



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Anàlisi estructural, funcional i de regulació de la lactaldehyd deshidrogenasa d'*Escherichia coli*

Laura Baldomà Llavínés



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

FACULTAT DE FARMÀCIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA



"ANÀLISI ESTRUCTURAL, FUNCIONAL I DE REGULACIÓ
DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA D'ESCHERICHIA
COLI "

Tesi presentada per LAURA BALDOMÀ i LLAVINÉS,
llicenciada en Farmàcia, per a optar al grau
de Doctor en Farmàcia.

Ha estat realitzada en el Departament de Bioquí-
mica de la Facultat de Farmàcia de la Universi-
tat de Barcelona, sota la direcció del Dr. Joan
Aguilar i Piera.

Laura Baldomà i Llavínés

Dr. Joan Aguilar i Piera

Barcelona, octubre de 1986

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700082930



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA - FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA - Pedralbes, Barcelona-28

JOAN AGUILAR i PIERA, Catedràtic de Bioquímica de la
Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona

CERTIFICA : que la Tesi Doctoral titulada "Anàlisi
estructural, funcional i de regulació de la lactal-
dehid deshidrogenasa d'Escherichia coli" ha estat
realitzada íntegrament en el Departament de Bioquí-
mica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de
Barcelona, sota la meua direcció

Barcelona, 24 d'octubre de 1986

Dr. Joan Aguilar i Piera
Director de la Tesi Doctoral

En acabar aquest treball, m'agradaria expressar el més sincer agraïment a totes aquelles persones, que d'una o altra manera l'han fet possible.

Al Dr. Joan Aguilar Piera, Director d'aquest treball, per la seva atenció i ajut constants al llarg del mateix.

Al Dr. Fausto Garcia Hegardt, Catedràtic i Director del Departament de Bioquímica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, per haver-me permès realitzar aquest treball en el seu Departament.

Al Dr. Albert Boronat, quina opinió en determinats aspectes del present treball ha estat molt profitosa.

A Estrella Caballero i al Dr. Joaquim Ros per ésser els primers en guiar-me en els inicis del meu treball experimental en Bioquímica.

Als meus bons companys de laboratori Josefa Badia, Nuria Obradors i Rosa Gimenez per la seva col.laboració totalment desinteressada en la discussió i realització de certs aspectes d'aquest treball, així com per les agradables hores compartides.

Als restants membres del Departament de Bioquímica, amb els qui he conviscut aquests anys i que d'una o altra manera m'han ajudat en la tasca experimental.

A Joan Pera per la seva plena col.laboració en la realització de la part gràfica d'aquest treball, així com pel seu ànim i esperit encoratgador en els moments difícils.

A la meva gremana Montserrat per l'ajut en la correcció del text en català.

I als de casa pel seu interès mostrat en tot moment.

JUSTIFICACIÓ I RESUM DEL TREBALL.

En el present treball es descriuen estudis de tipus estructural i funcional de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa d' E.coli, que han portat a considerar el possible paper multifuncional de l'esmentat enzim dins el metabolisme d'aquest microorganisme, donada la seva participació en la utilització de sucres, glicols i aminoàcids.

Durant els últims anys, en el nostre laboratori, s'ha obert una línia de treball relacionada amb els metabolismes de la L-fucosa i la L-ramnosa en E.coli, sobretot a nivell de l'enzim comú, la propandiol òxido-reductasa, el qual permet el creixement anaeròbic en tots dos sucres.

El catabolisme d'aquests sucres suposa la inducció de conjunts d'enzims, altament específics per a cada sucre; els gens que els codifiquen estan disposats en sengles operons, situats en els minuts 59,5 (sistema de la fucosa) i en el 86 (sistema de la ramnosa), en el cromosoma d' E.coli. La seqüència de reaccions del catabolisme de tots dos sucres convergeix en la formació d'un metabòlit comú : el L-lactaldehyd, quina transformació posterior està en funció de les condicions d'oxigenació del cultiu. Així, anaeròbicament, el L-lactaldehyd és reduït a L-1,2-propandiol mitjançant la propandiol òxido-reductasa, mentre que en anaeròbiosi, és oxidat a lactat per la lactaldehyd deshidrogenasa.

Així doncs, el L-lactaldehyd és un punt de bifurcació del metabolisme en funció de la disponibilitat d'oxigen. Es va

creure d'interès analitzar els mecanismes que regularien l'esmentada bifurcació i que, lògicament, estarien relacionats amb els enzims que utilitzen aquest mateix substrat. Donat que, la propandiòl òxido-reductasa ha estat àmpliament estudiada en el nostre laboratori, tant a nivell estructural com funcional i regulatori, ens varem plantejar d'abordar l'anàlisi de l'altre enzim responsable de la transformació del L-lactaldehid, és a dir, la lactaldehid deshidrogenasa.

La lactaldehid deshidrogenasa va ésser descrita, en un principi, per Sridhara i Wu, com a un enzim implicat en el metabolisme del 1,2-propandiòl en mutants d' E.coli capaços de créixer en presència d'aquest glicol. En aquestes soques, el propandiòl és transformat en L-lactaldehid per la mateixa propandiòl òxido-reductasa ja esmentada. El L-lactaldehid és oxidat a lactat per la lactaldehid deshidrogenasa. Aquesta via d'utilització de propandiòl és la inversió de la via comuna fermentativa de la fucosa i ramnosa de la soca tipus salvatge.

La lactaldehid deshidrogenasa va ésser purificada i caracteritzada per Sridhara i Wu només parcialment. Dels resultats obtinguts, els autors presentaven a l'enzim com a específic pel L-lactaldehid i per tant exclusiu del metabolisme de la L-fucosa i del propandiòl. No s'han descrit estudis posteriors sobre l'estructura, ni sobre els aspectes regulatoris de la lactaldehid deshidrogenasa.

A l'iniciar aquest treball ens varem plantejar la necessitat de disposar de preparacions de lactaldehid deshidroge-

nasa homogènies a fi de du a terme els estudis estructurals pertinents, a l'hora que serien útils com a antígen en la inoculació a conills per a l'obtenció d'anticossos anti-lactaldehid deshidrogenasa. Les preparacions d'anticossos permetrien detectar immunològicament la proteïna enzimàtica produïda en diferents condicions de creixement i per diversos mutants. Per tant, una gran part d'aquest treball ha anat encaminada a l'obtenció de preparacions d'enzim lactaldehid deshidrogenasa altament pures, i a la seva caracterització posterior tant a nivell molecular com cinètic.

L'estudi de l'especificitat de substrat indicà que l'enzim era capaç d'oxidar altres aldehids, a més del L-lactaldehid, amb la característica comuna d'ésser α -hidroxialdehids, i amb menys afinitat els α -cetoaldehids. Aquest resultat no era congruent amb l'especificitat atribuïda a la lactaldehid deshidrogenasa.

L'estudi dels nivells d'activitat enzimàtica en els extractes cel·lulars d'E.coli en diferents condicions de creixement i disponibilitat d'oxigen, evidencià que la lactaldehid deshidrogenasa no era només induïda pel creixement en fucosa i ramnosa (tots dos sucres comparteixen l'oxidació del lactaldehid), si no també pel creixement en presència d'aminoàcids. Estudis posteriors amb cadascun dels 20 aminoàcids identificaren el glutamat com a responsable de l'esmentada inducció. Aquest resultat indicava la participació de la lactaldehid deshidrogenasa en metabolismes no relacionats amb la fucosa i la ramnosa i el seu intermediari, el lactaldehid.

Una altra part important del present treball, ha estat dirigida a esbrinar l'origen de l'enzim responsable de l'oxidació del glicolaldehid a glicolat en mutants d' E.coli capaços d'utilitzar aquest glicol com a única font de carboni i energia (la soca JA-102). L'enzim responsable s'ha identificat com la lactaldehid deshidrogenasa, quina producció està augmentada aproximadament unes tres vegades en aquest mutant. Aquest resultat demostrava que la via catabòlica de l'etilenglicol utilitza els mateixos enzims de la via degradativa del propandiol. En aquest cas, la lactaldehid deshidrogenasa actuava sobre un aldehid diferent al lactaldehid.

Els estudis de regulació a nivell transcripcional s'han fet mesurant els nivells d'activitat, conjuntament amb la síntesi de l'enzim lactaldehid deshidrogenasa en els extractes cel·lulars d'E.coli en diferents condicions de creixement, els quals han demostrat que la regulació a aquest nivell depèn de la presència d'inductor i d'oxigen.

A nivell post-transcripcional, s'ha estudiat l'efecte del canvi de les condicions del cultiu anaeròbici, sobre l'enzim lactaldehid deshidrogenasa i la seva activitat "in vivo", així com l'efecte provocat pels substrats i productes de la reacció catalitzada per l'enzim "in vitro", usant preparacions enzimàtiques purificades. Aquests estudis indiquen que el NADH podria tenir algun paper en la modulació de l'activitat enzimàtica, i descarten una possible regulació per recanvi de l'enzim.

L'anàlisi de mutants deficients de lactaldehid deshidrogenasa, sobretot de la soca termosensible JA-104, han permès especular sobre la possible localització del gen regulador de

la lactaldehyd deshidrogenasa. En aquest sentit, cal remarcar la gran utilitat del mètode de selecció positiu desenvolupat per a la selecció dels mutants termosensibles per a la utilització del propandiol.

Per una altra part, s'ha fet un recull comparatiu entre els enzims amb activitat aldehid deshidrogenasa caracteritzats en E.coli i la lactaldehyd deshidrogenasa estudiada en aquest treball, que ha permès establir la identitat pròpia d'aquest darrer enzim, no identificant-se amb cap dels descrits anteriorment en aquest bacteri.

Un altre aspecte abordat en aquesta obra, ha estat l'anàlisi de la producció d'un enzim similar a la lactaldehyd deshidrogenasa, per altres Enterobacteriaceae : Salmonella typhimurium i Klebsiella pneumoniae. L'anàlisi s'ha portat a terme per dues metodologies : a) mesura de l'activitat enzimàtica en els extractes cel·lulars d'aquestes soques fetes créixer aeròbicament en ramnosa, i b) detecció immunològica de l'enzim mitjançant les preparacions d'anticossos anti-lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli. Els resultats obtinguts, els quals mostren una manca de síntesi enzimàtica en S.typhimurium, conjuntament amb dades referents als creixements en ramnosa (temps de duplicació i rendiment de la biomassa del cultiu), així com a la producció de l'enzim propandiol òxido-reductasa, es discuteixen en relació a les implicacions que això comporta en el metabolisme de la ramnosa.

