y 3-metilbutanol (diamantes).

La Figura 10 corresponde al análisis de volátiles para las cepas *Wt* y *adh6Δ* crecidos con isoleucina como única fuente de nitrógeno. En este caso, el aldehído que se produce mayoritariamente al asimilar el nitrógeno proveniente de la isoleucina es el 2-metilbutanal que la levadura reducirá a 2-metilbutanol. Se puede apreciar como todo el aldehído 2-metilbutanal presente en la fase inicial del crecimiento es reducido a 2-metilbutanol. No obstante, al igual que para el crecimiento con leucina, no se apreciaron diferencias en los niveles de volátiles de ambas cepas.



**Figura 10:** Niveles de volátiles en las cepas FY834 $\alpha$  (Wt, en negro) y FY18 (*adh6* $\Delta$ , en rojo) crecidas con isoleucina como fuente de nitrógeno. El crecimiento está representado por círculos. Los compuestos analizados por cromatografía de gases se muestran en unidades arbitrarias: etanol (cuadrados), 2-metilbutanal (triángulos invertidos) y 2-metilbutanol (diamantes).

La figura 11 se corresponde con el análisis de volátiles realizado para las cepas Wt y *adh6* $\Delta$  en medio mínimo selectivo donde la fuente de nitrógeno sólo proviene del aminoácido tirosina. La asimilación del grupo amonio de este aminoácido produce *p*-hidroxifenilacetaldehído que la levadura reduce a tirosol que puede ser excretado al medio por la célula. En este caso fue imposible detectar el aldehído producido, sin embargo, si se pudo analizar el tirosol producido durante el crecimiento. Los niveles de tirosol no presentaban diferencias entre ambas cepas.



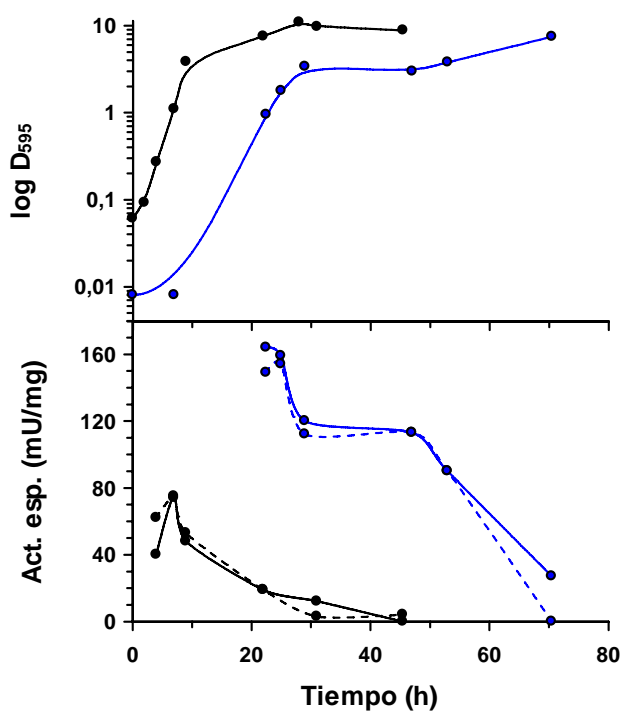
**Figura 11:** Niveles de volátiles en las cepas FY834 $\alpha$  (Wt, en negro) y FY18 (*adh6* $\Delta$ , en rojo) crecidas con tirosina como fuente de nitrógeno. El crecimiento está representado por círculos. Los compuestos analizados por cromatografía de gases se muestran en unidades arbitrarias: etanol (cuadrados), tirosol (triángulos).

### Análisis de la proteína Adh6p en una cepa *adh1* $\Delta$

Los estudios realizados por Evellin y colaboradores con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* han demostrado que la ausencia del gen *ADH1* genera un aumento de la actividad aldehído reductasa dependiente de NADPH con los aldehídos hexanal y 3-metilbutanal [Evellin et al., 1999]. Sin embargo, se desconocen las proteínas responsables de dicha actividad. Dado que ambos aldehídos analizados son sustratos eficientes para Adh6p, hemos investigado la

posibilidad de que esta inducción en cepas *adh1Δ* sea debida a la inducción de la actividad reductasa de Adh6p.

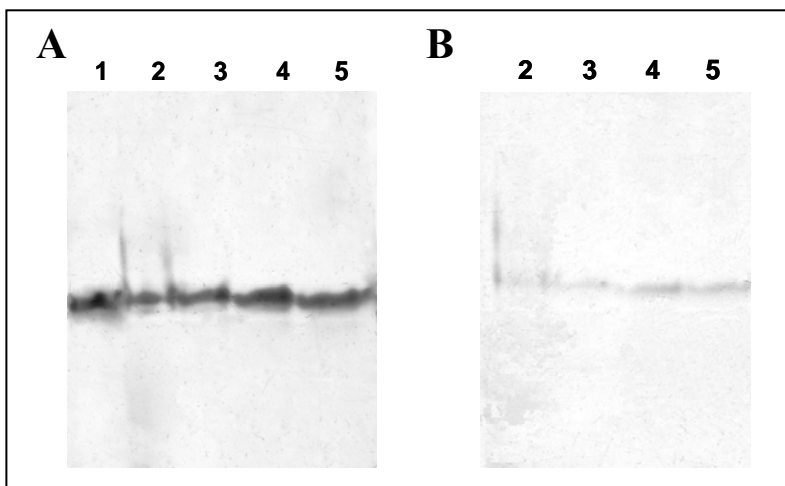
Se han realizado curvas de crecimiento para las cepas FY834 $\alpha$  (Wt) y FYA1 (*adh1Δ*) y se han tomado muestras tanto en la fase exponencial como en la fase de saturación. En cada punto se ha analizado la actividad específica dependiente de NADPH para los aldehídos veratraldehído y 3-metilbutanal para los que se ha demostrado con anterioridad que son sustratos específicos para Adh6p en la levadura. La figura 12 muestra los crecimientos de ambas cepas, que siguieron un perfil muy similar aunque la cepa *adh1Δ* tuvo una fase de latencia superior a la cepa control y llegó a una densidad óptica final algo inferior a la de la cepa control. Las actividades específicas realizadas con NADPH como coenzima muestran claramente como la cepa *adh1Δ* tiene valores más elevados, aproximadamente un factor 2 en la fase exponencial. Es más, la actividad de reducción dependiente de NADPH se mantiene a lo largo de la fase de saturación, cosa que no ocurre en la cepa Wt dado que la actividad de Adh6p en condiciones estándar desaparece en este punto.



**Figura 12:** Curvas de crecimiento y patrón de la expresión de la actividad específica dependiente de NADPH de las cepas FY834 $\alpha$  (Wt), en negro y FYA1 (*adh1Δ*), en azul. Las actividades se midieron a pH 7.0, con 0.5mM de NADPH y 1 mM de veratraldehído (líneas sólidas) o 3-metilbutanal (líneas discontinuas).

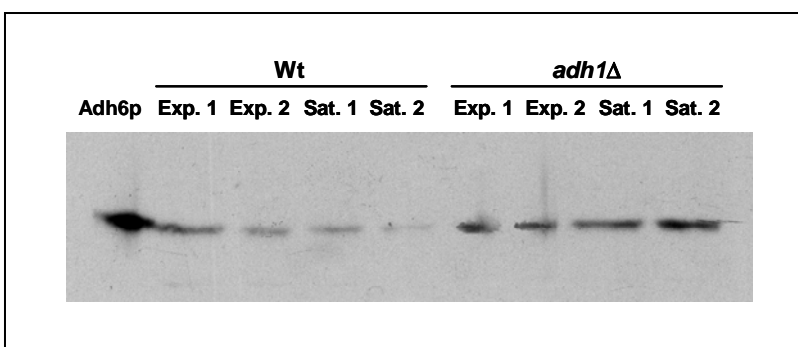
En la figura 13 se muestra el gel nativo revelado por actividad de oxidación con 3-metilbutanol y NADP<sup>+</sup> (figura 13A), y etanol y NADP<sup>+</sup> (figura 13B). Las muestras procesadas corresponden a la fase exponencial del crecimiento, donde la actividad está inducida en un factor de 2. Este factor de la inducción es visible en el gel, y dado que no han aparecido otras bandas además de la correspondiente a Adh6p, podemos deducir que la inducción de la

actividad es específica para Adh6p. Además, Adh6p sería el único enzima capaz de oxidar el etanol empleando el coenzima NADP<sup>+</sup> en estas condiciones.



**Figura 13:** Gel nativo revelado con tinción de oxidación dependiente de NADP<sup>+</sup> con 3-metilbutanol (A) y etanol (B). Se han analizado 100µg de extracto de las cepas FY834α (Wt) en fase exponencial (carriles 2 y 3) y FYA1 (*adh1Δ*) en fase exponencial (carriles 4 y 5). En el carril 1 se ha cargado Adh6p pura como control.

En la figura 14 se muestra la detección específica de Adh6p mediante anticuerpos, de los extractos de las cepas Wt y *adh1Δ* con muestras representativas de toda la curva de crecimiento. Este resultado confirma la inducción de Adh6p en la cepa *adh1Δ*. En esta cepa también se confirma que Adh6p está presente en la fase de saturación del crecimiento, en contraste con la cepa Wt en la que generalmente Adh6p se degrada al inicio de la fase de saturación [Larroy et al., 2003].



**Figura 14:** Análisis por Western-blot de las muestras recogidas en los cultivos de las cepas FY834α (Wt) y FYA1 (*adh1Δ*). 5 µg de proteína total se han sometido a la detección específica de Adh6p. El revelado se realizó con quimioluminiscencia.

## Discusión

La lignina, palabra que proviene del término latino *lignum* que significa ‘madera’, representa el 20-30% del peso seco de la madera y es una macromolécula compleja compuesta de unidades fenilpropano que se origina de la polimerización oxidativa aleatoria de cinamil alcoholes hidroxilados. Dado que la mayoría de microorganismos no son capaces de emplear la lignina como única fuente de carbono, en la industria se realiza un pretratamiento que degrada parcialmente el polímero, seguido de tratamiento microbiano, con el objetivo de utilizar su biomasa. Durante el pretratamiento mediante hidrólisis ácida del material lignocelulósico previo a la fermentación microbiana, una parte de la lignina es degradada a una gran variedad de compuestos aromáticos que actúan como toxinas biológicas que retardan la fermentación de la levadura. Son muchos los trabajos sobre la acción fungicida en estos compuestos derivados del tratamiento de la biomasa lignocelulósica llegando a la conclusión que los alcoholes aromáticos son menos tóxicos que sus ácidos correspondientes que a su vez lo son menos que sus correspondiente aldehídos [Zemec et al., 1987, Zaldivar et al., 1999 y Larsson et al., 2000]. El veratraldehído (3,4-metoxibenzaldehído) que deriva de la hidrólisis de la lignina, es un conocido inhibidor del crecimiento de la levadura [Kim et al., 2004]. En el Capítulo I [Larroy et al., 2002a] ya se ha demostrado que la eliminación de veratraldehído en la levadura la realiza *Adh6p*. No obstante, la alta identidad de secuencia con *Adh7p* (un 64%), la gran similitud en la especificidad de sustratos que ambas enzimas utilizan y la dependencia del coenzima NADP(H) requerido para la eliminación del veratraldehído, nos hizo postular que *Adh7p* también podría tener cierta relevancia en dicho proceso.

La construcción de cepas mutantes deficientes en *ADH6*, *ADH7* o *ADH6* y *ADH7* permitió evaluar la participación de cada proteína. El estudio del crecimiento de estas cepas en presencia de veratraldehído, así como su capacidad para reducirlo a veratril alcohol (resumido en la Figura 1, página 86) enfatiza el papel de *Adh6p* en la eliminación de este tóxico. El comportamiento de las cepas *adh6Δ* y *adh6Δadh7Δ* es prácticamente idéntico dado ninguna de las dos es capaz de disminuir la concentración de aldehído en el medio. No obstante, *Adh7p* también contribuiría a rebajar los niveles de veratraldehído del medio ya que, aunque la cepa *adh7Δ* es capaz de eliminar el aldehído completamente cuando la concentración es baja (Figura 1B), al aumentar la cantidad de tóxico en la célula no se llega a la completa eliminación del aldehído presente, tal y como sí lo consigue la cepa Wt (Figura 1C). Incluso a concentraciones del orden de 15 mM de veratraldehído, la cepa *adh7Δ* tiende a comportarse como las cepas mutantes *adh6Δ* y *adh6Δadh7Δ*, indicando que *Adh7p* participa como enzima desintoxicador de

veratraldehído. Su papel, sin embargo, sería de menor importancia en comparación con Adh6p, debido esencialmente a sus bajos niveles de expresión.

Estudios previos realizados con la metodología de microarrays demostraban una clara inducción de Adh6p en condiciones de estrés oxidativo [Lee et al., 1999; Gasch et al., 2000 y Koerkamp et al., 2002]. Estos estudios demuestran a su vez, que la inducción de *ADH6* es dependiente de la presencia del factor de transcripción Yap1p, dado que en las cepas *yap1Δ* sometidas a estrés oxidativo los niveles de expresión de *ADH6* son idénticos a los encontrados en ausencia de estrés. Este factor de transcripción por lo general activa a enzimas que regeneran el glutatión y el coenzima NADPH como *OYE3* (*old yellow enzyme*, una deshidrogenasa dependiente de NADPH) y *YNL134C* (una MDR con actividad deshidrogenasa dependiente de NADPH), aunque la fuente principal de NADPH sería siempre la vía de las pentosas fosfato.

El estudio de la actividad específica de Adh6p y de los niveles de proteína en células sometidas a estrés oxidativo nos ha permitido ver la correspondencia entre la inducción del transcrito y la inducción de la traducción en dichas condiciones. Para generar el estrés oxidativo se han utilizado dos agentes oxidativos: la diamida y la menadiona. Aunque ambos compuestos provocan una respuesta de estrés oxidativo en la levadura, sus mecanismos de actuación son diferentes. La diamida, un compuesto de tamaño reducido puede atravesar las membranas biológicas rápidamente y una vez dentro de la célula oxida tioles pequeños preferentemente, haciendo decrecer las reservas de glutatión intracelular. Durante este estrés oxidativo no se generan radicales libres sino que se afecta al potencial redox celular al agotar el glutatión que es un tamponador redox [Thorpe et al., 2004]. Por otra parte, la menadiona es reducida al transferirse un electrón de la cadena respiratoria mitocondrial principalmente y forma radicales semiquinona que rápidamente reducen el O<sub>2</sub> generando radicales superóxido y regenerando la quinona. La menadiona también reacciona con componentes con grupos tiol como el glutatión para formar la glutationil-hidroquinona que genera radicales O<sub>2</sub><sup>-</sup> para recuperar la quinona. Por otra parte, este conjugado permite eliminar la menadiona ya que éste se excreta al exterior de la célula o a la vacuola gracias a la bomba de glutatión-S-conjugado [Zadzinski et al., 1998]. En ambos casos, se cumple un ciclo redox que continua generando cantidades de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por dismutación y HO<sup>·</sup> por reacciones de Fenton [Cyrne et al., 2003].

Tanto para el tratamiento realizado con diamida como el realizado con menadiona no se observó ninguna diferencia en el crecimiento de las cepas Wt y *adh6Δ*. No obstante, este hecho no excluye a Adh6p de participar en la respuesta al estrés.

Se crecieron las cepas Wt y *adh6Δ* en ausencia y presencia de diamida. La actividad específica cinamaldehído reductasa dependiente de NADP(H) encontrada en la cepa Wt en condiciones de estrés oxidativo se incrementó en 2-3 veces respecto al cultivo control. Dado que en la cepa *adh6Δ* no se encontraron variaciones en la actividad específica, podemos concluir que el aumento de la actividad reductasa dependiente de NADP(H) encontrado es debido a una inducción de la actividad de Adh6p. El análisis por Western-blot incubado con anticuerpo específico para Adh6p mostró una clara inducción de Adh6p. No obstante, las cantidades de proteína Adh6p encontradas a lo largo del crecimiento de la levadura no se corresponden con la actividad específica de Adh6p. Al entrar en la fase de saturación la actividad reductasa específica dependiente de NADPH del cultivo decae hasta niveles similares a los del inicio del tratamiento con diamida, sin embargo, los niveles de Adh6p, aunque disminuyen, son superiores incluso a los encontrados al inicio de la exposición al estrés oxidativo (Figura 3).

El estrés oxidativo provocado por la menadiona genera una respuesta diferente a la del estrés causado por la diamida. Se crecieron las cepas Wt y *adh6Δ* en medio rico al que se le adicionó menadiona y se realizó un seguimiento del crecimiento del cultivo. La actividad específica de la cepa Wt sometida a estrés oxidativo se duplicó como respuesta rápida a la adición de menadiona, pero fue recuperando su nivel basal con el tiempo. Dado que la cepa *adh6Δ* sometida a estrés oxidativo por menadiona no presentó ningún aumento en su actividad específica, podemos suponer que la actividad reductasa dependiente de NADP(H) determinada era debida únicamente a un aumento de la actividad de Adh6p. Los resultados obtenidos en el análisis por Western-blot son un reflejo del resultado encontrado en el análisis de la actividad específica. Hay un claro aumento en los niveles de Adh6p al poco tiempo de provocar el estrés oxidativo que concuerda con el aumento de la actividad cinamaldehído reductasa dependiente de NADP(H). Asimismo, la inducción es menos clara a tiempos superiores donde ya la célula comenzaba a recuperar los niveles basales de la actividad de Adh6p. Sin embargo, la inducción de Adh6p que se aprecia a través de su actividad específica es de aproximadamente un factor de 2, mientras que el Western-blot refleja una inducción superior en la producción de proteína. Es de suponer que no toda la proteína detectada sea activa.

En el Capítulo I se ha determinado la especificidad de sustrato de Adh6p [Larroy et al., 2002a]. Destaca su gran capacidad para metabolizar los aldehídos alifáticos lineales y ramificados como el pentanal, 2-metilpropanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal que presentan unos valores de  $k_{cat}/K_M$  del orden de  $100,000-400,000 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ . En el metabolismo fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae* estos aldehídos tienen una gran relevancia debido a sus propiedades organolépticas y a las de sus correspondientes alcoholes. Mientras los aldehídos

resultan tóxicos en concentraciones moderadamente elevadas y sus propiedades de gusto y aroma son poco deseadas, los alcoholes pueden convivir en el medio de cultivo con la célula hasta concentraciones más elevadas y además aportan unas características en el gusto y aroma de la fermentación de gran valor en la producción de vinos, cavas y cervezas [Ingraham, J.L. y Guymon, J.L., 1960]. El origen de estos alcoholes, denominados fusel alcohols, en la levadura proviene en mayor medida de la vía de asimilación de los aminoácidos (Figura 6 de la Introducción).

La comparación de las actividades específicas de las cepas Wt y *adh6Δ* ha puesto de manifiesto que Adh6p es la única proteína capaz de reducir el 3-metilbutanal en *Saccharomyces cerevisiae* en las condiciones ensayadas (crecimiento fermentativo en medio rico). El 3-metiltiopropional (metional) derivado de la metionina, es también reducido por Adh6p. Sin embargo, esta reducción también la pueden llevar a cabo enzimas con actividad dependiente de NAD(H), dado que la actividad específica encontrada con metional es muy similar con ambos coenzimas. En conjunto, estas actividades parecen poner de manifiesto que Adh6p puede tener un papel relevante en la reducción de aldehídos como último paso en la ruta catabólica de la producción de alcoholes superiores.

Hemos estudiado la posibilidad de que Adh6p sea la responsable o participe en la producción de los alcoholes superiores. Para ello hemos seguido dos estrategias diferentes: estudios de expresión de Adh6p y estudios de producción de alcoholes complejos.

Se han crecido cultivos para la cepa Wt en medio mínimo selectivo con glucosa como fuente de carbono y hemos variado la fuente de nitrógeno: sulfato amónico (condición control), leucina, valina, isoleucina, triptófano, tirosina, treonina y metionina. Cuando la fuente de nitrógeno proviene de la leucina o de la isoleucina, los niveles de Adh6p son muy similares a los encontrados en el cultivo control. Sin embargo, aunque las vías anabólicas de la leucina, isoleucina y valina están interconectadas y comparten metabolitos y muchos de los enzimas que participan en ella (figura 6 de la Introducción), cuando la célula incorpora el grupo amonio de la valina se produce una clara represión de *ADH6* ya que prácticamente no se detecta Adh6p. Al crecer las cepas con treonina, tirosina o metionina las cantidades de enzima encontrados en la célula son ligeramente inferiores a las del cultivo control. Sin embargo, cuando el aminoácido empleado es el triptófano prácticamente no se detecta Adh6p en el análisis por Western-blot.

Los niveles de compuestos volátiles producidos por las cepas Wt y *adh6Δ* crecidas en medio mínimo selectivo con glucosa como fuente de carbono y leucina, isoleucina o tirosina como fuente de nitrógeno, no ha presentado ninguna diferencia entre las cepas estudiadas. Si



bien no podemos descartar que Adh6p reduzca *in vivo* estos aldehídos producidos en la asimilación del grupo amonio de los aminoácidos, no tenemos ninguna evidencia de su participación. Teniendo en cuenta el complejo sistema de deshidrogenasas/reductasas de la levadura, es razonable postular que la falta de alguno de los enzimas que participan en la reducción fuera compensada por otro enzima. Incluso podríamos pensar en una serie de enzimas con actividad dependiente de NAD(H) y actividad dependiente de NADP(H) que estarían disponibles, dependiendo del balance redox celular, para llevar a cabo una función tan importante como la desintoxicación de los aldehídos, ya que una gran acumulación sería letal para la célula.

Estudios anteriores realizados con cepas *adh1Δ* han demostrado una clara inducción de la actividad aldehído reductasa dependiente de NADPH [Evellin et al., 1999]. La actividad inducida se ensayó con hexanal y 3-metilbutanal, en las cepas Wt y *adh1Δ*, y se demostró que era debida a Adh6p. Primero, la inducción encontrada con 3-metilbutanal se corresponde con el patrón de la actividad encontrada con veratraldehído, un aldehído que sólo es reducido por Adh6p [Larroy et al., 2002a]. Por otra parte, el patrón de inducción se corresponde con el patrón de actividad encontrado para Adh6p en un gel nativo con tinción de actividad, que además no muestra ninguna otra banda perteneciente a algún otro enzima. Finalmente, la inducción queda confirmada por el ensayo de Western-blot.

# **DISCUSIÓN GENERAL**

## Nuevas alcohol deshidrogenasas de la superfamilia MDR con actividad dependiente de NADP(H) en *Saccharomyces cerevisiae*

La secuenciación de un genoma da información muy valiosa para identificar genes a los que se les puede asignar una función putativa. La comparación de secuencias y la identificación de motivos característicos dentro de una familia son la base para seleccionar aquellos ORFs que cumplan los requisitos escogidos. El propósito de este estudio era identificar y caracterizar a nuevos miembros de la familia ADH-MDR en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello se realizó una búsqueda en su genoma [Goffeau et al., 1996] con el ánimo de hallar aquellos ORFs huérfanos que contuvieran el motivo característico de las MDRs que unen zinc. De entre las secuencias resultantes se escogieron dos, *YCR105W* y *YMR318C* ya que tenían una peculiaridad, el residuo Asp223 (siguiendo la nomenclatura de la HLADH), altamente conservado en ADHs con actividad dependiente de NAD(H), se encontraba reemplazado por una serina, lo que sugiere una actividad dependiente de NADP(H). Los correspondientes enzimas serían pues, las primeras ADHs dependientes de NADPH identificadas en *Saccharomyces cerevisiae*.

Los genes *YMR318C* (*ADH6*) y *YCR105W* (*ADH7*) se clonaron en vectores de sobreexpresión para *Saccharomyces cerevisiae* y se estudiaron sus productos génicos, Adh6p y Adh7p. Ambas proteínas eran alcohol deshidrogenasas, pero a diferencia de las ADHs ya conocidas en la levadura, se trataba de proteínas homodiméricas activas con NADP(H) como coenzima. Además, la especificidad de sustrato de estas enzimas era muy diferente a los otros enzimas de la familia. Adh6p y Adh7p son activas con una gran variedad de sustratos desde alcoholes/aldehídos lineales hasta alcoholes o aldehídos aromáticos, con o sin ramificaciones. Sin embargo, no se detectó actividad con alcoholes secundarios o cetonas en ninguno de los dos enzimas (Tabla 1). También a diferencia de las ADHs de levadura, la actividad catalítica aumenta con la longitud de la cadena carbonada.

En la Tabla 2 se presenta un compendio de las constantes cinéticas encontradas para ambos enzimas. Como se puede ver, se trata de dos enzimas con una eficiencia en la reducción de aldehídos de 50-100 veces superior a la correspondiente oxidación de alcoholes, por lo que es de esperar que su función fisiológica sea como actividad reductasa. Tanto para Adh6p como Adh7p el sustrato más eficiente es el pentanal ( $380.300 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$  y  $242.600 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$  respectivamente) y presentan eficiencias catalíticas de un orden similar para el resto de sustratos analizados. Sin embargo, las  $K_M$  encontradas para Adh7p son sensiblemente menores que las de Adh6p que, sin embargo, presenta unas constantes catalíticas algo superiores. Para la oxidación

de alcoholes, Adh7p es claramente más eficiente, presenta  $K_M$  inferiores y  $k_{cat}$  superiores a las de Adh6p.

	Actividad relativa Reducción			Actividad relativa Oxidación	
	Adh6p	Adh7p		Adh6p	Adh7p
<b>Cinamaldehído</b>	100	100	<b>Cinamil alcohol</b>	100	100
<b>Sinapaldehído</b>	3		<b>Coniferil alcohol</b>	27	7
<b>Coniferaldehído</b>	10	15	<b>Benzil alcohol</b>	45	78
<b>Fenilacetaldehído</b>	94	90	<b>2-Feniletanol</b>	2	23
<b>Benzaldehído</b>	72	45	<b>Etanol</b>	4	2
<b>Veratraldehído</b>	82	79	<b>Propanol</b>	7	16
<b>Anisaldehído</b>	72	83	<b>Butanol</b>	24	42
<b>Vanillina</b>	57	84	<b>Pentanol</b>	89	46
<b>Propanal</b>	21	24	<b>Hexanol</b>	154	45
<b>Butanal</b>	57	19	<b>Octanol</b>	52	30
<b>Pentanal</b>	109	153	<b>2-Metilpropanol</b>	1	28
<b>Hexanal</b>	89	88	<b>2-Metilbutanol</b>	7	39
<b>Heptanal</b>	88	86	<b>3-Metilbutanol</b>	15	40
<b>Octanal</b>	84	59	<b>2-Propanol</b>	N.A.	N.A.
<b>2-Metilpropanal</b>	67	63	<b>2-Butanol</b>	2	1
<b>2-Metilbutanal</b>	92	89	<b>1,2-Propanediol</b>	N.A.	
<b>3-Metilbutanal</b>	84	79	<b>1,2-Butanediol</b>	N.A.	2
<b>3-Metiltiopropanal</b>	125	139	<b>1,3-Butanediol</b>	2	5
<b><i>t</i>-2-Nonenal</b>	39	33	<b>1,4-Butanediol</b>	4	8
<b>4-Hidroxinonenal</b>	30		<b>2,3-Butanediol</b>	N.A.	
<b>Furfural</b>	27	54	<b>Eugenol</b>	N.A.	N.A.
<b>Metilglioxal</b>	N.A.				
<b>Acetona</b>	N.A.	N.A.			
<b>Ciclohexanona</b>	N.A.				

**Tabla 1: Especificidad de sustrato de las alcohol deshidrogenas Adh6p y Adh7p.** Las actividades de reducción se midieron en tampón fosfato sódico 33 mM (pH 7.0) con una concentración de sustrato 1 mM y de NADPH 0.5 mM. Las actividades de oxidación se midieron en tampón glicina 0.1 M (pH 10.0) con una concentración de sustrato de 10 mM (a excepción del octanol que se utilizó una concentración 1 mM) y de NADP<sup>+</sup> de 1.2 mM. N.A.: no activo

	<b>Adh6p</b>			<b>Adh7p</b>		
	$K_M$ (mM)	kcat (min <sup>-1</sup> )	kcat/ $K_M$ (min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	kcat (min <sup>-1</sup> )	kcat/ $K_M$ (min <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
<b>Pentanal</b>	0.060 ± 0.009	22700 ± 190	380300 ± 57830	0.049 ± 0.005	11910 ± 350	242580 ± 19500
<b>Hexanal</b>	0.152 ± 0.017	21270 ± 920	139950 ± 16780			
<b>3-metilbutanal</b>	0.129 ± 0.035	14000 ± 670	109000 ± 30440	0.048 ± 0.006	9580 ± 290	201720 ± 19940
<b>Cinamaldehído</b>	0.172 ± 0.012	18400 ± 600	107200 ± 8600	0.043 ± 0.002	7910 ± 120	182090 ± 6360
<b>Veratraldehído</b>	0.073 ± 0.003	15800 ± 140	217800 ± 9470	0.058 ± 0.005	6000 ± 140	103736 ± 7488
<b>NADPH</b>						
	0.029 ± 0.003			0.011 ± 0.001		
<b>NADH</b>						
	N.A.			N.S. (1.5 μM)		
<b>Etanol *</b>						
	N.S. (750 mM)					
<b>Pentanol *</b>						
	N.S. (400 mM)			0.990 ± 0.030	920 ± 10	930 ± 25
<b>Pentanol</b>	10.5 ± 3.4	335 ± 6	32 ± 10			
<b>Hexanol</b>	9.1 ± 2.4	640 ± 90	71 ± 24			
<b>3-metilbutanol *</b>				1.610 ± 0.070	2566 ± 50	1780 ± 50
<b>3-metilbutanol</b>	N.S. (200 mM)			4.600 ± 0.300	175 ± 5	38 ± 2
<b>Cinamil alcohol *</b>	0.700 ± 0.120	4200 ± 60	6000 ± 1000	0.080 ± 0.01	3400 ± 100	42370 ± 5170
<b>Cinamil alcohol</b>	0.436 ± 0.029	885 ± 90	2028 ± 247	0.132 ± 0.010	1620 ± 40	13860 ± 1140
<b>Feniletanol *</b>				2.025 ± 0.310	1130 ± 30	520 ± 50
<b>NADP<sup>+</sup></b>						
	0.032 ± 0.009			0.013 ± 0.001		
<b>NAD<sup>+</sup></b>						
	N.D.			~9		

**Tabla 2: Parámetros cinéticos de las alcohol deshidrogenasas Adh6p y Adh7p.** Todas las actividades se han medido en tampón fosfato sódico 33 mM (pH 7.0), a excepción de los sustratos marcados con \*, que se han medido en tampón glicina 0.1 M (pH 10.0). La reducción se ha medido con 0.5 mM de NADPH mientras que la oxidación se ha medido con 1.2 mM de NADP<sup>+</sup>. N.A.: no activo, N.S.: no satura

Se han construido las cepas mutantes *adh6Δ*, *adh7Δ* y *adh6Δadh7Δ*, que han resultado viables. No obstante, la delección de *ADH6* ha servido para demostrar que Adh6p parece ser la única proteína responsable de la oxidación del pentanol cuando el coenzima es el NADP<sup>+</sup> ya que el extracto de la cepa *adh6Δ* no reveló ninguna banda en un gel nativo teñido con dicha actividad, y que es la proteína con mayor participación en la actividad reductasa dependiente de NADP(H) para aldehídos como el pentanal, 3-metilbutanal, metional, cinamaldehído y veratraldehído [Larroy et al., 2002a; Larroy et al., 2003; Capítulo IV]. Este hecho ha permitido realizar un seguimiento de Adh6p en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*. Al parecer se trata de una proteína que se expresa activamente en fase exponencial y que esta expresión decrece al llegar a fase estacionaria. Además, está inducida cuando la fuente de carbono de la levadura es la galactosa, pero inhibida cuando se utiliza glicerol. La combinación del seguimiento de Adh6p por actividad, con el seguimiento de Adh6p por detección específica de la proteína y con el análisis de la cepa mutante *adh6Δ*, ha permitido localizar la existencia de otra proteína con actividad cinamaldehído reductasa dependiente de NADP(H) inducible en la fase exponencial de cultivos crecidos en glicerol. La contribución de Adh7p en los cultivos de levadura estudiados no se ha podido cuantificar dada la baja expresión de *ADH7* en las condiciones utilizadas [Larroy et al., 2003].