ABREVIATURES MES USUALS EN AQUEST TREBALL.

ADP	Adenosina-5'-difosfat
ATP	Adenosina-5'-trifosfat
CoA	Coenzim A
DEAE	Dietilaminoetil
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiaminotetracetat
Etg ⁺	Fenotip d'utilització d'etilenglicol
FAD	Flavin adenina dinucleòtid
FMN	Flavin mononucleòtid
Fuc ⁺	Fenotip d'utilització de fucosa
x g	Gravetats
Glc ⁺	Fenotip d'utilització de glicolat
GSH	Glutation
Kcal	Quilocalories
Km	Constant de Michaelis aparent
LALDH	Lacatldehid deshidrogenasa
M, mM, μM	Molar, mil.limolar i micromolar
mA	Mil.liamper
NAD ⁺	Nicotinamido adenina dinucleòtid
NADH	Nicotinamido adenina dinucleòtid reduït
NADP ⁺	Nicotinamido adenina dinucleòtid fosfat
NADPH ₂	Nicotinamido adenina dinucleòtid fosfat reduït
NBT	Blau de nitrotetrazoli
nm	Nanometre
pfu	Unitats formadores de plaques de lisi
pHMB	p-hidroximercuribenzoat
PMS	Fenazina metasulfat
PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil
Prd ⁺	Fenotip d'utilització de propandiol
Rha ⁺	Fenotip d'utilització de ramnosa
r.p.m.	Revolucions per minut
SDS	Dodecilsulfat sòdic
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletetilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometà
U, mU	Unitats i mil.liunitats d'activitat enzimàtica
Vmax	Velocitat màxima.

INDEX

	pàgina
1. INTRODUCCIÓ	
1.1. Aldehid deshidrogenases. Consideracions generals	1
1.2. Aldehid deshidrogenases en el metabolisme bacterià	16
1.2.1. Aldehid deshidrogenases d'àmplia especificitat	16
1.2.2. Aldehid deshidrogenases específiques	16
1.2.3. Aldehid deshidrogenases d' <u>E.coli</u> .	29
1.2.3.1. Lactaldehid deshidrogenasa	29
1.2.3.2. Glicolaldehid deshidroge- nasa	31
1.2.3.3. Gliceraldehid fosfat des- hidrogenasa	34
1.2.3.4. Aldehid deshidrogenasa lli- gada a CoA	36
1.3. Metabolismes relacionats amb la lactal- dehid deshidrogenasa d' <u>E.coli</u>	38
1.3.1. Metabolisme de L-fucosa i L-ram- nosa en <u>E.coli</u>	38
1.3.2. Metabolisme de L-1,2-propandiol en mutants d' <u>E.coli</u>	42
1.3.3. Metabolime de l'etilenglicol en mutants d' <u>E.coli</u>	46
1.3.3.1. Origen de l'activitat gli- colaldehid deshidrogenasa	50
1.3.4. Metabolisme del metilglioaxal	52
1.3.5. Metabolisme del glutamat	65
1.4. Metabolisme de fucosa i ramnosa en En- terobacteriaceae : <u>Klebsiella</u> sp i <u>Salmonella</u> sp	70

2. MATERIALS I MÈTODES.	
2.1. Soques bacterianes i fags	73
2.2. Tècniques microbiològiques	78
2.2.1. Condicions de creixement dels bacteris	78
2.2.2. Transducció generalitzada amb el bacteriòfag P1	80
2.2.2.1. Preparació del lisat del bacteriòfag P1	80
2.2.2.2. Titulació del lisat obtingut	81
2.2.2.3. Transducció amb el bacteriòfag P1	81
2.2.3. Obtenció de mutants per inserció de Tn5	82
2.3. Preparació d'extractes cel·lulars	83
2.4. Tècniques determinatives	84
2.4.1. Determinació de proteïna	84
2.4.2. Determinació d'activitats enzimàtiques	84
2.4.2.1. Determinació de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa ...	85
2.4.2.1. Determinació de l'activitat aldehyd deshidrogenasa lligada a CoA	86
2.4.2.3. Determinació de l'activitat propandiol òxido-reductasa ...	86
2.4.3. Determinació de 1,2-propandiol	86
2.5. Purificació de la lactaldehyd deshidrogenasa d' <u>E. coli</u>	88
2.5.1. Precipitació fraccionada amb sulfat amònic	88
2.5.2. Cromatografia de bescanvi iònic en DEAE-sephadex	89
2.5.3. Cromatografia d'afinitat en agarosa-NAD	89
2.5.4. Cromatografia de gel-filtració en Ultrogel ACA-34	90
2.5.5. Cromatografia en hidroxapatita	91

2.6. Tècniques immunològiques	92
2.6.1. Obtenció d'anticossos anti-lactaldehid deshidrogenasa d' <u>E. coli</u>	92
2.6.2. Preparació de la fracció γ -globulina a partir de l'antisèrum específic ..	93
2.6.3. Mètode de doble difusió	93
2.6.4. Immunoprecipitació de la lactaldehyd deshidrogenasa en medi líquid	94
2.7. Acoblament de clorur de dansil a proteïnes	95
2.8. Tècniques electroforètiques	96
2.8.1. Electroforesi en gels de poliacrilamida en plaques	96
2.8.1.1. Preparació dels gels	96
2.8.1.2. Preparació de les mostres ..	98
2.8.1.3. Desenvolupament de la cursa.	99
2.8.1.4. Revelat del gel	100
2.8.2. Electroforesi en gels de poliacrilamida en tubs	103
2.8.3. Electroforesi en gradients lineals de poliacrilamida	103
2.8.4. Isoelectroenfoc en gels de poliacrilamida	105
2.8.4.1. Preparació dels gels	105
2.8.4.2. Preparació de les mostres ..	106
2.8.4.3. Desenvolupament del isoelectroenfoc	106
2.8.4.4. Revelat del gel	107
2.8.4.5. Mesura del gradient de pH ..	107
2.8.5. Electroimmunodifusió segons Laurell.	108
2.8.6. Purificació electroforètica de proteïnes	109
2.9. Mapes peptídics monodimensionals per digestió proteolítica limitada	111
2.10. Determinació de la composició d'aminoàcids	112
2.10.1. Preparació de les mostres	112

2.10.1.1.Hidròlisi àcida amb HCl 6 N	112
2.10.1.2.Hidròlisi amb triptamina i p-toluensulfònic	113
2.10.2.Separació i quantificació dels ami- noàcids	113
2.11.Preparació del L-lactaldehid	117
2.11.1.Síntesi del L-lactaldehid	117
2.11.2.Purificació del L-lactaldehid	118
2.11.3.Valoració del L-lactaldehid	119
2.11.3.1.Valoració del L-lactaldehid per iodometria	119
2.11.3.2.Valoració del lactaldehid per reacció amb la semi- carbazida	120
2.11.4.Desdimerització del L-lactaldehid ..	121
2.12.Tècniques fotogràfiques	122
2.12.1.Condicions per a proteïnes revela- des amb Blau Brillant de Coomassie .	122
2.12.2.Condicions per a proteïnes i pèptids tractats amb clorur de dansil	122
2.13.Productes i reactius utilitzats	123
 3. RESULTATS.	
3.1.Activitat lactaldehid deshidrogenasa en ex- tractes cel.lulars d' <u>E.coli</u>	128
3.2.Purificació a homogeneïtat de la lactalde- hid deshidrogenasa	134
3.2.1.Criteris d'homogeneïtat	139
3.2.2.Estabilitat	141
3.3.Characterització de l'enzim lactaldehid des- hidrogenasa	143
3.3.1.Characterització molecular	143
3.3.1.1.Determinació del pes molecular de l'enzim natiu	143
3.3.1.2.Determinació del pes molecular de les subunitats	143

3.3.1.3. Determinació del punt isoelèctric ..	145
3.3.1.4. Composició d'aminoàcids	145
3.3.1.5. Espectre d'absorció i contingut de coenzim (NAD ⁺)	149
3.3.2. Caracterització cinètica	154
3.3.2.1. pH òptim	155
3.3.2.2. Energia d'activació	157
3.3.2.3. Inactivació tèrmica	158
3.3.2.4. Efecte dels cations divalents	158
3.3.2.5. Inhibició per p-hidroximercuribenzoat	161
3.3.2.6. Reversibilitat de la reacció	166
3.3.2.7. Especificitat de substrat	167
3.3.2.8. Especificitat de cofactor	171
3.4. Obtenció i utilització d'anticossos anti-lactalde- hid deshidrogenasa d' <u>E.coli</u>	174
3.4.1. Obtenció de les preparacions d'anticossos anti-lactaldehid deshidrogenasa	174
3.4.2. Immunodifusió radial	174
3.4.3. Immunolectroforesi segons Laurell	177
3.4.4. Immunoprecipitació de la lactaldehid deshi- drogenasa en medi líquid	180
3.5. Regulació de la lactaldehid deshidrogenasa	182
3.5.1. Regulació transcripcional	182
3.5.1.1. Estudi de la inducció de l'activitat lactaldehid deshidrogenasa	182
3.5.1.2. Requeriments de la inducció	183
3.5.1.3. Repressió catabòlica per glucosa i efecte del glicerol sobre la inducció.	189
3.5.1.4. Intents de caracterització de l'induc- tor	192
3.5.1.4.1. Possible paper del L-lactaldehid com a inductor de la lactaldehid deshidrogenasa	194
3.5.1.4.2. Efecte de l'anaeròbiosi en la induc- ció de l'activitat lactaldehid des- hidrogenasa	197