### **Adh6p y Adh7p pertenecen a la familia de las cinamil alcohol deshidrogenasas**

Las características cinéticas de estas enzimas junto con el análisis de su secuencia nos llevó a proponer que tanto Adh6p como Adh7p eran miembros de la familia de las cinamil alcohol deshidrogenasas. Los estudios de comparación de diferentes secuencias de MDRs agrupan a Adh6p y Adh7p con las cinamil alcohol deshidrogenasas, más concretamente con los enzimas bacterianos de la familia que constituyen la clase CAD-related (Figura 1 de la Introducción) [Jörnvall et al., 2001; Nordling et al., 2002; Riveros-Rosas et al., 2003]. Adh6p y Adh7p presentan una identidad de secuencia del 20-25% con las ADHs de vertebrado y levadura, y aunque la identidad de secuencia con las CADH es algo mayor, ésta no supera el 35%. Sin embargo, hay regiones de la secuencia en el dominio catalítico donde la similitud es elevada.

Como hecho característico, las CADH presentan una delección de varios aminoácidos respecto a las ADHs de la clase I entre los residuos 116 y 138 (nomenclatura referente a HLADH). Este pequeño loop se dispone en la entrada del centro de unión al sustrato de la

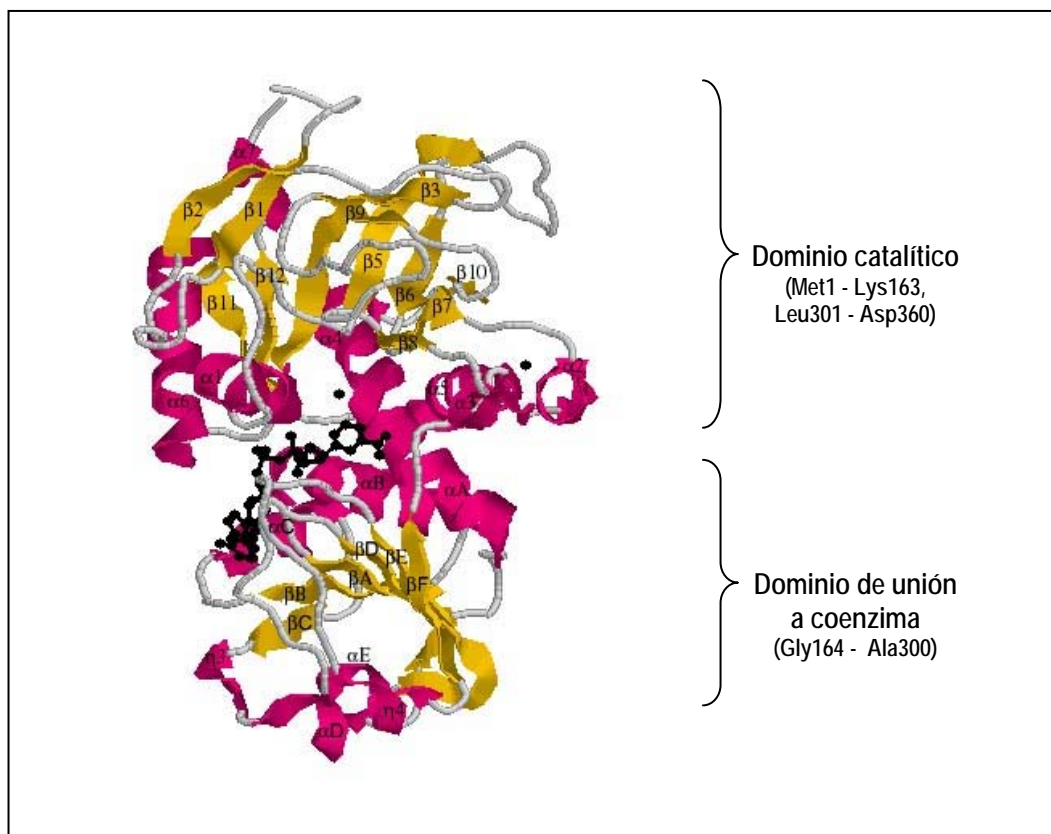
HLADH reduciendo la accesibilidad de sustratos voluminosos. Por lo tanto, para las CADH se dispondría de una mayor amplitud en la entrada del centro catalítico de manera que podrían reconocer sustratos de mayor tamaño, como son los derivados cinámicos.

### **Estructura tridimensional de Adh6p: mecanismo cinético con ‘half-of-the-sites reactivity’**

La alcohol deshidrogenasa Adh1p de *Saccharomyces cerevisiae* fue uno de los primeros enzimas que se purificó e incluso cristalizó, aunque los cristales obtenidos no fueron aptos para la difracción de rayos X [Negelein, E. y Wulff, H., 1937]. Más tarde, Ramaswamy y colaboradores lograron cristalizar de nuevo Adh1p y Adh2p pero, aunque los cristales difrataron los rayos X, la información obtenida no resultó suficiente para resolver su estructura cristalográfica [Ramaswamy et al., 1994]. Recientemente se ha publicado una nueva cristalización de Adh1p que al igual que en los casos anteriores no ha servido para la óptima resolución del cristal [Kim, K.J. y Howrad, A.J., 2002]. Adh6p y Adh7p han sido las incorporaciones más recientes a la familia MDR caracterizada en la levadura y, sin embargo, ya se ha conseguido la cristalización de uno de ellos [Valencia et al., 2002] y se ha resuelto la estructura tridimensional de Adh6p [Valencia et al., 2004]. Esto convierte a Adh6p en la primera alcohol deshidrogenasa con estructura conocida en *Saccharomyces cerevisiae*.

Al inicio de este estudio se desconocía la estructura tridimensional de ningún miembro de la familia de las CADH. El único referente estructural consistía en un modelado realizado con la secuencia de CAD2 de *Eucalyptus gunii* basándose en los parámetros estructurales de la ADH de hígado de caballo [McKie et al., 1993].

Así pues, Adh6p ha sido también la primera estructura resuelta dentro de la familia de las CADH, por lo que ha sido la primera referencia dentro de esta familia. Actualmente ya se dispone de la estructura cristalográfica de otros dos miembros de la familia de las CADH, una sinapil alcohol deshidrogenasa (SAD) de la subfamilia Eli3 [Bomati, E.K. y Noel, J.P., 2005] y una ADH bacteriana de la subfamilia CAD-related (YAHK de *E.coli*, artículo pendiente de publicación).

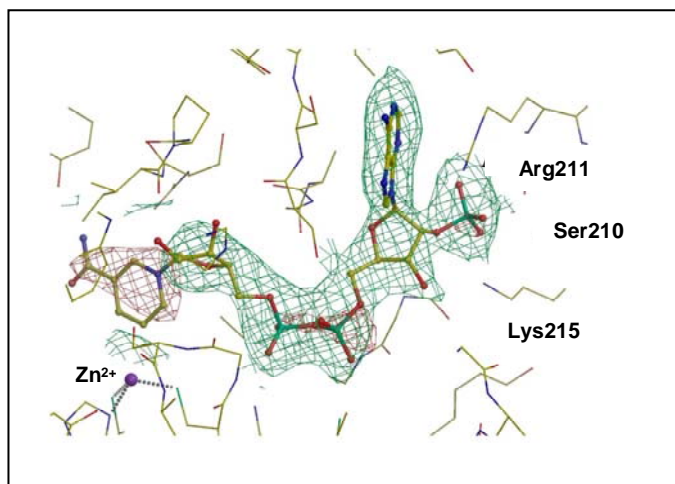


**Figura 1:** Subunidad de Adh6p en conformación holo del cristal 1PSO. Los iones de Zn se representan como esferas sólidas de color negro y el coenzima  $\text{NADP}^+$  se representa en la configuración de bolas y bastones en color negro. La coloración de la subunidad hace referencia a la estructura secundaria. Los elementos de la estructura secundaria del dominio de unión al coenzima han sido designados como en Eklund y colaboradores [Eklund et al., 1976] para la HLADH.

En el proceso de cristalización de Adh6p se obtuvieron tres cristales diferentes: un cristal trigonal de Adh6p, un cristal trigonal de Adh6p- $\text{NADP}^+$  y un cristal monoclinico de Adh6p. La resolución de los datos cristalográficos ha revelado que la estructura de Adh6p sigue el patrón ADH general. La proteína se encuentra dividida en dos dominios, el dominio catalítico y el dominio de unión al coenzima. Consta de dos átomos de zinc, uno con función estructural coordinado por cuatro cisteínas y el otro con función catalítica coordinado tetraédricamente por los residuos Cys46, His68, Cys163 y una molécula de agua, que será desplazada con la entrada del sustrato, en una coordinación equivalente a la encontrada para la HLADH [Eklund, H. y Brändén, C.I., 1987]. El dominio de unión al cofactor sigue el plegamiento de Rossmann [Rossmann et al., 1974] con un núcleo formado por 6 hojas  $\beta$  paralelas ( $\beta\text{A}-\beta\text{F}$ ) con dos hélices  $\alpha$  situadas en la parte superior ( $\alpha\text{B}$  y  $\alpha\text{C}$ ) y dos en la parte inferior ( $\alpha\text{D}$  y  $\alpha\text{E}$ ). La separación entre los dominios catalíticos y de unión al coenzima forma una hendidura donde se localizan el centro de unión al coenzima y el centro de unión al sustrato (Figura 1).



Los cristales monoclinicos contenían las dos subunidades del enzima con un 50% de ocupación en la unión del NADP<sup>+</sup>. En estos cristales monoclinicos, el lugar de unión al cofactor de una subunidad se encontraba vacío, mientras que en la otra subunidad la densidad electrónica encontrada se correspondía con la molécula de fosfo-ADP-ribosa (NADP<sup>+</sup> al que faltaba el anillo de nicotinamida) (Figura 2). La pérdida del anillo de nicotinamida podría haberse dado durante los pasos de purificación o cristalización por hidrólisis. Un fenómeno parecido ha sido descrito en la estructura cristalina de una acetohidroxiácido reductoisomerasa de espinaca donde en lugar de la molécula de NADP<sup>+</sup> esperada se encontró también una molécula de fosfo-ADP-ribosa, demostrando que la molécula de NADP<sup>+</sup> es inestable y puede ser degradada a fosfo-ADP-ribosa [Thomazeau et al., 2000]. Por su parte, los cristales trigonales obtenidos contenían la estructura molecular de una única subunidad enzimática con una zona de desorden molecular en la región de unión al cofactor. Además, el cristal trigonal Adh6p-NADP<sup>+</sup> también presentaba una ocupación del 50% de coenzima. Remarcablemente, este desorden molecular debido a la unión del cofactor también lo presentaban las subunidades de Adh6p obtenidas a partir de los cristales que no habían sido incubados con NADP<sup>+</sup>, indicando que este desorden estaba relacionado con una característica propia del enzima y no debido a la unión del cofactor. La superimposición de los esqueletos carbonados de las dos subunidades obtenidas a partir del cristal monoclinico (una subunidad en conformación *apo* (A) y otra subunidad en conformación *holo* (H)) revelaba una desviación de los C $\alpha$  de tan sólo 1.19Å. Pero, la desviación molecular alcanzaba los 6-6.9Å en los residuos pertenecientes a los loops Cys250-Asn260 y Ile 277-Lys292. Se observó que en la subunidad que contiene la fosfo-ADP-ribosa, estos loops se acercan a la molécula cerrando el centro de unión del coenzima de manera que se maximizan las interacciones. Sin embargo, en la subunidad carente de coenzima estos loops están desplazados dejando un centro de unión a coenzima más amplio. Por lo tanto, en los cristales trigonales de Adh6p-NADP<sup>+</sup> que presentan una ocupación del 50% también tendremos una heterogeneidad en las subunidades, aunque estas sean estructuralmente indistinguibles, una presentaría la conformación A y la otra la conformación H. Este hecho explica el desorden molecular encontrado en la región de unión a coenzima ya que ambos loops se encontrarán en las dos conformaciones posibles. Este desorden molecular también se aprecia en el cristal trigonal carente de coenzima, por lo que se puede deducir que la molécula de Adh6p es heterodimérica estructuralmente y está compuesta por una subunidad en conformación A y otra en conformación H. En este caso, la conformación *holo* estaría estabilizada por la ubicación de iones fosfato en la región de unión al pirofosfato de la molécula de coenzima.



**Figura 2:** Densidad electrónica del centro de unión al coenzima encontrada en el cristal monoclinico. En marrón se representa la densidad negativa que se corresponde con la falta de ocupación molecular.

El heterodímero A-H sería el modelo más plausible ya que una molécula de Adh6p con subunidades en conformación A-A sería inviable estéricamente, dado que los loops Ile277-Lys292 de ambas subunidades colapsarían en el mismo espacio. Por otra parte, una proteína en conformación H-H sí es posible. No obstante su estabilidad estará disminuida dado que el movimiento de los loops Ile277-Lys292 acercándose a la molécula de coenzima debilitaría la interacción entre subunidades porque, además de interactuar con el coenzima, estos loops forman parte del conjunto de interacciones que se dan entre ambas subunidades estabilizando el homodímero. Esta forzosa heterogeneidad A-H en la molécula de Adh6p explica porqué todos los intentos realizados para obtener apoenzima libre de iones fosfato o coenzima unido han fracasado.

Adh6p es una proteína con requerimiento absoluto de NADP(H) para la catálisis. En el bolsillo de unión a coenzima, la molécula de NADP<sup>+</sup> se dispone en conformación extendida con los anillos de ribosa en conformación C2'endo. La transferencia del hidruro desde el sustrato al carbono C4 de la nicotinamida es estereoespecífica y, en el caso de Adh6p, esta disposición sólo permite que se transfiera el hidrógeno-Re. Por lo tanto, Adh6p sería un enzima con catálisis del tipo A.

El bolsillo de unión al coenzima lo constituyen residuos que aportan interacciones hidrofóbicas y polares. Los loops Cys250-Asn260 y Iles277-Lys292 participan en la interacción con los grupos de fosfo-ADP-ribosa y nicotinamida respectivamente, de manera que tendrán un papel importante en la disociación del coenzima durante el ciclo catalítico. El fosfato adicional, característico de la molécula de NADP<sup>+</sup>, interactúa con tres residuos: la Ser210 (equivalente a la posición 223 en HLADH ocupada por un residuo Asp), la Arg211 y la Lys215. Es decir, presenta un residuo neutro en la posición 223 (según nomenclatura HLADH) que evitará crear

repulsiones electrostáticas con el fosfato adicional (Ser210), y hay dos residuos básicos que estabilizarán la densidad de carga negativa de dicho grupo fosfato (Arg211 y Lys215), interacciones que se habían descrito con anterioridad para enzimas dependientes de NADP(H) [Carugo, O. y Argos, P., 1997]. Estrategias similares que involucran residuos básicos en la coordinación del grupo fosfato ya se han descrito con anterioridad para las ADHs bacterianas con actividad dependiente de NADP(H) de *Clostridium beijerinckii*, *Thermoanaerobacter brockii* [Korkhin et al., 1998], la ADH8 de *Rana perezi* [Rosell et al., 2003] y para la SAD de *Populus tremuloides* [Bomati, E.K. y Noel, J.P., 2005].

Es bien conocida la gran importancia del residuo Asp223 para la especificidad de coenzima para ADHs que utilizan NAD(H), pero es lógico encontrar que en deshidrogenasas con actividad dependiente de NADP(H) este residuo se halle sustituido por otros de menor tamaño y carga neutra (alanina, glicina o serina) que facilitarían el encaje del fosfato de la ribosa, proporcionarían una mayor cavidad y minimizarían las repulsiones electrostáticas. Lauvergeat y colaboradores realizaron un estudio de mutagénesis dirigida en la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD2) de *Eucalyptus gunii*. El residuo Ser210 (equivalente a la posición 223 en la HLADH) fue intercambiado por un residuo aspártico. El mutante S210D resultó menos eficiente para la catálisis dependiente de NADP(H) aunque no fue un cambio relevante para mejorar la catálisis dependiente de NAD(H) [Lauvergeat et al., 1995]. Por otra parte, es remarcable que el residuo Lys215 juegue un papel importante en la especificidad del coenzima NADP(H) ya que es un residuo altamente conservado en ADHs con actividad dependiente de NAD(H) donde interacciona con el oxígeno 3' de la ribosa (Lys228 en la HLADH). Sin embargo la adaptación sufrida para obtener esta especificidad por el NADP(H) ha permitido reorganizar el centro de unión de manera que ahora este residuo Lys ha pasado a tener gran importancia en la coordinación del grupo fosfato que diferencia a ambos coenzimas. En general, todas las CADH presentan una serina en la posición 210 al igual que Adh6p. El residuo básico que neutralizaría la densidad de carga negativa del fosfato no se encuentra en la posición adyacente en las CADHs, como sería la Arg211 de Adh6p. El residuo con carga positiva que podría desempeñar dicha función en otras CADHs lo encontramos en la posición 214 junto a la Lys215 conservada. Igualmente, el microambiente de la región de unión al fosfato constaría de residuos poco voluminosos y una densidad de carga positiva.

Para tener una aproximación de la estructura del centro de unión al sustrato se realizó un modelado con un sustrato aromático. Los residuos implicados son prácticamente análogos a los encontrados en el enzima HLADH. La única excepción radica en el loop formado por los residuos 116-138 de HLADH, que se encuentra ausente en Adh6p al igual que en el resto de enzimas de la familia CADH. Esta ausencia parece aportar un espacio extra en la entrada del

bolsillo de unión al sustrato de manera que no se restringe la entrada de sustratos voluminosos. La morfología del centro de unión estaría en concordancia con la especificidad de sustrato de los enzimas de la familia, que son activos con sustratos voluminosos como los aldehídos y alcoholes aromáticos con o sin sustituyentes en el anillo carbonado, o aldehídos y alcoholes lineales con ramificaciones [Tablas 1 y 2; Somssich et al., 1996; Goffner et al., 1998; Wilkin et al., 1999]. Sin embargo, un centro activo espacioso explicaría los elevados valores de  $K_M$  encontrados para los sustratos pequeños como el etanol, que no consiguió saturar al enzima a una concentración de 0.75 M.

La estructura recientemente resuelta de otra CADH, la SAD del álamo temblón (*Populus tremuloides*), revela los rasgos característicos de las ADHs de cadena media que unen zinc. La identidad de secuencia con Adh6p es de tan sólo el 36%, sin embargo, la superposición de los esqueletos carbonados de ambas estructuras muestra un r.m.s.d. de 1.55 Å a lo largo de 335 aminoácidos, lo que nos indica que el patrón estructural es muy similar. Las diferencias estructurales más importantes se encuentran en el centro de unión a sustrato. El trabajo de Bomati y colaboradores presenta varios modelados del centro de unión a sustrato con diferentes sustratos que explicarían la especificidad de sustrato de la SAD, sin embargo, la alta divergencia en esta región con la Adh6p no permite explicar por qué Adh6p no es activa con sinapaldehído o coniferaldehído [Bomati, E.K. y Noel, J.P., 2005]. No obstante, refuerza la idea general de un gran bolsillo hidrofóbico de unión al sustrato, dado que los residuos participantes dispondrían sus cadenas laterales de manera que se permitiría la entrada de sustratos voluminosos.

A pesar de mantener las principales características estructurales de la familia de las MDRs, en Adh6p no existiría la conformación ‘cerrada’ o ‘abierta’ que se aprecia en las demás deshidrogenasas [Eklund, H. y Brändén, C.I., 1979]. La entrada del  $NADP^+$  no provoca una rotación de los dominios catalítico y estructural que cerraría la hendidura que separa ambos dominios. Para Adh6p la entrada del nucleótido sólo provoca el movimiento de dos loops, Cys250-Ans260 y Ile277-Lys292, permaneciendo el resto de la molécula en la misma disposición espacial. La resolución de la estructura de Adh6p ha puesto de manifiesto la heterogeneidad de las subunidades que forman el enzima, que sugiere un mecanismo de unión del  $NADP^+$  en que sólo una de las dos subunidades tuviera una alta afinidad por el coenzima (subunidad en conformación H) mientras que la otra subunidad presentaría una afinidad inferior (subunidad en conformación A). Como consecuencia, tan sólo una subunidad sería la responsable de la catálisis y por lo tanto estaríamos ante un caso de ‘half-of-the-sites reactivity’. De hecho, se ha confirmado por estudios de unión del coenzima que la molécula de Adh6p tan sólo uniría una molécula de NADP(H) por dímero con una constante de disociación del orden

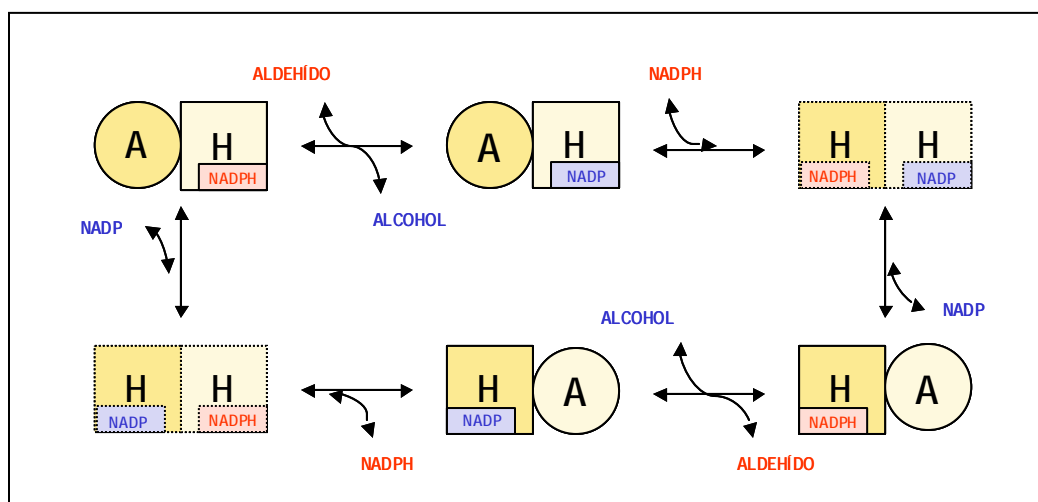
de 7.7  $\mu\text{M}$ . Así, tanto la estructura cristalográfica resuelta como los datos de ‘binding’, sugieren que Adh6p es un enzima con ‘half-of-the-sites reactivity’.

No es el primer caso en el que la resolución del cristal revela una heterogeneidad en la unión del sustrato a las subunidades enzimáticas. Izard y Geerlof ya encontraron esta asimetría en la adenil transferasa de *E.coli* [Izard, T. y Geerlof, A., 1999]. En este enzima la asimetría es consecuencia del desplazamiento de dos hélices  $\alpha$  al unir la molécula de sustrato. Este desplazamiento acerca los aminoácidos necesarios para unir desfosfo-coenzimaA, que de otra manera permanecería a una distancia demasiado grande para establecer interacciones por puente de hidrógeno para su correcta unión al enzima.

La comparación de secuencias de diferentes enzimas de la familia CAD con representación de las tres subfamilias, con la secuencia de Adh6p, nos permite deducir que la catálisis por ‘half-of-the-sites reactivity’ sería prácticamente exclusiva de Adh6p. La ausencia de homología de secuencia en la región de los loops Cys250-Asn260 y Ile277-Lys292 para los enzimas de las subfamilias CAD y Eli3 parece descartar este tipo de comportamiento. La recién publicada estructura de la SAD de *Populus tremuloides* descarta por completo este mecanismo cinético dado que se ha encontrado el coenzima unido en ambas subunidades de forma simultánea [Bomati, E.K., 2005]. Aunque, podría existir cierta similitud con los enzimas de la subfamilia CAD-related, la reciente publicación de la estructura de YAHK de *E.coli* no revela un patrón estructural similar al de Adh6p. El mecanismo de ‘half-of-the-sites reactivity’ no se trata de un fenómeno exclusivo de Adh6p dentro de la familia ADH. Estudios anteriores habían detectado una actividad ‘half-of-the-sites’ para la HLADH en determinadas condiciones, como la reducción de aldehídos aromáticos a pH básico [Dunn et al., 1979].

El mecanismo de ‘half-of-the-sites reactivity’ puede estar provocado por diferentes motivos. Se ha descrito que en algunos casos el enzima puede ser capaz de unir el cofactor en todos los centros de unión pero, que sin embargo, una de las subunidades actúa como dominante respecto a la otra subunidad, impidiendo la ejecución de la catálisis por parte de ésta, como es el caso de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial de hígado humano [Zhou, J. y Weiner, H., 2000 y Weiner et al., 2001]. Por otra parte, el enzima nucleósido hidrolasa de *Trypanosoma vivax* sólo une sustrato en una de sus dos subunidades debido a que los cambios conformacionales derivados de la unión imposibilitarían la unión en la otra subunidad. Al parecer, aunque la hipótesis carece de evidencias cristalográficas, el movimiento de un loop flexible se cerraría sobre el centro activo al unirse el sustrato y estéricamente impediría el acceso de la segunda molécula de sustrato [Vandemeulebroucke et al., 2003].

Para Adh6p la unión simultánea de dos moléculas de coenzima es posible aunque la unión al segundo centro sería muy débil (no hemos podido determinar la constante de disociación). Los diferentes estados energéticos de las conformaciones A-H y H-H podría facilitar la liberación del cofactor una vez realizada la catálisis. Una vez el heterodímero A-H efectuara la catálisis, una segunda molécula de coenzima se uniría en el centro de unión que queda libre proporcionando un estado energético menos ventajoso para la proteína. Con la finalidad de recuperar la conformación más estable (el heterodímero A-H), Adh6p liberaría el coenzima ya transformado en la reacción mediante un mecanismo que transmitiría la señal estructural de una subunidad a la otra (Figura 3). En este caso, ‘half-of-the-sites reactivity’ podría ser una ventaja para la regulación del enzima en condiciones fisiológicas ya que la unión del cofactor en una de las subunidades facilitaría la disociación de los productos en la otra subunidad. Un caso similar sería el de la timidilato sintasa de *Pneumocystis carinii* donde el ‘half-of-the-sites reactivity’ proporciona un mecanismo de autoregulación catalítica mediante la unión/catálisis que se produce de manera alternada en ambas subunidades [Anderson et al., 1999]. En Adh6p la unión de una primera molécula de NADP(H) provocaría la disminución de la afinidad en el segundo centro de unión. Por lo tanto, la unión del coenzima en uno de los centros está ligada a la catálisis en el otro centro catalítico, en el que se facilita la liberación de la molécula de coenzima que ya ha reaccionado.



**Figura 3:** Representación esquemática del mecanismo catalítico de Adh6p. La subunidad en conformación *apo* está representada por un círculo con la letra A, mientras que la subunidad en conformación *holo* está representada por un cuadrado con la letra H. La representación con líneas discontinuas indican estados transitorios. Sólo una subunidad es la responsable de la catálisis. La entrada del nucleótido en la subunidad libre (en conformación *apo*) favorece la salida del cofactor de la subunidad previamente ocupada. De esta forma se permite alternar la función catalítica entre ambas subunidades del dímero de Adh6p.

El mecanismo de ‘half-of-the-sites reactivity’ es un ejemplo extremo de cooperatividad negativa que no está asociado a un comportamiento de saturación no hiperbólico respecto a la unión del coenzima o del sustrato, por lo que no nos ha sido posible detectar ningún indicio del mismo en los estudios cinéticos realizados en estado estacionario.

### **La función fisiológica de Adh7p**

Al igual que para el resto de ADHs de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, su delección es viable y no provoca ningún fenotipo en condiciones normales de crecimiento. Sin embargo, el hecho de disponer de las cepas mutantes *adh6Δ*, *adh7Δ* y *adh6Δadh7Δ* nos ha sido de gran ayuda a la hora de intentar deducir las posibles funciones fisiológicas que podrían llevar a cabo estas enzimas en la célula de levadura.

La mayoría de los resultados obtenidos hacen referencia únicamente a Adh6p. La baja expresión de Adh7p en las cepas utilizadas nos ha imposibilitado su seguimiento por actividad reductasa o por detección específica con anticuerpos anti-Adh7p. Incluso, los estudios realizados con la cepa de laboratorio CEN.PK113-7D y sus mutantes derivados nos revelaron un resultado sorprendente: *ADH7* no estaba presente. Los estudios de secuencia, regulación o función están basados en la premisa de que la información puede ser extrapolada del ‘background’ de una cepa a otra. Sin embargo son pocos los estudios que se han realizado para validar esta premisa. Daran-Lapujade y colaboradores investigaron las diferencias y similitudes entre las cepas de laboratorio S288C y CEN.PK113-7D, de uso común en la mayoría de laboratorios que trabajan con *Saccharomyces cerevisiae*. Este estudio confirmó el resultado que habíamos encontrado, *ADH7* estaba ausente en las cepas CEN.PK113-7D e incluso en otras cepas de *Saccharomyces cerevisiae* [Daran-Lapujade et al., 2003]. Son muchos los estudios realizados con la técnica de microchips en los que la señal emitida para *ADH7* es muy débil o incluso nula, lo que implica que esta región es extremadamente divergente o ha sido delecionada [Lashkari et al., 1997].

El genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sufrió una duplicación en algún punto de su historia evolutiva ya que son muchos los grupos de dos o más genes que codifican por proteínas de secuencia muy similar. Esta redundancia suele darse en los extremos de los cromosomas (regiones subteloméricas) aunque es más aparente que real dado que en algunos casos las funciones pueden haber diversificado. Estos genes suelen ser requeridos en condiciones diferentes a las encontradas en el laboratorio [Goffeau et al., 1996]. Quizás por eso hemos observado que *ADH7* no se encuentra en algunas cepas de laboratorio, pero sí en cepas

vinícolas como V5 donde además se ha observado una alta expresión en ciertas condiciones (Dra. Silvie Dequin, comunicación personal).

Además, un estudio reciente realizado con los factores de transcripción Ymr1p y Yrr1p que funcionan de manera integrada, ha demostrado la inactivación constitutiva de *ADH7*. La expresión de *ADH7* está regulada por Ymr1p. Sólo en presencia del factor de transcripción Ymr1p habrá expresión de *ADH7*. Sin embargo, la presencia de Yrr1p anula la función de Ymr1p. Este estudio demuestra que no hay actividad de transcripción de Ymr1p en el contexto de la cepa silvestre crecida en condiciones normales, ya que siempre está reprimido por la presencia de Yrr1p. Esto explicaría que *ADH7* siempre esté inactivo y no se pueda detectar su producto génico [Lucao-Danila et al., 2003].

### **La función fisiológica de Adh6p**

La información disponible sobre el metabolismo de la levadura junto con la especificidad de sustrato de Adh6p han guiado el estudio funcional de Adh6p hacia una posible participación en la desintoxicación de productos derivados de la biodegradación de la lignina, en la formación de alcoholes superiores y en el balance NADP<sup>+</sup>/NADPH celular. Por su parte, los datos publicados en experimentos de expresión con la técnica de microarrays nos han dirigido hacia el estudio de la participación de Adh6p en el estrés oxidativo.

Aunque los microarrays son una metodología que aporta mucha información sobre la levadura en un momento y condiciones concretas, los resultados de expresión que se puedan deducir de ellos no se pueden extrapolar directamente al proteoma de la levadura. Ni la secuencia de un mRNA ni su abundancia pueden predecir la abundancia de su proteína correspondiente, y tampoco son predecibles las variaciones de los niveles de proteína debido al control de la traducción, ni las modificaciones post-traduccionales. Difícilmente tampoco serían predecibles otros mecanismos de regulación de la actividad enzimática como la localización celular, la asociación entre proteínas y biomoléculas, ni los mecanismos de control de la vida media de las proteínas [Gygi et al., 1999; Griffin et al., 2002].

### **Asimilación de productos procedentes de la degradación de la lignina**

Una de las principales fuentes de carbono está constituida por la biomasa de las plantas, compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Muchos microorganismos son capaces de degradar y utilizar la celulosa y hemicelulosa. Sin embargo, sólo un grupo reducido de hongos filamentosos tiene la capacidad de degradar la lignina. Estos hongos, los ‘white rot



fungi' (hongos de la podredumbre blanca), se nutren de los árboles caídos y demás residuos de los bosques, siendo el más conocido y estudiado, *Phanerochaete chrysosporium*.

La lignina, a diferencia de los otros polímeros de la madera, requiere de un ataque oxidativo para iniciar su degradación. La despolimerización de la lignina es un proceso necesario para obtener acceso a la celulosa y/o hemicelulosa ya que ningún microorganismo, incluido los hongos de la podredumbre blanca, son capaces de utilizar a la lignina como única fuente de carbono y energía. Los enzimas que inician el proceso son peroxidasas como la peroxidasa de lignina (LiP) o otras peroxidasas dependientes de manganeso y oxidasas extracelulares, generalmente inespecíficas. Estos enzimas generan una gran variedad de radicales altamente reactivos que provocan las reacciones de rotura de los enlaces del polímero de lignina. La oxidación de la lignina lleva a subproductos fenólicos y no-fenólicos como aldehídos, quinonas y grupos acídicos que son metabolizados intracelularmente por lo que se requieren enzimas reductores para completar la degradación [Cullen, D. y Kersten, P.J., 2004].