3.5.1.5. Anàlisi de mutants en el control de l'expressió de la lactaldehyd deshidrogenasa	199
3.5.1.5.1. Descripció de la soca 40	199
3.5.1.5.2. Mutant termosensible de lactaldehyd deshidrogenasa: la soca JA-104	204
3.5.1.5.3. Mutant de síntesi incrementada de lactaldehyd deshidrogenasa: la soca JA-102	212
3.5.2. Regulació post-transcripcional	212
3.5.2.1. Regulació "in vivo"	215
3.5.2.2. Regulació per efectors en l'enzim purificat	218
3.6. Activitat glicolaldehyd deshidrogenasa en mutants d' <u>E.coli</u> etilenglicol positius : soca JA-102	222
3.6.1. Activitat glicolaldehyd deshidrogenasa en extractes cel.lulars de la soca JA-102	222
3.6.2. Evidències que l'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa és funció de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa	223
3.6.2.1. Inducció paral.lela d'ambdues activitats	225
3.6.2.2. Absència d'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa en mutants deficients de lactaldehyd deshidrogenasa	226
3.6.2.3. Mobilitat electroforètica de tots dos enzims	228
3.6.2.4. Co-elució de la lactaldehyd deshidrogenasa de la soca 1 i la glicolaldehyd deshidrogenasa de la soca JA-102 en una cromatografia en DEAE-sephadex .	231
3.6.2.5. Copurificació d'ambdues activitats .	233
3.6.2.6. Identitat en les característiques moleculars de l'enzim de la soca JA-102 i els de les soques 1 i 3	235

3.6.2.7.	Mapes peptídics dels enzims purificats a partir de les soques 3 i JA-102 ...	237
3.6.2.8.	Identitat immunològica	237
3.6.2.9.	Característiques cinètiques de l'enzim de la soca JA-102. Comparació amb les de la soca tipus salvatge i soca 3.	241
3.7.	Evidències genètiques de la identitat de l'activitat aldehid deshidrogenasa induïda pel glutamat i la lactaldehid deshidrogenasa	244
3.8.	Altres activitats aldehid deshidrogenasa en <u>E.coli</u> : comparació amb la lactaldehid deshidrogenasa	247
3.8.1.	Aldehid deshidrogenasa lligada a coenzim A ..	247
3.8.2.	Gliceraldehid-fòsfat-deshidrogenasa	248
3.8.3.	Glicolaldehid deshidrogenasa d' <u>E.coli</u> B involucrada en la biosíntesi de la vitamina B ₆	249
3.9.	Activitat lactaldehid deshidrogenasa en altres Enterobacteriaceae : <u>Klebsiella pneumoniae</u> i <u>Salmonella typhimurium</u>	251
3.9.1.	Estudi en <u>Klebsiella pneumoniae</u> ATCC nº13882	251
3.9.1.1.	Activitat lactaldehid deshidrogenasa en el creixement aeròbic en ramnosa .	251
3.9.1.2.	Estudi de la identitat immunològica de l'enzim de <u>K.pneumoniae</u> amb l'enzim d' <u>E.coli</u>	252
3.9.2.	Estudi en <u>Salmonella typhimurium</u> ATCC nº e23564	256
3.9.2.1.	Absència d'enzim amb activitat lactaldehid deshidrogenasa a <u>S.typhimurium</u>	256
4. DISCUSSIÓ.		
4.1.	Anàlisi estructural i funcional de la lactaldehid deshidrogenasa	258
4.2.	La lactaldehid deshidrogenasa d' <u>E.coli</u> : possible enzim multifuncional	276
4.3.	Participació de l'enzim lactaldehid deshidrogenasa en el metabolisme de l'etilenglicol en mutants d' <u>E.coli</u>	284

4.4.L'activitat lactaldehyd deshidrogenasa no és funció d'altres enzims del tipus aldehyd deshidro- genasa a <u>E.coli</u>	293
4.5.Regulació de la lactaldehyd deshidrogenasa	300
4.6.Implicacions de la presència d'un enzim amb activitat lactaldehyd deshidrogenasa en dife- rents Enterobacteriaceae en relació amb el metabolime de ramnosa	322
5. CONCLUSIONS	328
6. BIBLIOGRAFIA	333

INDEX DE TAULES

	Pàgina		Pàgina
1	76	11	211
2	104	12	214
3	129	13	224
4	133	14	227
5	138	15	229
6	150	16	234
7	162	17	236
8	173	18	243
9	187	19	246
10	191	20	299

INDEX DE FIGURES

1	20	22	165
2	28	23	168
3	41	24	169
4	45	25	176
5	48	26	179
6	53	27	181
7	56	28	184
8	69	29	186
9	136	30	196
10	140	31	200
11	144	32	203
12	146	33	208
13	147	34	209
14	148	35	213
15	151	36	216
16	153	37	219
17	156	38	221
18	159	39	230
19	160	40	232
20	163	41	238
21	164	42	240

1. INTRODUCCIÓ

1.1. ALDEHID DESHIDROGENASES. CONSIDERACIONS GENERALS.

Durant els últims 40 anys, s'ha descrit l'existència d'una gran varietat d'enzims del tipus aldehyd deshidrogenasa, àmpliament distribuïts en la natura, que difereixen en la seva especificitat de substrat i de cofactor. Els estudis portats a terme amb aquests enzims han suposat sempre una purificació prèvia, si bé, els primers treballs realitzats no usaven preparacions del tot homogènies.

No està molt clar el possible paper fisiològic d'aquests enzims, llevat en determinades circumstàncies, però la seva àmplia distribució suggereix que poden ésser útils a la cèl.lula en l'eliminació dels aldehyds, compostos descrits com a tòxics (83).

La gran quantitat d'aldehyds ingerits per l'home i els animals, així com la seva formació "in vivo" a partir d'amines, algunes fisiològicament actives (serotorina), i d'altres compostos metabolitzables, tant en éssers superiors, com en microorganismes, donen suport a l'existència d'aquest grup d'enzims altament versàtil (172).

A més de les aldehyd deshidrogenases, hi ha d'altres sistemes enzimàtics que transformen aldehyds, descrits, sobretot, en fetge de mamífers, entre els que hi podem comptar l'aldehyd oxidasa, la xantina oxidasa i els enzims molibdo-flavoproteïnes. Així mateix, l'alcohol deshidrogenasa pot reduir determinats aldehyds, transformant-los en els alchols corresponents.

La reacció catalitzada per les aldehyd deshidrogenases és la següent :



El coenzim és un piridin nucleòtid (NAD^+ o NADP^+).

Quan A és un grup hidroxil (OH^-), és a dir, quan la reacció té lloc en medi aquós, l'enzim que la catalitza pertany a la classe I, segons la classificació establerta per Jakoby (83). Hi ha aldehyd deshidrogenases que requereixen la presència de fosfat, arsenat o mercaptans per a dur a terme la reacció enzimàtica; aquests enzims s'incluirien a la classe II segons Jakoby. Un exemple representatiu d'aquest grup seria l'aldehyd deshidrogenasa de Pseudomonas fluorescens reportada per Jakoby (81,82). Ambdós tipus d'enzims comporten la formació de l'àcid corresponent a l'aldehyd que han usat com a substrat.

Hi ha un altre tipus d'aldehyd deshidrogenases que, endemés del piridin nucleòtid, depenen de Coenzim A. Són les anomenades aldehyd deshidrogenases acetiladores. Un exemple és l'aldehyd deshidrogenasa lligada a CoA d'E.coli B (137).

Un exemple únic d'aldehyd deshidrogenasa, que a l'hora presenta activitat descarboxilasa és la semialdehyd malònic deshidrogenasa de Pseudomonas sp, que catalitza la formació d'acetil-CoA a partir de semialdehyd malònic (182) i que Jakoby va incloure com a únic element de la classe III.

Aquesta classificació en tres apartats, establerta per Jakoby, fa aproximadament 25 anys, tenia només caràcter provisional, si bé no va ésser acceptada per la "Comissió d'enzims de la Unió Internacional de Bioquímica" l'any 1961, per tant,

d'ara en endavant ens referirem a aldehid deshidrogenases amb un sentit general.

Les aldehid deshidrogenases presenten una serie de característiques comunes, com a resultat de la seva similitud a nivell de grups involucrats en la catàlisi i mecanisme d'acció.

Així, totes les aldehid deshidrogenases descrites són inhibides per una gran varietat de reactius de grups sulfhidril. El grau d'inhibició depèn, en cada cas, del reactiu assajat, així com de la proteïna enzimàtica. El p-mercuribenzoat és un inhibidor de totes les aldehid deshidrogenases estudiades.

Per una altra banda, els mercaptans, com el 2-mercaptoetanol, tenen un efecte o bé protector o bé activador sobre les aldehid deshidrogenases.

Aquests resultats indiquen que aquests enzims contenen en la seva estructura grups -SH lliures, que a l'ésser bloquejats per oxidació o alquilació condueixen a la pèrdua de l'activitat enzimàtica. Fins i tot es postula la participació directa d'aquests grups en el mecanisme catalític, com s'explicarà més endavant.

S'ha descrit, que els substrats de la reacció enzimàtica tenen un efecte protector envers la inactivació provocada pels reactius de grups sulfhidril. Així l'aldehid deshidrogenasa de fetge de bou, i les de llevat (11,145) són protegides de la inhibició provocada pel p-mercuribenzoat i N-etilmaleimida pel propi piridin nucleòtid (155). Així, l'enzim de fetge de bou,

que és específic pel NAD^+ , només és protegit per aquest coenzim. El NADP^+ no té cap efecte. De la mateixa manera, l'aldehid deshidrogenasa de llevat dependent de NADP^+ , descrita per Seegmiller (145), només és protegida per aquest cofactor i no pel NAD^+ . En canvi, l'enzim descrit per Black (11), donat que pot usar com a cofactor tant el NAD^+ com el NADP^+ , és protegit per tots dos coenzims. El grau de protecció assolit depèn tant de l'enzim com de l'inhibidor utilitzat.

Els aldehids també tenen un efecte protector envers la inactivació provocada pels compostos que reaccionen amb els grups sulfhidril. Així, la incubació prèvia amb acetaldehid de l'enzim de fetge de bou, redueix la inhibició provocada per l'iodoacetat i per la N-etilmaleimida, però no la del p-mercuribenzoat (155).