El veratril alcohol es un intermediario importante en el proceso de degradación. Su función es la de inducir la LiP y protegerla de su inactivación dependiente de  $H_2O_2$ . Se trata también, de un mediador redox entre la peroxidasa y la lignina ya que el veratril alcohol (VA) es oxidado al radical catión  $VA^+$  que se une al enzima hasta recuperar el electrón por oxidación de la lignina. Dentro de las reacciones que se producen a causa de estos radicales se encuentran las reacciones de degradación de enlaces  $C\alpha-C\beta$ , demetoxilación y rotura de anillos aromáticos. Se ha observado que en varios 'white rot fungi' el veratril alcohol puede ser sintetizado desde glucosa. Su biosíntesis se origina en la vía del shikimato (por fenilalanina y cinamato) [Mester et al., 1997]. El veratraldehído resultante de la oxidación debe ser reducido nuevamente a veratril alcohol para conseguir una mayor degradación de la lignina y completar el ciclo catalítico [Muheim et al., 1991; Gutierrez et al., 1994; Ten Have, R. y Franssen, M.C., 2001]. En *P. chrysosporium* la reducción de aldehídos tales como el veratraldehído, anisaldehído o vanillina la llevan a cabo las aril alcohol deshidrogenasas con actividad dependiente de NADP(H) [Muheim et al., 1991; Hage et al., 1999]. En *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado siete genes de la familia de las aril alcohol deshidrogenasas (AADs) con un 85% de identidad con la AAD de *P. chrysosporium*, de los que al parecer, tan sólo tres serían funcionales, *AAD3*, *AAD4* y *AAD14* [Delneri et al., 1999b]. A estos enzimas se les ha propuesto la función de degradar agentes oxidantes dañinos encontrados en el medioambiente como resultado de la acción degradadora de lignina que realizan hongos como *P. chrysosporium*. Sin embargo, aunque se ha observado que *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de convertir el

veratraldehído en veratril alcohol, ninguna de las AADs presentes en la levadura era la responsable de dicha actividad [Delneri et al., 1999a].

Los resultados que se presentan en el Capítulo I de esta Tesis demuestran que Adh6p es la única proteína de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de eliminar el veratraldehído del medio. Esta propiedad, además de permitir que la célula de levadura elimine el aldehído tóxico para poder continuar con su crecimiento, le permitiría vivir en entornos donde se esté dando la ligninólisis. El veratraldehído resultante del ciclo oxidativo podría ser regenerado a veratril alcohol que ayudaría a una mayor degradación de la lignina. De hecho, cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* contribuyen a la degradación oxidativa de hidrolizados de lignina, por tanto son capaces de contribuir a la ligninólisis y además se ha demostrado que pueden crecer en los hidrolizados de lignina como única fuente de carbono. Este hecho implica que la levadura puede degradar aquellos productos tóxicos presentes en los hidrolizados de lignina, como son los aldehídos y que los puede integrar dentro de su metabolismo [Kosikova, B. y Slavikova, E., 1996]. La levadura no sólo es capaz de degradar el veratraldehído sino que también se ha demostrado que es capaz de reducir la vanillina a vanillil alcohol, también presentes en los hidrolizados de lignina [Fitzgerald et al., 2003]. Si observamos las propiedades catalíticas de Adh6p y Adh7p (Tabla 1), es presumible que ambas enzimas participen en dicha función pues ambas presentan una actividad considerable con vanillina. Para la contribución de *Saccharomyces cerevisiae* en el metabolismo de la lignina, la levadura expresa descarboxilasas específicas que atacan a los ácidos *t*-ferúlico y *p*-coumárico, que son principales constituyentes de la macromolécula de lignina [Huang et al., 1993]. Esta capacidad no es única para *Saccharomyces cerevisiae* ya que se ha observado que son varios los microorganismos que aprovecharían la hidrólisis de lignina iniciada por *Phanerochaete chrysosporium* para degradar los subproductos derivados de la degradación. *Pseudomonas* y *Corynebacterium* catabolizan el eugenol, un aceite esencial muy abundante relacionado con la lignina [Furukawa et al., 1998].

### **Papel funcional durante el estrés oxidativo**

El medio ambiente que rodea a las células puede provocar diferentes situaciones de estrés como temperaturas extremas, déficit de agua, elevadas concentraciones de sal, falta de nutrientes, exposición a tóxicos, ...etc. Bajo estas circunstancias las células modifican su maquinaria para poder contrarrestar los efectos que las deterioran o los agentes que las dañan. Estos desequilibrios que afectan a varias funciones desencadenan la respuesta al estrés (ESR, environmental stress response) que implica la modulación de actividades enzimáticas y cambios en la expresión génica de varias vías de estrés [Gasch, A., 2002].

Las células que crecen aeróbicamente están expuestas a especies de oxígeno reactivas (ROS, reactive oxigen species) que se generan durante el metabolismo: la reducción del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O puede generar el radical anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el radical hidroxilo (HO<sup>•</sup>) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El estrés oxidativo se da cuando los mecanismos celulares de defensa no pueden bloquear estas ROS. Las ROS atacan a casi todos los componentes celulares como el ADN, las proteínas y los lípidos de membrana comprometiendo la viabilidad celular.

En este trabajo se ha estudiado el comportamiento de Adh6p durante el estrés oxidativo. Con la finalidad de crear dicho estrés se han añadido al medio de cultivo dos agentes oxidantes, la diamida y la menadiona. Estos dos compuestos provocan una respuesta al estrés oxidativo por diferentes rutas. Mientras que la diamida disminuye los niveles de glutatión celulares agotando el tamponador redox, la menadiona genera una serie de radicales en un ciclo autoregenerativo, la mismo tiempo que también afecta al nivel de glutatión celular ya que puede formar un conjugado con la molécula de glutatión que participará en la creación de más radicales oxidantes.

Los resultados obtenidos en los cultivos sometidos a estrés oxidativo demuestran que en la respuesta celular hay una clara inducción de *ADH6* que provoca un aumento de la actividad reductasa dependiente de NADPH y un aumento de los niveles de Adh6p. Este estrés parece modificar la expresión génica de Adh6p de una manera compleja, afectando a nivel transcripcional y traduccional, y posiblemente también a nivel post-traduccional. Además, la respuesta celular al estrés oxidativo sigue un patrón diferente según el compuesto que lo genere.

Cuando la diamida reduce los niveles de glutatión intracelular, hay una inducción rápida de *ADH6*. La actividad reductasa dependiente de NADPH aumenta junto con los niveles de Adh6p y se mantiene hasta el inicio de la fase estacionaria (Figura 3, Capítulo IV). No obstante, aunque no queda actividad reductasa en fase estacionaria, sí se mantiene un nivel de proteína elevado.

El estrés oxidativo generado por la menadiona también provoca una inducción rápida de *ADH6*. Sin embargo, los niveles iniciales de actividad reductasa dependiente de NADPH y Adh6p se recuperan en un tiempo relativamente corto. Es decir, tanto la respuesta como la recuperación del estrés oxidativo generado por la menadiona son rápidas (Figura 5, capítulo IV). Estos resultados implican que hay un aumento en la degradación intracelular de Adh6p.

La inducción de Adh6p durante la respuesta al estrés oxidativo es clara, sin embargo, no hay fenotipo diferenciado en la cepa *adh6Δ*. Esto no debe sorprendernos ya que en la levadura los sistemas de estrés inducido se solapan, de manera que algunos genes que juegan un papel en la respuesta puede ser que al deletarlos no confieran fenotipos específicos. La redundancia génica o vías compensatorias paralelas podrían enmascarar este fenotipo [Thorpe et al., 2004].

La vía de las pentosas es necesaria para la tolerancia a menadiona [Thorpe et al., 2004]. Una de las funciones principales de esta vía es la producción del poder reductor celular NADPH, que las funciones antioxidantes utilizan en la desintoxicación de iones superóxido y otras ROS. Adh6p podría estar funcionando como un enzima oxidante generando también equivalentes NADPH. Las propiedades cinéticas del enzima son más favorables para la reducción, sin embargo no es improbable que en condiciones de estrés oxidativo pudiera actuar en la oxidación de alcoholes. De hecho, no sería la única actividad aldehído reductasa dependiente de NADP(H) inducida en estrés oxidativo, pues se ha observado que la 2-metilbutanal reductasa, Ypr1p, también se induce en estas condiciones [Ford, G. y Ellis, E.M., 2002]. Ambos enzimas podrían estar aportando NADPH para mantener el balance en estas condiciones, que requieren un gasto de poder reductor importante.

### **Participación en la producción de alcoholes superiores**

Los alcoholes superiores constituyen uno de los grupos de compuestos organolépticos mayoritarios en las bebidas alcohólicas, la salsa de soja, el pan y las fragancias [Ingraham, J.L. y Guymon, J.F., 1960; Martínez-Anaya, M.A., 1996; Ibáñez et al., 1997; Priddy et al., 1999; Schoondermark-Stolk et al., 2005]. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede utilizar una gran variedad de aminoácidos como única fuente de nitrógeno, incluidos los aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina, cuyos principales productos catabólicos son el triptofol, tirosol y feniletanol. Estas condiciones de crecimiento provocan un aumento en la producción de alcoholes superiores ya que son el producto final de la ruta metabólica de Ehrlich [Ehrlich, F., 1907; Sentheshamuganathan, S., 1960].

El estudio de las diferentes etapas de esta vía metabólica ha conseguido identificar los enzimas involucrados en las reacciones de transaminación [Eden et al., 1996] y descarboxilación [Dickinson, et al., 1997; Dickinson et al., 1998; Dickinson et al., 2000a]. Sin embargo, aún son ambiguos los enzimas que participan en la reacción de reducción y se desconoce que coenzima sería el que preferentemente participaría en dicha actividad.

Los resultados obtenidos al analizar los niveles de Adh6p en cultivos crecidos en diferentes aminoácidos como única fuente de nitrógeno no ayudan a esclarecer esta duda. En ninguna de las condiciones analizadas se ve una inducción de la proteína. De hecho, *ADH6* parece estar reprimido en varias de las condiciones analizadas. Aunque no se haya detectado una inducción, la actividad reductasa con NADPH como coenzima no estaría descartada, fuera o no Adh6p la responsable en determinadas condiciones.

Los resultados obtenidos al analizar los niveles de los aldehídos y alcoholes producidos cuando la leucina, isoleucina o tirosina son la fuente de nitrógeno para la levadura, tampoco sacan de dudas. No existen diferencias entre la cepa control y la cepa *adh6Δ*, por lo que podría ser que Adh6p no tuviera un papel en la reducción de estos aldehídos, o bien, que su ausencia quedara compensada y enmascarada por otras actividades reductasas de la levadura. Hecho que no sería de extrañar dado que en *Saccharomyces cerevisiae* el conjunto de proteínas con actividad enzimática oxidorreductasa es muy amplio y presenta muchos solapamientos.

Un estudio reciente realizado por Dickinson y colaboradores examina la participación de las ADHs MDRs y las aril alcohol deshidrogenasas (AADs) en la producción de alcoholes isoamílicos, utilizando cepas mutantes para uno o varios enzimas. La delección de las AADs no reveló ningún efecto en la producción de alcoholes, por lo que su participación quedó desestimada. La combinación de delecciones para *ADH1-ADH5* y *SFA1* les llevó a concluir que la presencia de al menos una de estas proteínas sería suficiente para producir los alcoholes complejos, por lo que cualquiera de estas ADHs podría llevar a cabo la función de reducción de los aldehídos de Strecker [Dickinson et al., 2003]. No obstante se utilizaron fondos genéticos muy diferentes, con lo que las comparaciones en la producción de alcoholes superiores no sería del todo fiable ya que esta producción es muy característica de cada cepa [Etschmann et al., 2003].

Estos resultados serían coherentes con la gran complejidad del sistema de oxidoreductasas de *Saccharomyces cerevisiae* ya que en la medida de lo posible, la falta de una actividad deshidrogenasa se compensaría con la de otro enzima. Esta estrategia sería muy adecuada en un organismo en el que el proceso de fermentación es sumamente importante. Sin embargo, el estudio de Dickinson y colaboradores no es del todo completo ya que no estudiaron el papel de otras MDRs. La especificidad de sustrato descartó, con buen criterio, a *BDH1*, *SOR1* y *XYL2*, pero también descartaron el estudio de *ADH6* y *ADH7* dada su dependencia catalítica por el NADPH. Esta exclusión no es quizás muy justificada porque son muchos los indicios de que la actividad isoamilaldehído reductasa está ligada al coenzima NADPH. Es más, en los estudios comparativos realizados con las cepas Wt y *adh6Δ* en esta Tesis, hemos demostrado

que Adh6p es el único enzima capaz de reducir el 3-metilbutanal y que también es el único capaz de reducir el metional utilizando al NADPH como coenzima en medio rico.

Son varios los estudios que apoyan el papel de Adh1p como enzima responsable de la reducción en la etapa final de la formación de los alcoholes superiores puesto que en glucosa es cuando se obtienen mayores niveles de alcoholes. Es lógico pensar que en el flujo glucolítico hay una producción de poder reductor en forma de NADH, que se debería reoxidar para mantener la ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  [Van Iersel et al., 2000; Schoondermark-Stolk et al., 2005]. Sin embargo, las características cinéticas del enzima son contrarias a esta función, puesto que la actividad de Adh1p con aldehídos voluminosos como el 3-metilbutanal es prácticamente inexistente [Collin et al., 1991; TerShure et al., 1998; Ford, G. y Ellis, E.M., 2002]. Incluso se han construido enzimas Adh1p mutantes que intercambian residuos voluminosos del centro activo como la Thr 48, Trp 57, Trp 93 o Met 294 por residuos de menor tamaño para ‘ganar espacio’ en el centro activo del enzima, de manera que se pudieran ubicar sustratos de mayor volumen. Como resultado, Adh1p seguía siendo poco activa con sustratos como el 2-metilbutanol, por lo que además de requerir un espacio adicional para alojar estos compuestos se requieren otro tipo de interacciones que favorezcan la catálisis [Leskovac et al., 2002, Green et al., 1993]. En la presente Tesis hemos realizado actividades en extractos de levadura donde la única actividad de reducción del 3-metilbutanal está ligada a la oxidación del coenzima NADPH, por lo que deducimos que Adh1p no podría estar implicada en esta función.

En cuanto a las otras ADHs que supuestamente contribuirían a la reducción de los aldehídos a sus alcoholes correspondientes en la vía de Ehrlich, podríamos descartar a algunos de estos enzimas por su baja expresión o su especificidad de sustrato. *ADH2* no se expresa en glucosa, cuando hay mayor producción de alcoholes, por lo que al menos en estas condiciones sería necesaria otra proteína que realizara esta función. Adh3p presenta unas propiedades cinéticas muy similares a las de Adh1p, y además su participación en el metabolismo de la levadura es más importante en condiciones no fermentativas, que es cuando hay menor producción de alcoholes superiores. *ADH4* no se expresa generalmente [Drewke, C. y Ciriacy, M., 1988]. De *ADH5* no conocemos su patrón de expresión ni su especificidad de sustrato, por lo que resulta toda una incógnita. Finalmente, Sfa1p no presenta el espectro de sustratos adecuado para realizar esta actividad.

Pero tal y como se avanza en la Introducción, la levadura dispone de más proteínas capaces de reducir estos aldehídos utilizando NADH [VanIersel et al., 1997] o NADPH como coenzima [Wales, M.R. y Fewson, C.A., 1994; VanIersel et al., 1997; VanNedervelde et al., 1997; Ford, G. y Ellis, E.M., 2002]. Los parámetros cinéticos de estos enzimas, así como los

encontrados para Adh6p y Adh7p, son favorables a la reducción de aldehídos lineales, ramificados y aromáticos en dependencia al coenzima NADPH. El hecho de que en la levadura la actividad 3-metilbutanal reductasa dependiente de NADH sea prácticamente nula, indica que esta reducción la llevaran a cabo enzimas dependientes de NADP(H), tal y como otros autores han propuesto [Debourg et al., 1994; Shimizu et al., 2002]. Además, se ha observado que la actividad 3-metilbutanal reductasa dependiente de NADP(H) aumenta en cepas ADH<sup>0</sup> y se corresponde con la actividad 3-metiltiopropional reductasa, de manera que sería el mismo enzima el encargado de ambas reducciones [Perpete, P. y Collin, S., 1999], resultados que hemos confirmado en esta Tesis. Sin embargo, la actividad reductasa para aldehídos lineales como el hexanal estaría claramente favorecida para enzimas con actividad dependiente de NAD(H) [Evellin et al., 1999] aunque se ha demostrado que en células de levadura inmovilizadas la actividad dependiente de NADP(H) con estos aldehídos contribuye de forma mayoritaria a su reducción [Debourg et al., 1994].