En aquest sentit, hi ha un estudi molt recent, realitzat amb aldehid deshidrogenasa citoplasmàtica de fetge d'ovella (88). Kitson descriu l'existència de dos dominis d'unió, anomenats P1 i P2. El P1 és el centre actiu normal de l'activitat deshidrogenasa i és ocupat per l'aldehid substrat (el propionaldehid) en presència de NAD^+ . Si la concentració de propionaldehid és molt alta, superior a 20 mM, s'ocupa també, el domini P2 i això estimula l'acció oxidativa del centre P1. En aquest centre P2 l'aldehid no és oxidat. És el centre de l'activitat esterasa, pròpia també d'aquest enzim (veure més endavant). Els reactius de grups sulfhidril (com és el disulfiram), probablement, s'unirien al domini P2 (de baixa afinitat pels aldehids), de manera que la seva unió comporta-

ria una inactivació immediata. En canvi, si l'addició del disulfiram té lloc en un assaig d'activitat esterasa, quan ja s'ha afegit el substrat (2-2'-ditiopiridina), aquesta activitat no és afectada en absolut, car el centre P2 està ja ocupat.

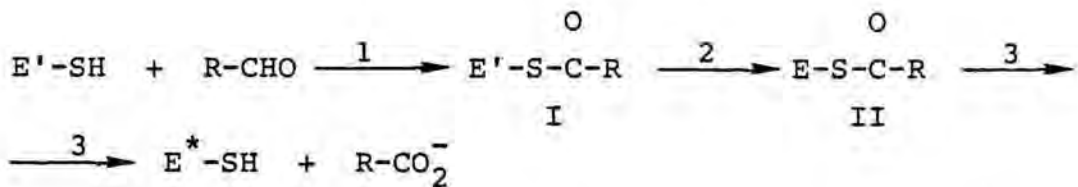
Pel contrari, en un estudi realitzat per Duncan, es descriu que el centre P1 és el responsable de totes dues activitats, la deshidrogenasa i l'esterasa (45) i es posa en discussió la possibilitat de que el domini P2 descrit, sigui el mateix P1.

Una altra propietat comuna a la majoria d'aldehid deshidrogenases és la inhibició per substrat, a concentracions relativament baixes d'aldehid, potser per bloqueig dels grups -SH necessaris per a l'activitat (82), o per la formació d'un complex abortiu ternari (38).

Pel contrari, determinats isoenzims de l'aldehid deshidrogenasa hepàtica de diferents mamífers són activats per altes concentracions d'acetaldehid, propionaldehid, i en determinades espècies per butiraldehid. Aquest mecanisme d'activació no està clar, però pel que fa a l'aldehid deshidrogenasa citosòlica de fetge d'ovella, sembla degut a la formació d'un complex ternari, compost per l'enzim-NADH-aldehid. Això succeeix quan la concentració d'aldehid és molt elevada, de l'ordre de mil·limolar. La dissociació del NADH d'aquest complex és molt més ràpida que a partir del complex binari enzim-NADH que es forma normalment (45).

Els compostos tiòlics o mercaptans també tenen efecte sobre l'activitat d'aquest tipus d'enzims. Així, hi ha determinades aldehyd deshidrogenases que són activades per la presència d'aquests compostos, mentre que d'altres s'inactiven ràpidament en absència dels mateixos.

Quant el mecanisme catalític de les aldehyd deshidrogenases, sembla que l'oxidació de l'aldehyd té lloc mitjançant l'atac d'un nucleòfil, probablement un grup tiol d'un residu de cisteïna, sobre el grup carbonil (pas 1), donant lloc a la formació del tiohemiacetal I. Tot seguit, es produeix la deshidrogenació (pas 2) i la hidròlisi del tioester o des-acilació (pas 3). En aquest darrer pas podria participar-hi un residu de histidina, actuant coordinadament amb un segon grup i constituint un sistema per a la captació de protons de l'aigua.

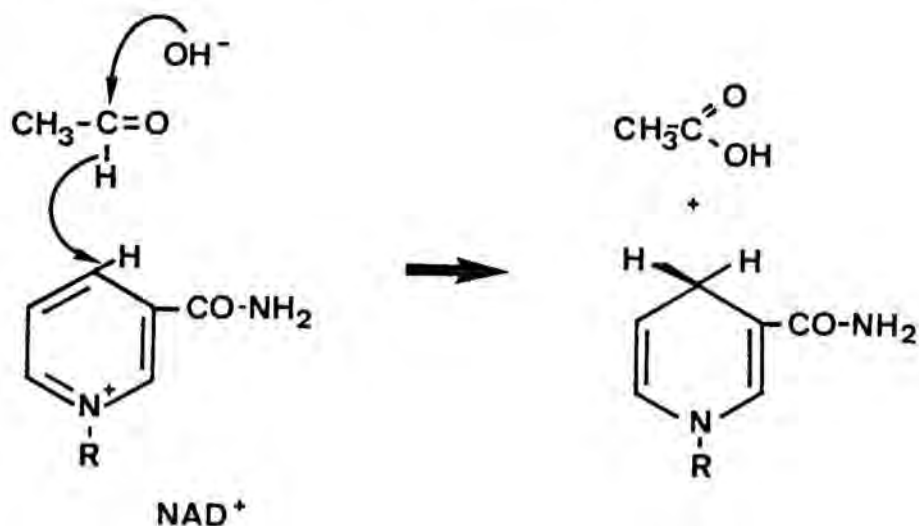


Amb aquest mecanisme, l'aldehyd deshidrogenasa és capaç d'actuar també com a esterasa, hidrolitzant esters suficientment reactius com els esters del nitrofenol. L'intermedi II és comú a les activitats deshidrogenasa i esterasa.

Aquesta activitat esterasa està descrita per a les aldehyd deshidrogenases de mamífers i també per a la gliceralde-

hid-3-fosfat deshidrogenasa d'E.coli (36).

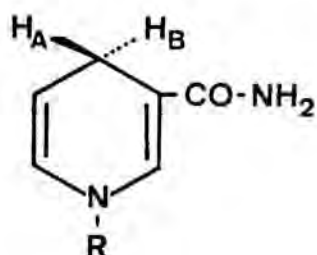
Per tècniques isotòpiques s'ha comprovat que el hidrogen rebut pel cofactor (NAD^+ o NADP^+) es donat pel propi aldehyd (83,154). Així sembla que el pas clau en l'oxidació d'aldehyds és la ruptura de l'enllaç $\alpha\text{-C-H}$ amb la transferència d'un hidrur al coenzim. Per a explicar aquesta transferència es postula un atac nucleofílic, molt probablement d'un grup OH^- o H_2O segons el següent esquema :



D'acord amb aquesta hipòtesi, l'activitat enzimàtica incrementaria a l'augmentar el pH fins a 10, valor pel damunt del qual s'aconsegueix una inactivació reversible. De fet, la majoria d'aldehyd deshidrogenases descrites presenten pHs òptims alcalins, compresos entre 8 i 9,5. D'aquesta manera, els grups hidroxil estarien implicats en el mecanisme oxidatiu.

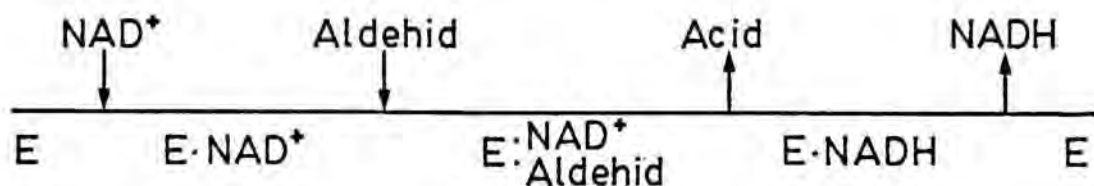
Així, la majoria d'aldehyd deshidrogenases poden actuar sobre diversos aldehyds, però cap és capaç d'oxidar cetones, donada la manca de l'enllaç $\alpha\text{-C-H}$.

El centre d'unió de l'enzim al NAD^+ sembla ésser bastant similar en totes les deshidrogenases en general, de manera que l'anell de l'adenina s'uniria a una cavitat hidrofòbica, formada probablement per les cadenes laterals dels aminoàcids valina, isoleucina i alanina. La formació de ponts d'hidrogen amb les cadenes laterals d'aminoàcids polars donaria una orientació específica a la unió del NAD^+ amb l'enzim. D'aquesta manera, la transferència de l'àtom d'hidrogen des de l'aldehid a l'anell de l'adenina, té lloc a una de les possibles posicions isomèriques, l'A o la B. Segons aquesta estereoespecificitat, les deshidrogenases es classifiquen en dos grups : les A- i les B-deshidrogenases. En funció d'aquest concepte, la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa està considerada com a una deshidrogenasa del tipus B(126).



Pel que fa al mecanisme cinètic de les aldehid deshidrogenases, hi ha diferències segons sigui la concentració d'aldehid. Així, a baixes concentracions d'aldehid, fins a 50-100 μM , l'enzim segueix un mecanisme seqüencial ordenat BiBi en el que s'uneix, en primer lloc, el NAD^+ i després l'aldehid. A continuació, s'allibera, de manera irreversible, l'àcid

producte, i finalment, té lloc l'alliberació del NADH (45,172)



Aquest mecanisme cinètic ha estat estudiat en diferents isoenzims de l'aldehid deshidrogenasa d'home i de mamífers, si bé no hi cap estudi descrit per a aldehid deshidrogenases de procariotes. El pas limitant de la reacció enzimàtica és l'alliberació del NADH, o bé la des-acil.lació, depenent del tipus d'isoenzim que es tracti.

En un principi es creia que la forma dels aldehids susceptible a l'oxidació enzimàtica era la forma hidratada : en solució aquosa, els aldehids s'hidraten i existeixen en un equilibri d'espècies, unes amb grup carbonil i altres amb estructura de gem-diol. Estudis realitzats amb l'aldehid deshidrogenasa de llevat demostren que per a aquest enzim, la forma usada com a substrat és la forma carbonílica. Pel contrari, la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa actua sobre la forma hidratada de l'acetaldehid i butiraldehid (113)

La majoria d'aldehid deshidrogenases descrites presenten una àmplia especificitat de substrat i són actives sobre una

gran varietat d'aldehids (11,47,81,145,152). Algunes només actuen sobre aldehids alifàtics i d'altres poden oxidar, fins i tot, aromàtics.

Hi ha un grup d'aldehid deshidrogenases descrites com a específiques per a l'oxidació d'un determinat aldehid, entre les que s'inclouen dos enzims que actuen sobre el lactaldehyd, un sobre la forma D- (168) i l'altre sobre la forma L- (150). Les semialdehyd succinic deshidrogenases també pertanyen a aquest grup (21,114).

Hi ha certa discrepància en les referències sobre l'efecte de la preincubació de la preparació enzimàtica amb el cofactor i/o amb el substrat. Així, s'ha descrit que determinades aldehid deshidrogenases són inhibides per la incubació en presència de substrat (167). D'altres són activades per la incubació amb el cofactor (81,82). En el cas de la lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli aquestes incubacions no tenen cap efecte sobre la velocitat de la reacció enzimàtica (150).

Per a explicar aquest fenomen es postula que la unió del NAD^+ provocaria un canvi conformacional que afavoriria la catalisi enzimàtica.

Totes les aldehid deshidrogenases descrites catalitzen la reacció de manera irreversible, llevat una glicolaldehyd deshidrogenasa d'E.coli B involucrada en la biosíntesi de la vitamina B_6 (111,112,147), i l'arilaldehyd deshidrogenasa de Neurospora crassa.

La marcada inestabilitat de les aldehyd deshidrogenases, sobretot en les etapes últimes dels processos de purificació, en els que la concentració de proteïna és molt baixa, és una constant dins aquest grup d'enzims. S'aconsegueix estabilitzar-los amb la utilització de compostos tiòlics que protegeixen els grups sulfhidril. El glicerol també ha estat usat com a estabilitzador per diferents autors, sobretot a l'emmagatzematge dels enzims purificats (67,79,152). Fins i tot, està descrit que un dels isoenzims de l'aldehyd deshidrogenasa de fetge de cavall (47) és sensible a la presència d'oxigen, i nactivant-se ràpidament en aquestes condicions. Per aquest motiu, els autors treballaven en atmòsfera de nitrògen. Es postula que la inactivació és conseqüència de l'oxidació dels grups -SH de la proteïna nativa.

Quant l'efecte dels ions sobre l'activitat de les aldehyd deshidrogenases, el resultat és variable. Així, hi ha enzims activats per cations monovalents, com és el cas de l'aldehyd deshidrogenasa de llevat activada per K^+ (11,152) i l'aldehyd deshidrogenasa de Proteus vulgaris (159). D'altres són activats per cations divalents. Com a exemples d'aquest darrer grup tenim una aldehyd deshidrogenasa de llevat activada per Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , i Mn^{2+} (145), i l'aldehyd deshidrogenasa citosòlica de fetge de mamífers, que és activada per Mg^{2+} . Determinades aldehyd deshidrogenases no són activades per ions, sino pel contrari, són inhibides per cations divalents, com és el cas de la lactaldehyd deshidrogenasa (150) i l'aldehyd deshidrogenasa mitocondrial de fetge de mamífers.

A nivell molecular, hi ha una gran diversitat de resultats referents a pesos moleculars i estructures oligomèriques, si bé moltes presenten en la seva forma nativa, un pes molecular al voltant de 200.000 daltons (47,67,79,152), al mateix temps que la majoria presenta estructures dimèriques o tetramèriques.

És freqüent l'existència d'isoenzims de l'aldehid deshidrogenasa, sobretot en mamífers (home, bou, cavall, ovella, rata, etc). Els estudis s'han realitzat bàsicament en fetge si bé està descrita, també, l'existència d'isoenzims d'aldehid deshidrogenasa en altres òrgans i teixits com cervell de porc (46), cornea de bou (167) i placenta humana.

Nombrosos estudis en diverses espècies demostren l'existència d'isoenzims en diferents fraccions subcel·lulars: citosòlica, microsomal i mitocondrial.

Els diferents isoenzims de l'aldehid deshidrogenasa de mamífers es divideixen en dues grans classes, segons el valor de la seva K_m pels aldehids de cadena curta (acetaldehid): isoenzims de baixa K_m (micromolar) i isoenzims d'alta K_m (mil·limolar). Ambdues classes poden coexistir en el mateix compartiment subcel·lular.

Donada la seva àmplia especificitat de substrat poden actuar sobre l'acetaldehid en el metabolisme de l'etanol, així com sobre diversos aldehids originats en el metabolisme del colesterol, 21-dehidrocorticoesteroids i d'amines biògenes, com la dopamina i la serotorina (172).

En organismes inferiors, com llevats i bacteris, no està descrita tanta diversitat d'isoenzims, però si en determinats cassos es presenta la co-existència, en un mateix organisme, de dues o més formes d'aldehid deshidrogenasa que difereixen, entre altres coses, en l'especificitat de cofactor. Aquest és el cas de les aldehid deshidrogenases de Pseudomonas aeruginosa (67) i les semialdehid deshidrogenases de Pseudomonas (114).

Una versatilitat diferent és la formació d'hibrids amb subunitats que provenen de diversos enzims del tipus aldehid deshidrogenasa i que té lloc en determinades espècies de Pseudomonas (veure 1.2.2.).

En altres cassos, com és el de l'aldehid deshidrogenasa de Proteus vulgaris (159) i el de la lactaldehid deshidrogenasa d'E.coli (150), no es descriu l'existència d'isoenzims.

És coneguda l'existència de famílies d'enzims, que presenten mecanismes catalítics comuns. L'anàlisi estructural d'aquests enzims mostra les zones més conservades al llarg de l'evolució i que, per tant, són importants en la seva funció. Això fa pensar en un possible origen comú pels enzims que pertanyen a la mateixa família. El gen ancestral comú, mitjançant mutacions i/o duplicacions gèniques hauria anat diversificant-se fins a donar els diferents enzims (72). Aquest és el cas de les serin-proteases.

Des d'aquest punt de vista, les aldehid deshidrogenases podrien considerar-se membres d'una gran família formada per les deshidrogenases en general, com són les alcohol i aldehid deshidrogenases, la lactat deshidrogenasa i la malat deshidro-

genasa, entre altres, així com les quinases. Aquesta hipòtesi va ésser formulada fa uns quants anys, en funció de la similitud estructural dels dominis d'unió d'aquests enzims amb els cofactors, si bé encara no es disposava de resultats comparatius a nivell de seqüència (72).

Les anàlisis estructurals realitzades amb diverses deshidrogenases : lactat deshidrogenasa, gliceraldehid fosfat deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa hepàtica i malat deshidrogenasa, confirmen la similitud del centre d'unió al NAD^+ . Els principals elements estructurals que el formen són sis fragments en estructura de fulles plegades β ($\beta^A, \beta^B, \beta^C, \beta^D, \beta^E$) i quatre hèlix ($\alpha^B, \alpha^C, \alpha^E, \alpha^{1F}$). Hi ha dues hèlix, una a cada banda de les fulles. Encara que existeixen petites diferències en aquestes estructures, s'ha vist que les zones més conservades són els quatre fragments de cadena polipeptídica centrals en estructura β , on es localitzaen els residus d'unió al coenzim (136).

Si bé aquest domini està tan conservat, s'aprecien diferències considerables en les estructures d'aquests enzims responsables de la unió als substrats, fet que porta a considerar que aquesta família proposada, no seria tant propera com la descrita per altres enzims.

En altres proteïnes s'ha descrit la presència d'estructures semblants a les responsables de la unió de mono o dinucleotids de les deshidrogenases. Exemples d'aquest tipus són la flavodoxina (que utilitza com a coenzim el FAD), les quinases

(que utilitzen ATP). De la mateixa manera, en la rodanasa, enzim que és inhibit per NAD^+ , NADH , FAD i FMN , s'han detectat dos dominis amb certe reminiscència dels dominis d'unió al NAD^+ de les deshidrogenases. Així, també s'ha detectat una certa similitud entre la cavitat aromàtica específica de la subtilisina i el domini d'unió al NAD^+ de les deshidrogenases.

Totes aquestes similituds porten a considerar l'existència d'una gran família que provindria d'un gen ancestral comú, que seria el responsable de la síntesi d'una única proteïna amb un centre d'unió a mononucleòtids. Posteriors canvis graduals a nivell estructural haurien donat lloc a la gran diversitat de formes enzimàtiques amb capacitat d'unió a nucleòtids.

Així, la unitat bàsica estructural d'aquest primer centre d'unió es troba duplicat en el domini esmentat de les deshidrogenases, i és molt probable, que el mateix domini s'hagi incorporat a les quinases per a la unió de l'ATP. Fins i tot es postula que aquest domini és específic per a l'adenosina, i que la presència d'adenosina en els quatre cofactors NAD^+ , ATP , FAD i Coenzim A, seria conseqüència d'una història evolutiva comuna. Però per una altra part, la presència d'aquesta unitat en la flavodoxina, així com a la rodanasa i la subtilisina, és una indicació de la seva àmplia distribució. Pel que s'especula, que aquesta estructura ha estat incorporada a varies proteïnes a les que era necessària per a la seva funció.

1.2. ALDEHID DESHIDROGENASES EN EL METABOLISME BACTERIÀ.

1.2.1. ALDEHID DESHIDROGENASES D'AMPLIA ESPECIFICITAT,

Hi ha dades en la bibliografia referents a l'existència en bacteris, d'enzims capaços d'oxidar una gran varietat d'aldehids als corresponents àcids. En la major part dels cassos, el seu paper fisiològic no es coneix, si bé es creu que són útils en la transformació dels aldehids tòxics.

Fent un repàs, descriurem algunes d'aquestes aldehyd deshidrogenases :

- Així, en una soca de Pseudomonas fluorescens aïllada de medis amb etilenglicol com a única font de carboni i energia, es detectà un enzim amb activitat aldehyd deshidrogenasa, tant en condicions d'aerobiòsi com anaeròbiques (81). L'enzim parcialment purificat presentava un pH òptim d'activitat de 8,4 i es mostrava inestable a pH alcalí. Necessitava de la presència de fosfat o arseniat per a la catàlisi de la reacció. Utilitza com a cofactor el NAD^+ i el NADP^+ , encara que l'activitat en presència d'aquest darrer és d'un 25% de la detectada amb NAD^+ . L'enzim és actiu sobre una gran varietat d'aldehids tant alifàtics com aromàtics. No presenta activitat ni sobre semialdehyd succinic, ni glicerladehid-3-fosfat, ni àcid glio-xflic. Quan els aldehids sobrepassen la concentració idònia, tenen un efecte inhibidor. La reacció catalitzada per l'enzim no és reversible. La incubació prèvia de l'enzim amb el substrat comporta una inactivació, mentre que és activat per la

incubació amb el cofactor. Els productes de la reacció s'han identificat com els àcids corresponents a cada aldehyd.