Los resultados obtenidos no dejan de ser sorprendentes. Una vez demostrada la implicación de Adh6p en la reducción del 3-metilbutanal, era de esperar que la ausencia de *ADH6* provocara una acumulación de dicho aldehído, con la consecuente disminución de los niveles de 3-metilbutanol. Sin embargo, esto no ha ocurrido. Los niveles de volátiles presentes en las cepas Wt y *adh6Δ* son prácticamente idénticos, por lo tanto debe haber otro/s enzima/s capaz/ces de realizar esta función en la levadura.

Por otra parte, una falta de implicación de Adh6p en la reducción de los aldehídos de la ruta de Ehrlich tampoco concordaría con los resultados obtenidos en esta Tesis dado que en los extractos de la cepa *adh6Δ* no se ha detectado ninguna actividad similar. Revisando las condiciones en las que hemos desarrollado los experimentos de análisis de la composición de volátiles y los experimentos comparativos de la actividad reductasa en las cepas Wt y *adh6Δ*, la diferencia más relevante estaría en la composición del medio de cultivo. Mientras que las actividades específicas que identifican a Adh6p como única responsable de la actividad 3-metilbutanal reductasa se han realizado en medio rico (YPD), los análisis de volátiles se han realizado en medio mínimo selectivo (MMS) con un aminoácido como única fuente de nitrógeno (leucina, isoleucina o tirosina). Sería posible que las condiciones empleadas para favorecer la producción de alcoholes superiores implicasen un cambio en el metabolismo de la levadura que repercutiría en la expresión de *ADH6*, así como en la expresión de otras enzimas con actividad reductasa.

	Características destacables	Sustrato	K <sub>M</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
<b>Ypr1p</b> [Ford, G. y Ellis, E.M., 2002]	No es activa con 3-metilbutanal	Hexanal	0.39	5.9	15.1
		2-Metilbutanal	1.09	8.7	8.0
<b>NADP-ADH</b> [Wales, M.R. y Fewson, C.A., 1994]		Butanal	0.75	19.6	26
<b>bcADH</b> [Van Iersel et al., 1997]	NAD(H)/NADP(H) Inducción en anaerobiosis	Hexanal	0.18	71	400
		2-Metilbutanal	1.85	113	61
		3-Metilbutanal	0.21	75	360
<b>Adh6p</b> [Larroy et al., 2002a]	Expresión en fase logarítmica	Hexanal	0.152	354	2330
		3-Metilbutanal	0.129	233	1820

**Tabla 3.** Propiedades cinéticas de los enzimas con actividad aldehído reductasa dependiente de NADP(H) caracterizados hasta la fecha.

En la Tabla 3 se muestra un resumen de las propiedades cinéticas de los enzimas con actividad aldehído reductasa dependiente de NADPH que se han descrito en la levadura. Los valores de K<sub>M</sub>, así como de eficiencia catalítica son más favorables para Adh6p (de 5 a 20 veces). Además Adh6p se expresa durante la fase logarítmica del crecimiento y posee una mayor especificidad de sustrato. Teniendo en cuenta todas estas características, Adh6p parece ser la mejor candidata para llevar a cabo estas reducciones en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en las condiciones de crecimiento consideradas estándar (medio rico).

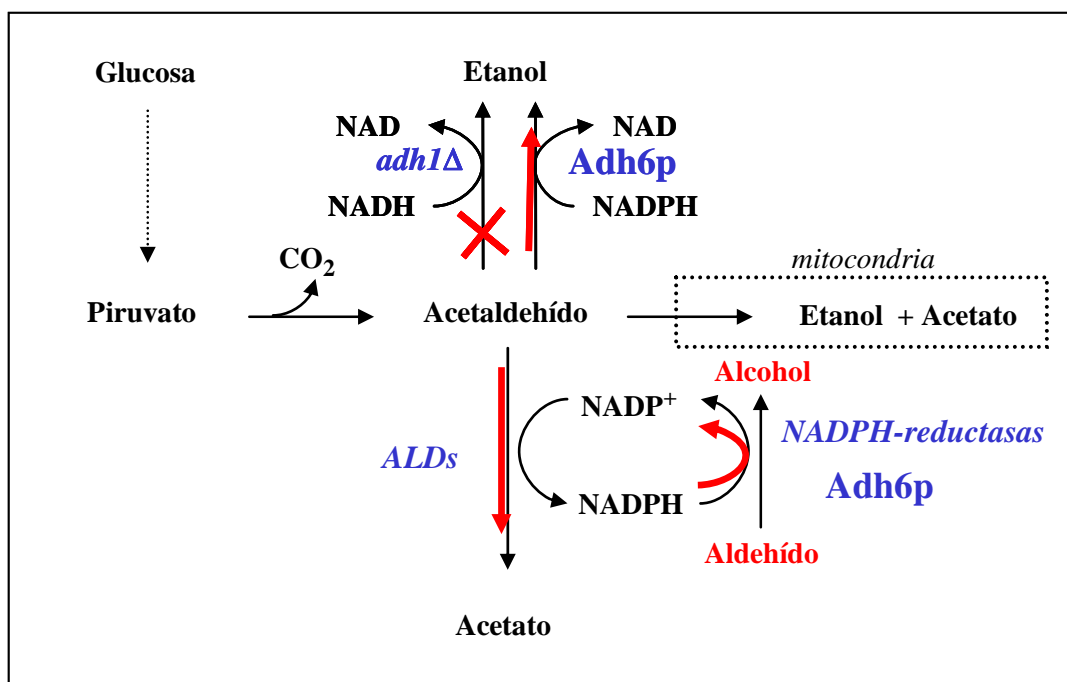
### Participación en la reducción de aldehídos: mantenimiento del balance redox NADP<sup>+</sup>/NADPH

El estudio realizado sobre las cervezas sin alcohol llevó a proponer un modelo para la regeneración del cofactor NADP<sup>+</sup>, en el que son esenciales las aldehído reductasas con actividad dependiente de NADPH [Evellin et al., 1999]. Las cervezas sin alcohol se caracterizan por presentar sabores peculiares que le confieren un carácter similar al del mosto. Aumentar la reducción por parte de las levaduras del 3-metilpropionaldehído, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal parece la forma más adecuada de mejorar la calidad organoléptica de dichas cervezas. Generalmente la producción de cerveza sin alcohol se realiza por contacto frío ya que a 0°C se produce una reducción significativa de muchos carbonilos sin elevar el contenido en etanol. Desafortunadamente, la disminución de la actividad reductasa dependiente de NADPH



en estas condiciones deja niveles residuales de 3-metilpropionaldehído por encima de su umbral de percepción.

Para buscar un aumento de la actividad aldehído reductasa dependiente de NADP(H), Evellin y colaboradores trabajaron con cepas mutantes en ADHs ya que la actividad dependiente de NAD(H) no era de interés para disminuir los niveles de 3-metilbutanal por su falta de actividad con dicho compuesto. Estos estudios han demostrado que con la única delección de *ADH1* ya se consigue una cepa con actividad 3-metilbutanal reductasa dependiente de NADPH incrementada en un factor de 13. La explicación de este aumento de la actividad aldehído NADPH-reductasa está relacionada con el flujo de acetaldehído. La ausencia de Adh1p provoca la acumulación del aldehído en la célula. En las cepas  $\Delta adh1$  crecidas con glucosa como fuente de carbono se ha detectado la formación de acetato en cantidades superiores a la cepa silvestre y esta conversión del acetaldehído en acetato la llevan a cabo las aldehído deshidrogenasas (ALD). La mayor contribución de la actividad ALD en la célula la realiza Ald6p, el enzima citosólico que utiliza  $\text{NADP}^+$  como coenzima. Por lo que en estas condiciones la actividad ALD y la formación de acetato vendrá acompañada de un aumento de los niveles de NADPH. Para un correcto funcionamiento de la célula se debe mantener el balance redox  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  estable, por lo que la cepa *adh1* $\Delta$  requerirá de un aumento de la actividad NADPH-reductasa que regenere el  $\text{NADP}^+$  gastado en la formación de acetato (figura 4).



**Figura 4:** Esquema modificado del modelo de regeneración del cofactor  $\text{NADP}^+$  propuesto por Evellin y colaboradores [Evellin et al., 1999]. Se incluye la posible función de Adh6p. En rojo están marcadas las vías que aumentan su participación en la cepa *adh1* $\Delta$ .

Evellin y colaboradores proponen que la actividad aldehído reductasa dependiente de NADPH la llevarían a cabo enzimas de la familia aldocetorreductasa ya que por entonces eran las únicas actividades aldehído reductasas descritas. Sin embargo, es razonable proponer que esta actividad la podría llevar a cabo Adh6p ya que la eficiencia catalítica de este enzima con los aldehídos ensayados por Evellin y colaboradores, hexanal y 3-metilbutanal, es realmente buena ( $k_{cat}/K_M=140.000 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$  para el hexanal y  $k_{cat}/K_M=109.000 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$  para el 3-metilbutanal) y se ha demostrado que Adh6p es la única proteína implicada en la reducción del 3-metilbutanal en estas condiciones. El estudio con la cepa *adh1Δ* observa un incremento en las actividades hexanal reductasa y 3-metilbutanal reductasa dependientes de NADPH, obteniéndose siempre valores muy similares para ambas actividades. Este hecho concuerda con las propiedades cinéticas de Adh6p, que presenta valores de  $k_{cat}/K_M$  muy similares para ambos sustratos (Tabla 2 ). Por otra parte, Adh6p también podría participar en la eliminación del acetaldehído del medio reduciéndolo a etanol, ya que hemos demostrado que el enzima es capaz de oxidar el etanol empleando NADP<sup>+</sup> como coenzima (figura 13, Capítulo IV).

**CONCLUSIONES**

El estudio sobre *ADH6* y *ADH7* y sus productos génicos Adh6p y Adh7p ha llevado a las siguientes conclusiones:

- 1.- Se han sobreexpresado los genes *YMR318C* y *YCR105W*, y se han purificado sus productos génicos. La caracterización cinética de ambas proteínas nos ha permitido identificarlas como dos alcohol deshidrogenasas dependientes de NADP<sup>+</sup>, Adh6p y Adh7p.
- 2.- Tanto Adh6p como Adh7p presentan una amplia variedad estructural de sustratos, como alcoholes primarios o aldehídos, tanto alifáticos lineales como ramificados, hasta alcoholes o aldehídos aromáticos. Sin embargo, no presentan actividad con cetonas.
- 3.- La eficiencia catalítica de Adh6p y Adh7p es muy similar y 50-100 veces superior para la reacción de reducción, con los valores más elevados para el pentanal, veratraldehído y 3-metilbutanal.
- 4.- El análisis de la secuencia de *ADH6* y *ADH7* junto con las características cinéticas de Adh6p y Adh7p han permitido clasificar a estas enzimas dentro de la familia de las cinamil alcohol deshidrogenasas, en la subfamilia de las CAD-related.
- 5.- Se ha resuelto la estructura cristalina de Adh6p que ha permitido describir las características generales del enzima, así como los residuos implicados en las interacciones con el coenzima.
- 6.- El estudio de la estructura tridimensional de Adh6p ha permitido proponer que el enzima actúa con un mecanismo 'half-of-the-sites reactivity', resultado que viene apoyado con estudios de cuantificación de la unión al coenzima.
- 7.- Se ha demostrado que Adh6p participa directamente en la eliminación del veratraldehído, un producto tóxico derivado de la degradación de la lignina. Adh6p es la única proteína necesaria para la completa eliminación del aldehído y para la supervivencia de la cepa en presencia del tóxico. Adh7p, aunque no es necesaria, podría ayudar a la desintoxicación del veratraldehído.
- 8.- El análisis de la expresión de *ADH6* sugiere que Adh6p está implicada en procesos de defensa ante el estrés oxidativo.

- 9.- La baja expresión de Adh7p en las cepas estudiadas, su ausencia en varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y la gran similitud de sus características cinéticas con las descritas para Adh6p, sugiere que su función es redundante, fruto de alguna duplicación génica que no ha evolucionado de forma productiva para la célula.
- 10.- Adh6p es la responsable de prácticamente toda la actividad 3-metilbutanal reductasa en la célula de *Saccharomyces cerevisiae* en medio rico. También participa activamente en la reducción del 3-metilpropanal con NADPH como coenzima.
- 11.- El análisis de la expresión de Adh6p en cepas crecidas con diferentes fuentes de nitrógeno, así como el análisis de alcoholes superiores de estos cultivos, indica que Adh6p no es esencial para su producción en *Saccharomyces cerevisiae* en las condiciones utilizadas. Sin embargo, dado que el sistema alcohol deshidrogenasa en la levadura es muy complejo, los ensayos realizados no excluyen la participación de Adh6p en este proceso, conjuntamente con otras actividades aldehído reductasas.
- 12.- Los estudios realizados con la cepa de levadura  $\Delta adh1$  apoyan una función de Adh6p en el mantenimiento del balance redox  $NADP^+/NADPH$  en la célula. También sugieren una contribución en la reducción del acetaldehído dependiente de NADPH.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## A

**Ammerer, G.**

Expression of genes in yeast using the ADCI promoter.  
(1983) *Methods Enzymol.*, **101**: 192-201

**Anderson, A.C., O'Neil, R.H., DeLano, W.L. y Stround, R.M.**

The structural mechanism for half-the-sites reactivity in an enzyme, thymidylate synthase, involves a relay of changes between subunits.  
(1999) *Biochemistry*, **38**: 13829-13836

**Antonelli, A., Castellari, L., Zamborelli, C. y Carnacini, A.**

Yeast influence on volatile composition of wine.  
(1999) *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 1139-1144

**Aznar, M., Lopez, R., Cacho, J.F. y Ferreira, V.**

Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions.  
(2001) *J. Agric. Food Chem.*, **49** (6): 2924-2929

## B

**Bakker, B.M., Bru, C., Kötter, P., Luttik, M.A.H., Van Dijken, J.P. y Pronk, J.T.**

The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*.  
(2000) *J. Bacteriol.*, **182** (17): 4730-4737

**Bennetzen, J.L. y Hall, B.D.**

The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase I.  
(1982) *J. Biol. Chem.*, **257** (6): 3018-3025

**Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P.A. y Hilger, F.**

The Ydp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*.  
(1991) *Yeast*, **7**: 475-477

**Bomati, E.K. y Noel, J.P.**

Structural and kinetic basis for substrate selectivity in sinapyl alcohol dehydrogenase.  
(2005) *Plant Cell*, **17** (5): 1598-1611

**Bottoms, C.A., Smith, P.E. y Tanner, J.J.**

A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domains.  
(2002) *Prot. Sci.*, **11**: 2125-2137

**Boudet, A.M., Hawkins, S. y Rochange, S.**

The polymorphism of the genes/enzymes involved in the last two reductive steps of monoglignol synthesis: what is the functional significance?  
(2004) *C. R. Biologies*, **327**: 837-845

**Brändén C.I., Eklund, H., Nordstrom, B., Boiwe, T., Soderlund, G., Zeppezauer, E., Ohlsson, I. y Åkeson, Å.**

Structure of liver alcohol dehydrogenase at 2.9Å resolution.  
(1973) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70** (8): 2439-3442

**C****Carugo, O. y Argos, P.**

NADP-dependent enzymes. I: Conserved stereochemistry of cofactor binding.  
(1997) *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **28**: 10-28

**Chen, E.C.H.**

The relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols.  
(1978) *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, pp 39-43

**Ciriacy, M.**

Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose repressible ADH II.  
(1975) *Mol. Gen. Genet.*, **138** (2): 157-164

**Ciriacy, M.**

Alcohol dehydrogenases.  
In *Yeast sugar metabolism: biochemistry, genetics, biotechnology and applications*. pp. 73-142 (Eds. Zimmerman, F.K. y Entian, K.D.)  
(1997) Technomic Publishic CoInc (Lancaster) Pennsylvania, USA

**Conway, T, Sewell, G.W., Osman, Y.A. y Ingram, L.O.**

Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*.  
(1987) *J. Bacteriol.*, **169**: 2591-2597

**Collin, S., Montesinos, M., Meersmon, E., Swinkels, W. y Dufour, J.P.**

Yeast dehydrogenase activities in relation to carbonyl compounds removal from wort and beer.  
(1991) 23<sup>rd</sup> *EBC Congres*, pp 409-416

**Cullen, D. y Kersten, P.J.**

Enzymology and molecular biology of lignin degradation.  
In *The mycota III. Biochemistry and molecular biology*, 2<sup>nd</sup> edition. Ch. 13, pp. 249-273 (Eds. Brambl, R. y Marzluf, G.A.)  
(2004) Springer-Verlag. Berlin- Heidelberg.

**D****Daran-Lapujade, P., Daran, J.M., Kötter, P., Petit, T., Piper, M.D.W y Pronk, J.T.**

Comparative genotyping of the *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strains S288C and CEN.PK113-7D using oligonucleotide microarrays.  
(2003) *FEMS Yeast Reserch*, **4**: 259-269

**Debourg, A., Laurent, M., Googsens, E., Borremans, E., Van de Winkel, L. y Masschelein, C.A.**

Wort aldehyde reduction potential in free an immobilized yeast systems.  
(1994) *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **52** (3): 100-106

**a Delneri, D. Gardner, D.C., Bruschi, C.V. y Oliver, S.G.**

Disruption of seven hypothetical aryl alcohol dehydrogenase genes from *Saccharomyces cerevisiae* and construction of a multiple knock-out strain.  
(1999) *Yeast*, **15**: 1681-1689



**b Delneri, D., Gardner, D.C. y Oliver, S.G.**

Analysis of the seven-member AAD gene set demonstrates that the genetic redundancy in yeast may be more apparent than real.

(1999) *Genetics*, **153**: 1591-1600

**Deltombe-Lietaert, M.G., Delcour, J., Lanelle-Monfort, N. y Elens, A.**

Ethanol metabolism in *Drosophila melanogaster*.

(1979) *Experientia.*, **35 (5)**: 579-581

**Denis, C.L., Ferguson, J. y Young, E.T.**

mRNA levels for the fermentative alcohol dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* decrease upon growth on a nonfermentable carbon source.

(1983) *J. Biol. Chem.*, **258 (2)**: 1165-1171

**Dickinson, F.M. y Dack, S.**

The activity of yeast ADH I and ADH II with long-chain alcohols and diols.

(2001) *Chem. Biol. Interact.*, **130-132**: 417-423

**Dickinson, J.R., Lanterman, M., Danner, D.J., Pearson, B.M., Sanz, P., Harrison, S.J. y Hewlins, M.J.E.**

A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccaromyces cerevisiae*.

(1997) *J. Biol. Chem.*, **272 (43)**: 26871-26878

**Dickinson, J.R., Harrison, S.J. y Hewlins, M.J.E.**

An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*.

(1998) *J. Biol. Chem.*, **273 (40)**: 25751-25756

**a Dickinson, J.R., Harrison, S.J., Dickinson, J.A. y Hewlins, M.J.E.**

An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*.

(2000) *J. Biol. Chem.*, **275 (15)**: 10937-10942

**b Dickinson, J.R.**

Pathways of leucine and valine catabolism in yeast.

(2000) *Methods Enzymol.*, 324, chap. 36: **80-92**

**Dickinson, J.R., Salgado, L.E.J. y Hewlins, M.J.E.**

The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*.

(2003) *J. Biol. Chem.*, **278 (10)**: 8028-8034

**Drewke, C., Ciriacy, M.**

Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase IV from *Saccharomyces cerevisiae*.

(1988) *Biochim. Biophys. Acta.*, **950 (1)**: 54-60

**Dunn, M.F., Berhard, S.A., Anderson, D., Copeland, A y Morris, R.G.**

On site-site interactions in the liver alcohol dehydrogenase catalytic mechanism.

(1979) *Biochem.*, **18 (11)**: 2346-2354

**E****Eden, A., Simchem, G. y Benvenisty, N.**

Two yeast homologs of *ECA39*, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases.

(1996) *J. Biol. Chem.*, **271** (34): 20242-20245

**Eklund, H., Nordström, B., Zeppezauer, E., Söderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T., Sodeberg, B.O., Tapia, O., Branden, C.I. y Akeson, A.**

Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2-4 Å resolution.

(1976) *J. Mol. Biol.*, **102**: 27-59

**Eklund, H. y Brändén, C.I.**

Structural differences between apo and holoenzyme of horse liver alcohol dehydrogenase.

(1979) *J. Biol. Chem.*, **254** (9): 3458-3461

**Eklund, H. y Brändén, C.I.**

Alcohol dehydrogenase.

(1987) *Biological Macromolecules and assemblies* (Furnak, F.A. & McPerson, A. eds)

John Wiley & Sons Inc., London

**Ehrlich, F.**

Über das natürliche isomere des leucins.

(1907) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **37**: 1809-1840

**Etschmann, M.M., Sell, D. y Schrader, J.**

Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium.

(2003) *Biotechnol. Lett.*, **25** (7): 531-536

**Evellin, F., Perpete, P. y Collin, S.**

Yeast *ADH1* disruption: a way to promote carbonyl compounds reduction in alcohol-free beer production.

(1999) *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **57** (3): 109-113

**F****Fan, F., Lorenzen, J.A. y Plapp, B.V.**

An aspartate residue in yeast alcohol dehydrogenase I determines the specificity for coenzyme.

(1991) *Biochem.*, **30** (26): 6397-6401

**Fernández, M.R., Biosca, J.A., Norin, A., Jörnvall, H. y Parés, X.**

Class III alcohol deshydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: structural and enzymatic features differ toward the human/mammalian forms in a manner consistent with functional needs in formaldehyde detoxication.

(1995) *FEBS Lett.*, **370** (1-2): 23-26

**Fernández, M.R., Biosca, J.A. y Parés, X.**

S-nitrosoglutathione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localization.

(2003) *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**: 1013-1018

**Fitzgerald, D.J., Stratford, M. y Narbad, A.**

Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin.

(2003) *Int. J. Food Microbiol.*, **86**: 113-122

**Ford, G., y Ellis, E.M.**

Caracterización de Ypr1p from *Saccharomyces cerevisiae* as a 2-methylbutyraldehyde reductase.

(2002) *Yeast*, **19**: 1087-1096

**Furukawa, H., Wieser, M., Morita, H., Sugio, T y Nagasawa, T.**

Purification and characterization of eugenol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* E118.

(1998) *Arch. Microbiol.*, **171** (1): 37-43

**G****Ganzhorn, A.J., Green, D.W., Hershey, A.d., Gould, R.M. y Plapp, B.V.**

Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases. Amino acid residue 294 and substrate specificity.

(1987) *J. Biol. Chem.*, **262** (8): 3754-3761

**Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D. y Brown, P.O.**

Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes.

(2000) *Mol. Biol. Cell*, **11**: 4241-4257

**Gasch, A.P**

The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses.

(2002) *Yeast Stress Response*. Hohmann, S. y Manger, P. (Vol 1), 11-70

*Topics in Current Genetics* (Hohmann, S. ed.)

**Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. y Oliver, S.G.**

Life with 6000 genes.

(1996) *Nature*, **274**: 563-567

**Goffner, D., Doorselaere, J.V., Yahiaoui, N., Samaj, J., Grima-Pettenati, J. y Boudet, A.M.**

A novel aromatic alcohol dehydrogenase in higher plants: molecular cloning and expression.

(1998) *Plant Mol. Biol.*, **36**(5): 755-765

**Gonzalez, E., Fernández, M.R., Larroy, C., Solà, Ll. Pericàs, M.A., Parés, X. y Biosca, J.A.**

Characterization of a (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* YAL060W gene product.

(2000) *J. Biol. Chem.*, **275** (46): 35876-35885

**Gonzalez, E.**

Estudi funcional de la butanodiol deshidrogenasa (Bdh1p) de *Saccharomyces cerevisiae*. Aplicacions biotecnològiques a la indústria cervecera.

(2004) Tesis Doctoral. Dpto Bioquímica y Biología Molecular, UAB.

**Green, D.W., Sun, H.W. y Plapp, B.V.**

Inversion of the substrate specificity of yeast alcohol dehydrogenase.  
(1993) *J. Biol. Chem.*, **268** (11): 7792-7798

**Griffin, T.J., Gygi, S.P., Ideker, T., Rist, B., Eng, J., Hood, L. y Aebersold, R.**

Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*.  
(2002) *Mol. Cell. Proteomics*, **1.4**: 323-333

**Gutierrez, A., Caramelo, L., Martínez, M.J. y Martínez, A.T.**

Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in lignolytic fungi of the genus *Pleurotus*.  
(1994) *Appl. Environ. Microbiol.*, **60** (6): 1783-1788

**Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R. y Aebersold, R.**

Correlation between protein and mRNA abundance in yeast.  
(1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19** (3): 1720-1730

## H

**Hage, A., Schoemaker, H.E. y Field, J.A.**

Reduction of aryl acids by white-rot fungi for the biocatalytic production of aryl aldehydes and alcohols.  
(1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52** (6): 834-838

**Hilt, W.**

Targets of programmed destruction: a primer to regulatory proteolysis in yeast.  
(2004) *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**: 1615-1632

**Huang, Z., Dostal, L. y Rosazza, J.P.**

Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*.  
(1993) *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 2244-2250

## I

**Ibañez, E., López-Sebastián, S. Ramos, E., Tabera, J. y Reglero, G.**

Analysis of highly volatile components of foods by off-line SFE/GC.  
(1997) *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 3940-3943

**Iborra, F.J., Renau-Piqueras, J., Portolés, M., Boleda, M.D., Guerri, C. y Parés, X.**

Immunocytochemical and biochemical demonstration of formaldehyde dehydrogenase (class III alcohol dehydrogenase) in nucleus.  
(1992) *J. Histochem. Cytochem.*, **40** (12): 1865-1878

**Ingraham, J.L. y Guymon, J.F.**

The formation of higher aliphatic alcohols by mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*.  
(1960) *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**: 157-166

**Ingraham, J.L., Guymon, J.F. y Crowell, E.A.**

The pathway of formation of *n*-butyl and *n*-amyl alcohols by a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*.  
(1961) *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**: 169-175

**Izard, T. y Geerlof, A.**

The crystal structure of a novel bacterial adenylyltransferase reveals half of the sites reactivity.  
(1999) *EMBO J*, **18 (8)**: 2021-2030

**J****Jensen, D.E., Belka, G.K. y Du Bois, G.C.S.**

S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme.  
(1998) *Biochem. J.*, **331 (2)**: 659-668

**Jones, E.W.**

Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*.  
(1991) *Methods Enzymol.*, **194**: 428-453

**Jörnvall, H., Persson, B. y Jeffery, J.**

Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases.  
(1987) *Eur. J. Biochem.*, **167**: 195-201

**Jörnvall, H., Höög, J.O. y Persson, B.**

SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin and complex nature.  
(1999) *FEBS Lett.*, **445**: 261-264

**Jörnvall, H., Shafqat, J y Persson, B.**

Variations and constant patterns in eukaryotic MDR enzymes. Conclusions from novel structures and characterized genomes.  
(2001) *Chem. Biol. Interact.*, **130-132**: 491-498

**Julián-Sánchez, A. y Riveros-Posas, H.**

Deshidrogenasas/reductasas de cadena media: un mismo andamio para múltiples funciones.  
(2005) Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. (13-18 Nov.) Oaxaca

**K****Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H y Persson, B.**

Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). Coenzyme based functional assignments in completed genomes.  
(2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**: 4409-4417

**Karlsson, C., Jörnvall, H. y Höög, J.O.**

Zinc binding of alcohol and sorbitol dehydrogenases.  
(1995) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **372**: 397-406

**Kim, J.H., Campbell, B.C., Mahoney, N.E., Chan, K.L. y Molyneux, R.J.**

Identification of phenolics for control of *Aspergillus flavus* using *Saccharomyces cerevisiae* in a model target-gene bioassay.  
(2004) *J. Agric. Food. Chem.*, **52**: 7814-7821

**Kim, K.J. y Howard, A.J.**

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the crystal form of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase I: evidence for the existence of Zn ions in the crystal.

(2002) *Acta Cryst. Sect. D*, **58**: 1332-1334

**Koerkamp, M.G., Rep, M., Bussemaker, H.J., Hardy, G.P.M.A., Mul, A., Piekarska, K., Szigyarto, A., Teixeira de Mattos, J.M. y Tabak, H.F.**

Dissection of transient oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae* by using DNA microarrays.

(2002) *Mol. Biol. Cell*, **13**: 2783-2794

**Korkhin, Y., Kalb(Gilboa), A.J., Peretz, M., Bogin, O., Burstein, Y. y Frolow, F.**

NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*.

(1998) *J. Mol. Biol.*, **278**: 967-981

**Kosikova, B. y Slavikova, E.**

Growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra* and *Bullera alba* in the presence of beechwood prehydrolyzate-based lignin fractions.

(1996) *Folia Microbiol.* (Prague), **41** (5): 430-432

**Kusano, M., Sakai, Y., Kato, N., Yoshimoto, H., Sone, H. Y Tamai, Y.**

Hemiacetal dehydrogenation activity of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*.

(1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62** (10): 1956-1961

**Kvassman, J., Larsson, A. y Pettersson, G.**

Substituent effects on the ionization step regulating desorption and catalytic oxidation of alcohols bound to liver alcohol dehydrogenase.

(1981) *Eur. J. Biochem.*, **114**: 555-563

**L****Laemmly, U.K.**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

(1970) *Nature*, **227**: 680-685

**a Larroy, C., Fernández, M.R., González, E., Parés, X. y Biosca, J.A.**

Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (*ADH6*) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase. Relevance in aldehyde reduction.

(2002) *Biochem. J.*, **361**: 163-172

**b Larroy, C., Parés, X. y Biosca, J.A.**

Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family.

(2002) *Eur. J. Biochem.* **269**: 5738-5745

**Larroy, C., Fernández, M.R., González, E., Parés, X. y Biosca, J.A.**

Properties and functional significance of *Saccharomyces cerevisiae* ADHVI.

(2003) *Chem. Biol. Interact.* **143-144**: 229-238.

**Lashkari, D.A., DeRisi, J.L., McCusker, J.H., Namath, A.F., Gentile, C., Hwang, S.Y., Brown, P.O. y Davis, R.W.**

Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis.

(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 13057-13062

**Lauvergeat, V., Kennedy, K., Feuillet, C., McKie, J.H., Gorrichon, L., Baltas, M., Boudet, A.M., Grima-Pettenati, J. y Douglas, K.T.**

Site-directed mutagenesis of a serine residue in cinnamyl alcohol deshydrogenase, a plant NADPH-dependent dehydrogenase, affects the specificity for the coenzyme.  
(1995) *Biochemistry*, **34**: 12426-12434

**Larsson, S., Quintana-Sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N.O. y Jönsson, L.J.**

Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*.  
(2000) *Appl. Biochem. Biotech.*, **67** (3): 1163-1170

**Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J. y Toledano, M.B.**

Yap1p y Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast.  
(1999) *J. Biol. Chem.*, **274** (23): 16040-16046

**Leskovac, V., Trivic, S. y Pericin, D.**

The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.  
(2002) *FEMS Yeast Res.*, **2**: 481-494

**Li, L., Cheng, X.F., Leshkevich, J., Umezawa, T., Harding, S.A. y Chiang, V.L.**

The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase.  
(2001) *Plant Cell*, **13** (7): 1567-1585

**Lucao-Danila, A., Delaveau, T., Lelandais, G., Devaux, F. Y Jacq, C.**

Competitive promoter occupancy by two yeast paralogous transcription factors controlling the multidrug resistance phenomenon.  
(2003) *J. Biol. Chem.*, **278** (52): 52641-52650

## M

**Martinez-Anaya, M.A.**

Enzymes and bread flavor.  
(1996) *J. Agric. Food Chem.*, **44** (9): 2469-2480

**McKie, J.H., Jaouhari, R., Douglas, K.T., Goffner, D., Feuillet, C., Grima-Pettenati, Boudet, A.M., Baltas, M. y Gorrichon, L.**

A molecular model for cinnamyl alcohol dehydrogenase, a plant aromatic alcohol dehydrogenase involved in lignification.  
(1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1202**: 61-69

**Mester, T., Swarts, H.J., Romero i Sole, S., de Bont, J.A. y Field, J.A.**

Stimulation of aryl metabolite production in basidiomycete *Bjerkandera* sp strain BOS55 with biosynthetic precursors and lignin degradation products.  
(1997) *Appl. Environ. Microbiol.*, **63** (5): 1987-1994

**Montesano, M., Hyytiainen, H., Wettstein, R. y Palva, E.T.**

A novel potato defence-related alcohol: NADP<sup>+</sup> oxidoreductase induced in responseto *Erwinia carotovora*.  
(2003) *Plant Mol. Biol.*, **52**: 177-189

**Muheim, A., Waldner, R., Sanglard, D., Reiser, J. y Schoemaker, H.E.**  
Purification and properties of an aryl-alcohol dehydrogenase from white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*.  
(1991) *Eur. J. Biochem.*, **195**: 369-375