- A partir d'una soca de Pseudomonas aeruginosa capaç d'assimilar parafina, s'han purificat dues aldehyd deshidrogenases, una lligada a NAD^+ , l'altra a NADP^+ (67). L'enzim lligat a NAD^+ s'inactiva ràpidament, si bé és protegit per NAD^+ . Té un pes molecular de 225.000 daltons i presenta una elevada afinitat pels aldehyds de cadena curta o mitjana.

L'altre enzim, el dependent de NADP^+ és activat per ions, en concret pel K^+ i presenta una gran afinitat pels aldehyds de cadena llarga.

Tots dos enzims són estabilitzats per tiols i glicerol, alhora que són inactivats per reactius de grups sulfhidril. Presenten un pH òptim de 9 i 9,4 en solucions de pirofosfat potàssic i glicina-KOH respectivament.

Són constitutius, donat que es troben presents, també, en els creixements d'aquesta soca en glucosa. El seu paper és incert.

Quan aquesta soca creix en n-parafina produeix una nova activitat aldehyd deshidrogenasa lligada a NAD^+ i unida a membrana.

Una aldehyd deshidrogenasa lligada a NADP^+ ha estat purificada a partir de Proteus vulgaris (159). No està clar el seu paper fisiològic dins la cèl.lula, si bé podria estar relacionat amb una via degradativa de la L-leucina, diferent a la

via establerta, donat que els autors no van detectar cap activitat aldehid deshidrogenasa lligada a CoA capaç d'actuar sobre l'isovaleryl-CoA format, normalment, a partir de la L-leucina, a través del isovaleraldehid. En el seu lloc van aïllar una aldehid deshidrogenasa lligada a NADP⁺ que presentava activitat sobre l'isovaleraldehid, propionaldehid i acetaldehid. Tots aquests aldehids provoquen l'efecte d'inhibició a elevades concentracions de substrat. La reacció enzimàtica depèn completament de la presència dels cations monovalents NH₄⁺, Rb⁺ o K⁺, mentre que el Li⁺, Cs⁺ i Na⁺ no tenen quasi efecte sobre l'activitat enzimàtica. El pH òptim de l'enzim és 9.

- S'ha descrit la participació d'una aldehid deshidrogenasa en el mecanisme de fixació de nitrògen pels bacteroids de Rhizobium japonicum en la soja. Els estudis s'han fet purificant l'enzim aldehid deshidrogenasa a partir de la forma lliure i de la forma bacteroid (123).

Sembla que l'oxidació d'aldehids dona el poder reductor (NADH) necessari per a les activitats nitrogenasa i de fosforilació oxidativa implicades en el mecanisme de fixació de nitrògen. En els nòduls de la planta i com a conseqüència del metabolisme fermentatiu es formen etanol i acetaldehid, els quals estimulen la reducció de l'acetilè i la consumissió d'oxigen pels bacteroids.

En l'estudi portat a terme per tal d'esbrinar quin era el mecanisme d'utilització de l'acetaldehid, es trobà una activitat aldehid deshidrogenasa lligada a NAD⁺, tant en la forma

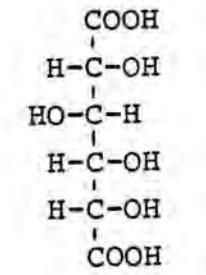
lliure del R. japonicum, com en els bacteroids. L'estabilitat i propietats cinètiques d'aquest enzim són similars a les descrites per a altres al·dehid deshidrogenases bacterianes.

L'enzim del bacteroid és depenent de cations monovalents. És estabilitzat per NAD^+ , NADH i DTT . Té un pH òptim d'activitat alcalí i presenta activitat sobre diversos al·dehids amb una K_m més baixa pels de cadena llarga i no substituïts. Els al·dehids que són substrat de l'enzim, també estimulen l'activitat nitrogenasa i consumissió d'oxigen.

- La semial·dehid 2-cetoglutarat deshidrogenasa catalitza la reacció d'oxidació del semial·dehid 2-cetoglutàric a 2-cetoglutarat. En Pseudomonas sp, dues vies catabòliques induïbles porten a l'esmentada reacció: la ruta de la hidroxiprolina i la del D-glucarat (93) (figura 1). Cada via indueix un isoenzim diferent, si bé els enzims purificats i caracteritzats són molt similars. Tots dos presenten el mateix pes molecular (120.000 daltons) i una estructura dimèrica. La composició d'aminoàcids és molt semblant alhora que ho són també les seves propietats cinètiques. En aquest sentit cal remarcar que l'enzim presenta activitat sobre diversos al·dehids alifàtics, a més del semial·dehid 2-cetoglutàric i del semial·dehid glutàmic. Els al·dehids alifàtics assajats (propional·dehid, butiral·dehid, valer·al·dehid i heptanal) són pitjors substrats que els semial·dehids esmentats, pels qui presenta una K_m molt baixa (de l'ordre de 10^{-5} M). Les K_m de tots dos isoenzims, pels dos semial·dehids, són idèntiques, ara bé la relació de V_{max} semial·dehid 2-ceto-

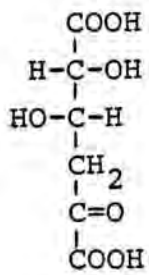
FIGURA 1. VIES INDUÏBLES PER A LA UTILITZACIÓ DE LA
HIDROXIPROLINA I GLUCARAT A PSEUDOMONAS
PUTIDA

- 1) D-glucarat dehidrasa
- 2) Deoxioxoglucarat hidro-liasa
- 3) Hidroxiprolina-2-epimerasa
- 4) Allohidroxi-D-prolina oxidasa
- 5) Δ^1 -pirrolina-4-hidroxi-2-carboxilat desaminasa
- 6) Semialdehid 2-cetoglutàric deshidrogenasa



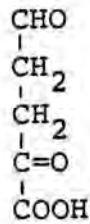
D-glucàric

1)

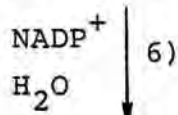


D-4-deoxi-5-cetoglutàric

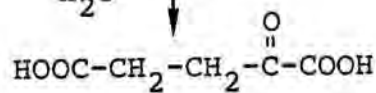
2)



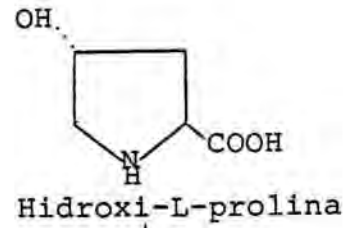
semialdehid α -cetoglutàric



6)

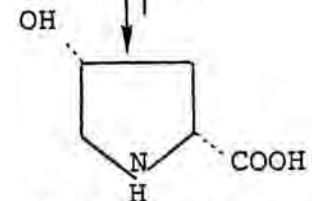


α -cetoglutàric



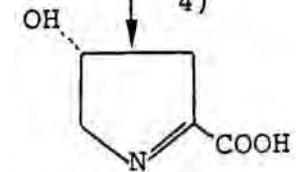
Hidroxi-L-prolina

3)



Allohidroxi-D-prolina

4)



Δ^1 -pirrolina-4-hidroxi-2-carboxilic

5)

glutàric/semialdehid glutàmic superior a 1, en ambdós cassos (aproximadament 5), indica que l'eficiència catalítica de tots dos isoenzims sobre el semilaldehid 2-cetoglutàric és més elevada. Els dos isoenzims utilitzen preferenment el NADP^+ com a cofactor, si bé són capaços d'usar també NAD^+ en menor eficiència.

Tots dos isoenzims són diferenciables en quant a la seva estabilitat tèrmica a 47°C en aigua, així com en el perfil de pèptids obtinguts per digestió de les preparacions amb tripsina. Immunològicament són també diferents, de manera que els estudis immunològics han servit per a identificar la inducció conjunta de tots dos isoenzims en els extractes cel·lulars, per la presència de glucarat i hidroxiprolina en el medi de cultiu.

A la vegada, mutants deficients en l'isoenzim induït per la hidroxiprolina, produeixen nivells normals de l'altre isoenzim, quan creixen en D-glucarat.

1.2.2. ALDEHID DESHIDROGENASES ESPECÍFIQUES.

- El creixement de determinades espècies de Pseudomonas en diverses poliamines (putrescina, espermidina o bisaminopropilamina) comporta la presència constitutiva de varies aminoaldehid deshidrogenases específiques, lligades a NAD^+ amb activitat sobre 3-aminopropanal i 4-aminobutanal, separables per cromatografia en columna i electroforesi, conjuntament amb una semialdehid succínic deshidrogenasa específica lligada a NAD^+ i una altra lligada a NADP^+ .

Les espècies de Pseudomonas degraden l'espermidina a 3-aminopropanal i putrescina. Aquesta última és posteriorment degradada per transaminació a 4-aminobutanal, que a la vegada és oxidat a 4-aminobutirat. El 3-aminopropanal és transformat en β -alanina.

En els extractes cel·lulars d'aquestes soques, es van detectar dos enzims, diferenciables en el seu comportament en la precipitació amb sulfat amònic, amb activitat diferent sobre ambdós aminoaldehyds, de manera que un presentava una Km més baixa pel 4-aminobutanal i, probablement, era el responsable de la seva oxidació "in vivo". Així, en els creixements en putrescina, els extractes cel·lulars presentaven una proporció més elevada de l'enzim amb afinitat pel 4-aminobutanal (122).

Aquests dos enzims van ésser posteriorment purificats. Per a la purificació de la 4-aminobutanal deshidrogenasa es va partir de cultius de Pseudomonas en putrescina. L'enzim es mostrà molt làbil i sensible als reactius de grups sulfhidril. Presentava una Vmax molt més elevada pel 3-aminopropanal que pel 4-aminobutanal i que pel semialdehid succínic, si bé la Km per aquest primer aminoaldehyd era un ordre de magnitud superior a les corresponents als altres aldehyds. Aquesta elevada Km pel 3-aminopropanal, conjuntament amb la inducció d'aquest enzim pel creixement en putrescina (probablement via 4-aminobutanal) indicarien que l'enzim és una 4-aminobutanal deshidrogenasa, malgrat ésser més actiu amb 3-aminopropanal. L'enzim purificat consta de tres subunitats, aparentment idèntiques, de 75.000 daltons (23).