## N

**Negelein, E. y Wulff, H.**  
Diphosphopyridinproteid ackohol, acetaldehyd.  
(1937) *Biochem Z*, **293**: 351-389

**Neubauer, O. y Fromherz, K.**  
Über den abbau der aminosäuren bei der Hefegärung.  
(1911) *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, **70**: 326-350

**Nguyen, D.T., Alarco, A.M. y Raymond, M.**  
Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator *FLR1* gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents.  
(2001) *J. Bio. Chem.*, **276** (2): 1138-1145

**Nordling, E., Jörnvall, H. y Persson, B.**  
Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active-site modeling.  
(2002) *Eur. J. Biochem.*, **269** (17): 4267-4276

## O

**Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Safqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, I., Persson, B. y Jörnvall, H.**  
Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update.  
(2003) *Chem. Biol. Interact.*, **143-144**: 247-253

## P

**Peralba, J.M., Cederlund, E., Crosas, B., Moreno, A., Julià, P., Martínez, S.E., Persson, B., Farrés, J., Parés, X. y Jörnvall, H.**  
Structural and enzymatic properties of a gastric NADP(H)-dependent and retinal-active alcohol dehydrogenase.  
(1999) *J. Biol. Chem.*, **274**: 26021-26026

**Perpète, P. y Collin, S.**  
Contribution of 3-methylthiopropionaldehyde to the worty flavor of alcohol-free beers.  
(1999) *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 2374-2378

**Perpète, P., Duthoit, O., De Maeyer, S., Imray, L., Lawton, A.I., Stavropoulos, K.E., Gitonga, V.W., Hewlins, M.J. y Dickinson, J.R.**  
Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.  
(2005) *FEMS Yeast Res.*, **6**: 48-56

**Persson, B., Zigler, J.S y Jörnvall, H.**  
A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Sub-lines including  $\zeta$ -crystallin and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductases, enoyl reductases, VAT-1 and other proteins.  
(1994) *Eur. J. Biochem.*, **226**: 15-22



**Persson, B., Kallberg, Y., Oppermann, U. y Jörnvall, H.**

Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs).  
(2003) *Chem. Biol. Interact.*, **143-144**: 271-278

**Priddy, S.A., Hanley, T.R. y Effler, W.T.**

Separation optimization for the recovery of phenyl ethyl alcohol.  
(1999) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **77-79**: 473-484

**R****Ramaswamy, S., Kratzer, D.A., Hershey, A.D., Rogers, P.H., Arnone, A., Eklund, H. y Plapp, B.V.**

Crystallization and preliminary crystallographic studies of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase I.  
(1994) *J. Mol. Biol.*, **235**: 777-779

**Richard, P., Toiveri, M.H. y Penttilä, M.**

Evidence that the gene *YLR070c* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase.  
(1999) *FEBS Lett.*, **457 (1)**: 135-138

**Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., Villalobos-Molina, R., Pardo, J.P. y Piña, E.**

Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily.  
(2003) *Eur. J. Biochem.*, **270**: 3309-3334

**Rosano, C., Zucotti, S., Sturla, L., Fruscione, F., Tonetti, M. y Bolognesi, M.**

Quaternary assembly and crystal structure of GDP-d-mannose 4,6 dehydratase from *Paramecium bursaria* *Chorella virus*.  
(2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **339(1)**: 191-195

**Rosell, A., Valencia, E., Pares, X., Fita, I. y Ochoa, W.F.**

Crystal structure of the vertebrate NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADH8).  
(2003) *J. Mol. Biol.*, **330**: 75-85

**Rossmann, M.G., Moras, D. y Olsen, K.W.**

Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein.  
(1974) *Nature*, **250**: 194-199

**Russell, D.W., Smith, M., Williamson, V.M. y Young, E.T.**

Nucleotide sequence of the yeast alcohol dehydrogenase II gene.  
(1983) *J. Biol. Chem.*, **258 (4)**: 2674-2682

**S****Saint-Prix, F., Bonquist, L. y Dequin, S.**

Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP<sup>+</sup>-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation.  
(2004) *Microbiol.*, **150 (7)**: 2209-2220

**Sarthy, A., Schopp, C y Idler, K.B.**

Cloning and sequence determination of the gene encoding sorbitol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*.

(1994) *Gene*, 140: 121-126

**Schoondermark-Stolk, S.A., Janse, M., Veurink, J.H., Verkleij, A.J., Verrips, C.T., Euverink, G.J., Boonstra, J. y Dijkhuizen, L.**

Rapid identification of target genes for 3-methyl-1-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*

(2005) *FEMS Yeast Res.*, Pendiente de publicación

**Sentheshanmuganathan, S.**

The mechanism of the formation of higher alcohols from amino acids by *Saccharomyces cerevisiae*.

(1960) *Biochem. J.*, 74: 568-576

**Shimizu, C., Ohno, M., Araki, S., Furusho, S., Watari, J. y Takashio, M.**

Effect of reduction of carbonyl compounds by yeast on flavour stability of happoshu.

(2002) *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 60 (3): 122-129

**Singh, K.K.**

The *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p-Ssk1p two-component system mediates response to oxidative stress and in an oxidant-specific fashion.

(2000) *Free Radical Biol. Med.*, 29 (10): 1043-1050

**Somssich, I.E., Wernert, P., Kiedrowski, S. y Hahlbrocki, K.**

*Arabidopsis thaliana* defense-related cinnamyl alcohol dehydrogenase.

(1996) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 93: 14199-14203

**Soref, M., Di, Y.P., Hayden, L., Zhao, Y.H., Satre, M.A. y Wu, R.**

Characterization of a novel airway epithelial cell-specific short chain alcohol dehydrogenase/reductase gene whose expression is up-regulated by retinoids and is involved in the metabolism of retinol.

(2001) *J. Biol. Chem.*, 276 (26): 24194-24202

**Sun, H.W. y Plapp, B.V.**

Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family.

(1992) *J. Mol. Evol.*, 34: 522-535

**T****Ten Have, R. y Franssen, M.C.**

On a revised mechanism of side product formation in the lignin peroxidase catalyzed oxidation of veratryl alcohol.

(2001) *FEBS Lett.*, 487: 313-317

**Ter Schure, E., Flikweert, M.T., Van Dijken, J.P., Pronk, J.T. y Verrips, C.T.**

Pyruvate decarboxylase catalyzes decarboxylation of branched-chain 2-oxo acids but is not essential for fusel alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*.

(1998) *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (4): 1303-1307

**Thomazeau, K., Dumas, R., Halgang, F., Forest, E., Douce, R. y Biou, V.**

Structure of spinach acetoxyacid isomeroreductase complexed with its reaction product dihydroxymethylvalerate, manganese and (phospho)-ADP-ribose.

(2000) *Acta Crystallog. Sect. D*, **56**: 389-397

**Thorpe, G.W., Fong, C.S., Alic, N., Higgins, V.J. y Dawes, I.W.**

Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes.

(2004) *Proc. Nat. Acad. Sci.* **101** (17): 6564-6569

## V

**Valencia, E., Rosell, A., Larroy, C., Farrés, J., Biosca, J.A., Fita, I., Parés, X. y Ochoa, W.F.**

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

(2002) *Acta Crystallog. Sect. D*, **59**: 334-337

**Valencia, E., Larroy, C., Ochoa, W.F., Parés, X., Fita, I. y Biosca, J.A.**

*Apo* and *holo* structures of an NADP(H)-dependent cinnamyl alcohol deshydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*.

(2004) *J. Mol. Biol.*, **341**(4): 1049-1062

**Vandemeulebroucke, A., Versées, W., De Vos, S., Van Holsbeke, E y Steyaert, J.**

Pre-steady-state analysis of the nucleoside hydrolase of *Trypanosoma vivax*. Evidence for half-of-the-sites reactivity and rate limiting product release.

(2003) *Biochemistry*, **42**: 12902-12908

**Van Iersel, M.F.M., Eppink, M.H.M., Van Berkel, W.J.H., Rombouts, F.M. y Abee, T.**

Purification and characterization of a novel NADP-dependent branched-chain alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*.

(1997) *Appl. Environ. Microbiol.*, **63** (10): 4079-4082

**Van Nederveelde, L., Verlinden, V., Philipp, D y Debourg, A.**

Purification and characterization of yeast 3-methyl butanal reductases involved in the removal of wort carbonyls during fermentation.

(1997) *26th EBC Congress*, pp. 447-454

**Vuralhan, Z., Morais, M.A., Tai, S.L., Piper, M.D. y Pronk, J.T.**

Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*.

(2003) *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (8): 4534-4541

**Vuralhan, Z., Luttkik, M.A.H., Tai, S.L., Boer, B.M., Morais, M.A., Schipper, D., Almering, M.J., Kotter, P., Dickinson, J.R., Daran, J.M. y Pronk, J.T.**

Physiological characterization of the ARO-10-dependent, broad substrate specificity 2-oxo-acid-decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*.

(2005) *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 3276-3284

## W

**Wales, M.R. y Fewson, C.A.**

NADP-dependent alcohol dehydrogenases in bacteria and yeast: purification and partial characterization of the enzymes from *Acinetobacter calcoaceticus* and *Saccharomyces cerevisiae*.

(1994) *Microbiol.*, **140**: 173-183

**Wehner, E.P., Rao, E. y Brendel, M.**

Molecular structure and genetic regulation of *SFA*, a gene responsible for resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*, and characterization of its protein product.

(1993) *Mol. Gen. Genet.*, **273** (3): 351-358

**Weiner, H., Wei, B. y Zhou, J**

Subunit communication in tetrameric class 2 human liver aldehyde dehydrogenase as the basis for half-of-the-sites reactivity and the dominance of the oriental subunit in a heterotetramer.

(2001) *Chem-Biol. Interact.*, **130-132**: 47-56

**Weinhold, E.G., Glasfeld, A., Ellington, A.D. y Benner, S.A.**

Structural determinants of stereospecificity in yeast alcohol dehydrogenase.

(1991) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **88**: 8420-8424

**Wenger, J.I. y Bernofsky, C.**

Mitochondrial alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*.

(1971) *Biochem. Biophys. Acta*, **227**: 479-490

**Wilkin, J.M., Soetaert, K., Stelandre, M., Buysens, P. Castillo, G., Demoulin, V., Bottu, G., Laneelle, M.A., Daffe, M. y De Bruyn, J.**

Overexpression, purification and characterization of *Mycobacterium bovis* BCG alcohol dehydrogenase.

(1999) *Eur. J. Biochem.*, **262**: 299-307

**Wills, C. y Jörnvall, H.**

The two major isozymes of yeast alcohol dehydrogenase.

(1979) *Eur. J. Biochem.*, **99**: 323-331

**Williamson, V.M. y Paquin, C.E.**

Homology of *Saccharomyces cerevisiae ADH4* to an iron-activated alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*.

(1987) *Mol. Gen. Genet.*, **209**: 374-381

**Winston, F., Dollard, C. y Ricupero-Hovasse, S.L.**

Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C.

(1995) *Yeast*, **11**: 53-55

**Wyrambik, D., Grisebach, H.**

Purification and properties of isoenzymes of cinnamyl alcohol dehydrogenase from soybean-cell suspension cultures.

(1975) *Eur. J. Biochem.*, **59** (1): 9-15

## Y

**Yoshimoto, H., Fukushige, T., Yonezawana, T., Sakai, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., sone, H. y Tamai, Y.**

Pyruvate decarboxylase encoded by the *PDC1* gene contributes, at least partially, to the decarboxylation of a  $\alpha$ -ketoisocaproate for isoamyl alcohol formation in *Saccharomyces cerevisiae*.

(2001) *J. Biosci. Bioeng.*, **92** (1): 83-85

**Yoshimoto, H., Fukushige, T., Yonezawa, T. y Sone, H.**

Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohol and isoamylacetate production in *Saccharomyces cerevisiae*.

(2002) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59** (4-5): 501-508

## Z

**Zadzinski, R., Fortuniak, A., Bilinski, T., Grey, M. y Bartosz, G.**

Menadione toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation by conjugation with glutation.

(1998) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **44** (4): 747-759

**Zaldivar, J., Martinez, A. y Ingram, L.O.**

Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*.

(1999) *Biotech. Bioeng.*, **65** (1): 24-33

**Zemek, J., Valent, M., Podova, M., Kosikova, B. y Joniak, D.**

Antimicrobial properties of aromatic compounds of plat origin.

(1987) *Folia Microbiol.*, **32**: 421-425

**Zhou, J. y Weiner, H.**

Basis of half-of-the-sites reactivity and the dominance of the K487 oriental subunit over the E487 subunit in the heterotetrameric human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase.

(2000) *Biochemistry*, **39**: 12019-12024

## **ANEXO I**

## Cepas empleadas en el trabajo presentado

	Cepa	Genotipo	Referencia bibliográfica
Bacteria:			
	XL1-blue	RecA1, endA1, gyrA96, thi hsdR17( $r_K^-$ , $m_K^+$ ), supE44, pelA1, lac[F', proAB+, lacI <sup>qZ</sup> , DM15::tn10( $tet^r$ )]	Stratagene
Levadura:			
	BJ2168	MATa, <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb1-1122</i> , <i>prc1-407</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i>	Jones, E.W., 1991
	BJ18	MATa, <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb1-1122</i> , <i>prc1-407</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>adh6::TRP1</i>	Larroy et al., 2002a
	BJ05	MATa, <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb1-1122</i> , <i>prc1-407</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>adh7::URA3</i>	Larroy et al., 2002b
	BJ1805	MATa, <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb1-1122</i> , <i>prc1-407</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>adh6::TRP1</i> , <i>adh7::URA3</i>	Larroy et al., 2002b
	FY834 $\alpha$	MAT $\alpha$ , <i>his3<math>\Delta</math>200</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2<math>\Delta</math>1</i> , <i>lys2<math>\Delta</math>202</i> , <i>trp1<math>\Delta</math>63</i>	Winston et al., 1995
	FY18	MAT $\alpha$ , <i>his3<math>\Delta</math>200</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2<math>\Delta</math>1</i> , <i>lys2<math>\Delta</math>202</i> , <i>trp1<math>\Delta</math>63</i> , <i>adh6::TRP1</i>	Larroy et al., 2002a
	FYA1	MAT $\alpha$ , <i>his3<math>\Delta</math>200</i> , <i>ura3-52</i> , <i>leu2<math>\Delta</math>1</i> , <i>lys2<math>\Delta</math>202</i> , <i>trp1<math>\Delta</math>63</i> , <i>adh1::URA3</i>	Cedida por la Dra. Eva Gonzalez
	BJ5459	MATa/ $\alpha$ , <i>ura3-52</i> , <i>trp1</i> , <i>lys2-801</i> , <i>leu2<math>\Delta</math>1</i> , <i>his3<math>\Delta</math>200</i> , <i>pep4::HIS3</i> , <i>prb1<math>\Delta</math>1.6R</i> , <i>can1</i> , <i>GAL</i>	Jones, E.W., 1991
	BL9	MATa, <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb1-1122</i> , <i>prc1-407</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>lys9::URA3</i>	Valencia et al., 2004

## Vectores empleados en el trabajo presentado

	Huesped	Características	Referencia bibliográfica
pCRscript	Bacteria	Amp <sup>R</sup>	Stratagene
pYdT	Bacteria	Amp <sup>R</sup> , <i>TRP1</i>	Berben et al., 1991
pYdU	Bacteria	Amp <sup>R</sup> , <i>URA3</i>	Berben et al., 1991
pYes2	Bacteria/Levadura	Amp <sup>R</sup> , promotor <i>GALI</i> , <i>URA3</i>	Invitrogene
pAAH5	Bacteria/Levadura	Amp <sup>R</sup> , promotor <i>ADHI</i> , <i>LEU2</i>	Ammerer, G., 1983

**Construcciones empleadas en el trabajo presentado**

<b>Nomenclatura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
pY318	pYes2 + <i>ADH6</i> en BamHI/XhoI	Larroy et al., 2002a
pY105	pYes2 + <i>ADH7</i> en SacI/XbaI	Larroy et al., 2002b
pAAH5- <i>YMR318</i>	pAAH5 + <i>ADH6</i> en HindIII	Larroy et al., 2002a
pCR318	pCRscript + <i>ADH6</i> en HindIII	Larroy et al., 2002a
pCR318- <i>TRP1</i>	pCR318 + <i>TRP1</i> en NdeI/NcoI	Larroy et al., 2002a
pY105- <i>URA3</i>	pY105 + <i>URA3</i> en BamHI	Larroy et al., 2002b
pCLYS9	pCRscript + <i>LYS9</i> en SacI/HindIII	Valencia et al., 2004
pCLYS9- <i>URA3</i>	pCLYS9 + <i>URA3</i> en BamHI	Valencia et al., 2004