Hi ha referències d'un altre 4-aminobutanal deshidrogenasa present en altres espècies de *Pseudomonas*, en concret de *P. fluorescens*, diferenciable de la descrita per Callewaert i col, en quant és específica per aquest aminoaldehyd i no és activa sobre semialdehyd succinic (84).

Per a la purificació de la 3-aminopropanal deshidrogenasa es va partir de creixements en (3-aminopropil)amina, un anàlog de l'espermidina. Els extractes cel.lulars de *Pseudomonas* presenten alts nivells d'aquest enzim, que és molt actiu sobre el 3-aminopropanal i apenes gens sobre el semialdehyd succinic. Encara que les Km pel 3-aminopropanal i pel 4-aminobutanal són del mateix ordre, la inducció durant el creixement en bis(3-aminopropil)amina (probablement via 3-aminopropanal) indicaria que l'enzim és una 3-aminopropanal deshidrogenasa. L'enzim purificat consta de 3 subunitats, presumiblement idèntiques, de 74.000 daltons (22).

La 3-aminopropanal deshidrogenasa purificada no reacciona amb l'antisèrum específic anti-semialdehyd succinic deshidrogenasa, però sí amb l'antisèrum específic de la 4-aminobutanal deshidrogenasa. Mentre que tots dos enzims, la 4-aminobutanal i la 3-aminopropanal deshidrogenases, són similars en mida i característiques antigèniques, els seus models d'inducció i constants cinètiques són significativament diferents. Això indicaria l'existència d'una estreta relació evolutiva entre ambdós enzims (22).

- Semialdehid succinic deshidrogenasa :

Diversos enzims amb activitat semialdehid succinic deshidrogenasa han estat purificats a partir de bacteris, en concret de diferents espècies de Pseudomonas (21,114) i de teixits de mamífers. Una característica important és la seva especificitat per aquest aldehid.

En l'estudi de la via d'utilització de l'àcid γ -aminobutíric per una soca de Pseudomonas es reportà la presència de dues semialdehid succinic deshidrogenases que oxidaven el semialdehid succinic a succinat (114). Aquests dos enzims amb activitat sobre el semialdehid succinic eren diferenciables quant a la seva especificitat de cofactor, pH òptim, estabilitat (l'enzim lligat a NADP^+ era molt més inestable) i inducció. Així, l'enzim dependent de NADP^+ era constitutiu, i el lligat a NAD^+ era induït pel creixement de Pseudomonas en γ -aminobutíric.

Tots dos enzims mantenien una característica comuna, la d'ésser específics pel semialdehid succinic. Una gran varietat d'aldehids, entre els que s'inclouen el gliceraldehid, el glicolaldehid, àcid glioxílic, semialdehid malònic i butiraldehid, no eren utilitzats com a substrats.

Callewaert i col van comprovar que el creixement d'espècies de Pseudomonas en poliamines comportava la síntesi d'una semialdehid succinic deshidrogenasa específica, conjuntament amb les aminoaldehid deshidrogenases esmentades anteriorment (122).

A fi d'evitar, al màxim, les interferències degudes a la

co-existència d'enzims del tipus aminoaldehid deshidrogenasa que eren actius també sobre el semialdehid succinic, el procés de purificació de la semialdehid succinic deshidrogenasa específica, s'inicià a partir de creixements d'aquestes soques en γ -aminobutíric (21). En aquestes condicions, es troben baixos nivells d'aminoaldehyds deshidrogenases i alts nivells de semialdehid succinic deshidrogenasa.

L'enzim purificat era actiu amb NAD^+ i molt específic pel seu substrat, el semialdehid succinic, mostrant, només, una ínfima activitat sobre 3-aminopropanal (de l'ordre de 200 vegades inferior). L'enzim té un pes molecular de 164.000 daltons i consta de tres subunitats de 54.500 daltons cadascuna. L'enzim es disocia en subunitats a pHs superiors a 9,7 i, en un medi de baixa força iònica, en absència de protectors dels grups sulfhidril s'associa formant un dímer de pes molecular 320.000daltons (134). Aquests canvis estructurals han estat també evidenciats immunològicament. En plaques de doble difusió, s'obtenien una o dues línies de precipitació, segons les condicions de força iònica del medi (134).

Usant les preparacions d'anticossos anti-semialdehid succinic deshidrogenasa, Callewaert i col van detectar la formació d'enzims híbrids en Pseudomonas sp, compostos per subunitats aportades per les diferents aminoaldehyds deshidrogenases descrites en el metabolisme de poliamines (22,23,122) i per la semialdehid succinic deshidrogenasa específica.

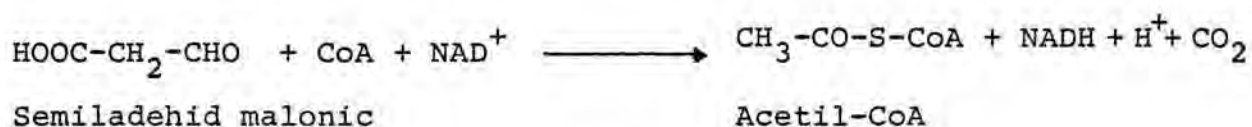
D'aquesta manera, la presència de múltiples deshidrogenases

amb diferents velocitats de reacció sobre el semialdehid succinic i els aminoaldehids és fruit d'aquest mecanisme d'hibridació.

Aquesta formació "in vivo" d'hibrids de diferents subunitats enzimàtiques és un fet sense precedents, si bé té implicacions evolutives importants, ja que aquests hibrids només es formen entre subunitats molt semblants estructuralment. Es podria postular un origen ancestral comú per a aquests enzims, que han anat diversificant i adquirint noves funcions a copia de mutacions (135).

Aquests resultats, conjuntament amb els obtinguts per Jakoby (114) indiquen la presència, en Pseudomonas sp, d' aminoaldehid deshidrogenases lligades a NAD^+ i de dos tipus de semialdehid succinic deshidrogenases, una lligada a NAD^+ , l'altra a $NADP^+$, totes dues específiques.

- Un altre enzim amb una especificitat molt marcada pel seu substrat és la semialdehid malònic deshidrogenasa, que catalitza la següent reacció :



L'enzim purificat a partir de Pseudomonas fluorescens (182) presentava, només, activitat sobre el semialdehid malònic, malgrat haver provat diferents aldehids com a substrat. És inhibit per arsenit i elevades concentracions d'aldehid.

-D,L-lactaldehid deshidrogenasa de Bacillus subtilis.

En una soca de B. subtilis seleccionada per la seva capacitat de créixer en treonina com a única font de carboni i nitrògen, hi ha descrit un enzim involucrat, responsable de l'oxidació del D,L-lactaldehid format a lactat (174).

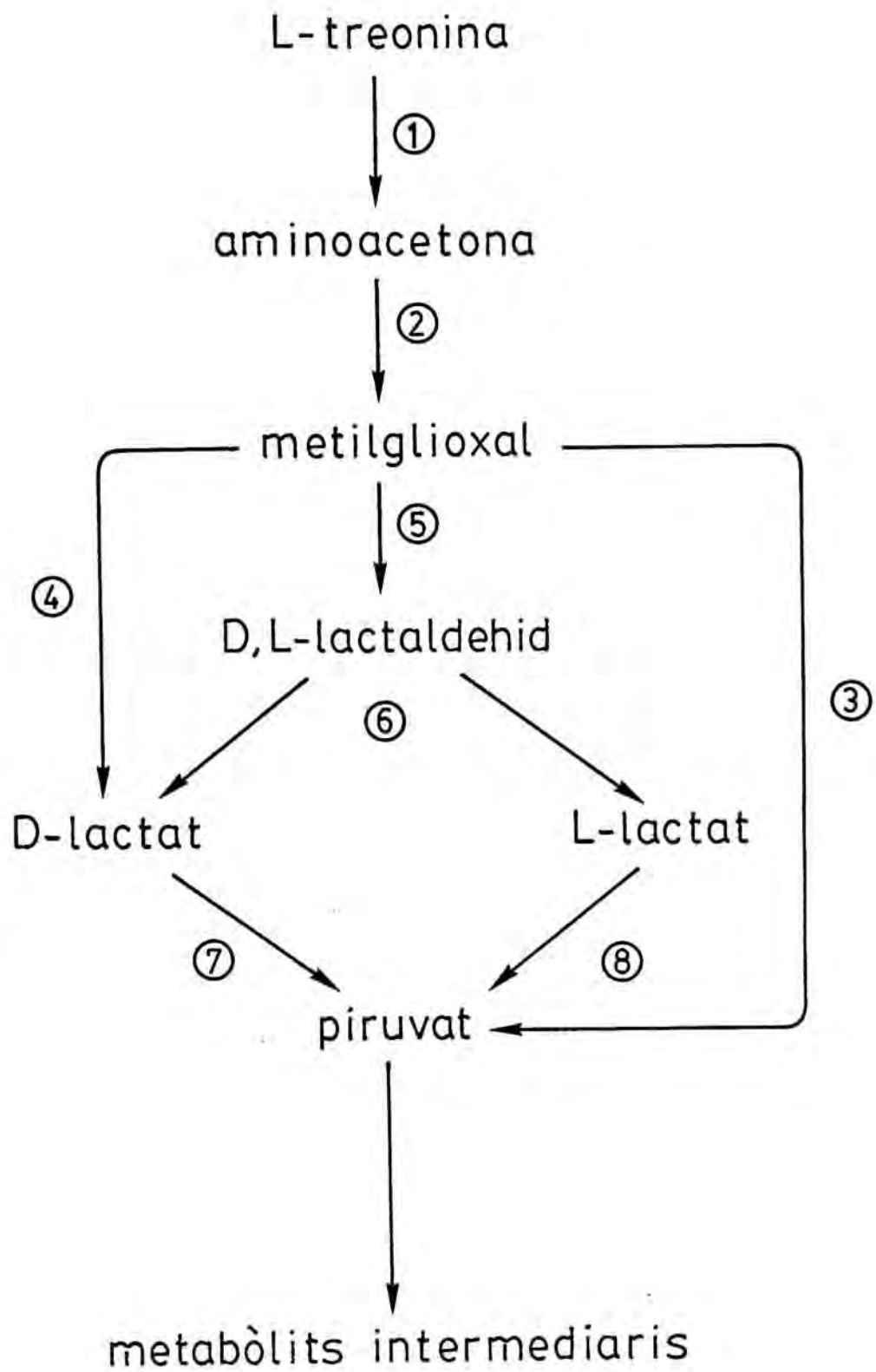
Aquesta soca presenta dues vies alternatives per al catabolisme de la treonina, si bé, la que interessa en relació amb aquest treball és la que utilitza els enzims de la via de l'aminacetona (173) (figura 2).

Aquesta via és iniciada per una L-treonina deshidrogenasa depenent de NAD^+ que transforma l'esmentat aminoàcid en 2-amino-3-oxobutirat. Aquest compost és descarboxilat espontàniament i convertit en aminoacetona. Per l'acció d'una aminoacetona aminotransferasa es forma metilglioal. En aquest punt, la via pot seguir tres camins diferents segons sigui la modificació enzimàtica del metilglioal. Així, el sistema glioalasa transforma el metilglioal en D-lactat. L'enzim amb activitat metilglioal deshidrogenasa oxidaria aquest aldehid a piruvat. Una altre via alternativa és l'actuació de la metilglioal reductasa per a donar D,L-lactaldehid, el qual és oxidat a lactat per una lactaldehid deshidrogenasa. Tots dos isòmers del lactat, el D- i el L-, són transformats en piruvat per sengles lactat deshidrogenases específiques (E.C.1.1.1.28 i E.C.1.1.1.27).

L'estudi de l'enzim amb activitat lactaldehid deshidrogenasa present en B. subtilis quan creix en treonina s'inicià per la detecció de l'activitat enzimàtica en els extractes cel·lulars corresponents (174).

FIGURA 2. ENZIMS INVOLUCRATS EN EL CATABOLISME DE LA TREONINA EN UNA SOCA DE BACILLUS SUBTILIS CAPAÇ DE CRÉIXER EN AQUEST AMINOÀCID.

- 1) L-treonina deshidrogenasa + descarboxilació espontània
- 2) Aminoacetona aminotransferasa
- 3) Metilglioxal deshidrogenasa
- 4) Sistema glioxalasa
- 5) Metilglioxal reductasa
- 6) D,L-lactaldehid deshidrogenasa
- 7) D-lactat deshidrogenasa
- 8) L-lactat deshidrogenasa



L'enzim parcialment purificat utilitza NAD^+ com a cofactor. És actiu sobre els dos isòmers del lactaldehyd i els productes formats en la reacció enzimàtica han estat identificats com a L-lactat i D-lactat respectivament. Presenta un pes molecular de 70.000 daltons i és perfectament diferenciable de la metilglixal deshidrogenasa sintetitzada en aquest mateix microorganisme. El pH òptim de l'enzim D,L-lactaldehyd deshidrogenasa és de 10,3 en solució amortidora glicina-NaOH. L'activitat en presència de NADP^+ és sols un 5% de l'activitat detectada amb NAD^+ . Les activitats relatives sobre diversos aldehyds, reportades pels autors són: L-lactaldehyd (100%), D-lactaldehyd (56%), metilglixal (8%), acetaldehyd (6%), formaldehyd (6%), benzaldehyd (2%), propionaldehyd (2%), glicolaldehyd (0%) i glicerladehid-3-fosfat (0%). Des d'aquest punt de vista, l'enzim és clarament diferent d'altres descrits amb activitat sobre el lactaldehyd, que són molt més actius sobre l'acetaldehyd i es consideren aldehyd deshidrogenases inespecífiques.

El paper d'aquest enzim dins el catabolisme de la treonina en aquesta soca de B. subtilis està també confirmat per la seva inducció pel creixement en treonina, més que en altres fonts de carboni.

1.2.3. ALDEHID DESHIDROGENASES D'E. COLI,

1.2.3.1. LACTALDEHID DESHIDROGENASA

La lactaldehyd deshidrogenasa d'E. coli (E.C.1.2.1.22) fou descrita per primera vegada per Sridhara i Wu en un mutant

d'aquest microorganisme seleccionat pel seu creixement en 1,2-propandiol com a única font de carboni i energia (la soca 3) (150). Els autors detallen la purificació i caracterització parcials de l'enzim, així com la seva implicació en el metabolisme del L-1,2-propandiol.

La caracterització de l'enzim a nivell molecular es centra només, en la determinació del pes molecular de l'enzim natiu per ultracentrifugació en gradients de sacarosa. Segons els autors, el pes molecular, estimat mitjançant aquesta tècnica, és de 100.000 daltons.

En quant a la caracterització cinètica, cal remarcar que l'assaig enzimàtic emprat per Sridhara i Wu conté glutation 1 mM i que l'aldehid analitzat com a substrat de la reacció, s'utilitzava a la concentració de 20 mM. El pH òptim de la lactaldehyd deshidrogenasa, en solució amortidora de pH carbonat-bicarbonat sòdic, està descrit en un marge comprès entre 10,5 i 11.

En aquestes condicions d'assaig, l'enzim es mostrava, només, actiu sobre el L-lactaldehyd, determinant-se una Km per aquest substrat de 0,01 M. Els altres aldehids analitzats com a substrats de la reacció enzimàtica eren el glicerladehid, propionaldehyd, acetaldehyd, piruvaldehyd i D-lactaldehyd. A la concentració de 20 mM, cap d'ells era oxidat, al menys de manera apreciable, per l'enzim, fet que portà als esmentats autors, a presentar a la lactaldehyd deshidrogenasa com a un enzim altament específic pel L-lactaldehyd, a diferència de la majoria d'aldehyd deshidrogenases descrites (veure 1.1).

El cofactor de l'enzim és el NAD^+ amb una K_m de 10^{-4} M.

Els grups sulfhidril són necessaris per a l'activitat enzimàtica, car els assajos de preparacions enzimàtiques en absència de tiols, presenten sols un 60% de l'activitat trobada en presència de glutatión 1 mM. Les diàlisis en absència d'EDTA i 2-mercaptoetanol comporten la pèrdua total d'activitat que és recuperada de nou per l'addició d'aquests reactius. L'enzim és inhibit per ions Cu^{2+} i també per iodoacetat.

La pre-incubació de l'enzim amb NAD^+ , o amb lactaldehid, no modifica la velocitat de la reacció enzimàtica. La reacció no és reversible. El producte de la qual ha estat identificat com a lactat.

Si bé en aquesta publicació (150), la purificació descrita pels autors no rendia preparacions homogènies, la caracterització de l'enzim tampoc era completa, i endemés restaven punts foscos (l'activitat específica era molt baixa en els extractes cel.lulars tant de la soca 1 com de la soca 3). No hi ha referències bibliogràfiques al respecte posteriors a l'esmentada publicació.

1.2.3.2. GLICOLALDEHID DESHIDROGENASA.

Hi ha descrites en la literatura diverses activitats glicolaldehid deshidrogenasa, tant en microorganismes, com en eucariotes, concretament en plantes (40). Donat l'àmbit d'aquest treball ens referirem més concretament a les descrites en E.coli.

La primera referència sobre l'existència d'una activitat glicolaldehid deshidrogenasa en E.coli fou la implicada en el metabolisme de la D-arabinosa en un mutant d'E.coli K-12 (101). Aquesta soca utilitza la D-arabinosa mercès a la capacitat d'induir els enzims del metabolisme de la L-fucosa (veure 1.3.1). Per acció de l'aldolasa respectiva, es forma fofat de dihidroxiacetona i glicolaldehid. Aquest últim intermediari és oxidat a glicolat per una activitat glicolaldehid deshidrogenasa no caracteritzada pels autors.

Per altra banda, en l'estudi del possible paper del glicolaldehid com a precursor en la biosíntesi de la vitamina B₆ (144,164,171), s'ha descrit en E.coli B, una glicolaldehid deshidrogenasa depenent de NADP⁺ que és capaç d'interconvertir glicolaldehid i glicolat, actuant en aquesta soca com a font de glicolaldehid a partir de glicolat (112,147). Fins i tot, en un dels treballs (112) es descriu l'existència d'isoenzims de la glicolaldehid deshidrogenasa, separats per cromatografia de bescanvi iònic en DEAE-sephadex i diferenciables quant a la seva localització subcel.lular i equilibri de reacció. També hi ha dades sobre la distribució d'aquesta activitat glicolaldehid deshidrogenasa en una gran varietat d'especies bacterianes capaces de sintetitzar vitamina B₆ (111).

La comparació, així com la possible identitat entre aquesta glicolaldehid deshidrogenasa relacionada amb la vitamina B₆ i l'enzim objecte d'aquest treball es presentaran als apartats 3.8.3 i 4.4)

Boronat i col descriuen una activitat glicolaldehid deshidrogenasa en el metabolisme de l'etilenglicol en mutants d'E.coli (16) (veure apartat 1.3.3). L'enzim responsable d'aquesta activitat pot usar com a cofactor tant NAD^+ com NADP^+ , si bé l'activitat en presència del darrer coenzim és deu vegades inferior a l'activitat dependent de NAD^+ i activada per potàssi. La comprovació de que ambdues activitats enzimàtiques, la lligada a NAD^+ i la dependent de NADP^+ són funció de la mateixa proteïna enzimàtica s'obtingué per : a) la co-elució simultània en una cromatografia de bescanvi iònic en DEAE-sephadex i b) pel revelat per activitat glicolaldehid deshidrogenasa dependent de NAD^+ i de NADP^+ de gels de poliacrilamida d'extractes cel.lulars sotmesos a electroforesi en condicions no desnaturalitzants. Tots dos revelats donaven una única banda d'activitat que presentava idèntica mobilitat electroforètica.

Aquests autors identificaren el glicolat com el producte de la reacció enzimàtica, usant preparacions d'extractes cel.lulars parcialment purificades per cromatografia de bescanvi iònic en DEAE-sephadex. Després d'incubar durant 30 minuts a 37°C la mescla d'assaig, els diferents components foren separats per cromatografia en paper. El revelat per acridina donà una única banda, quin R_f coincidia amb el del glicolat usat com a patró.

Amb aquestes preparacions parcialment purificades es determinà un pH òptim de 9,5, així com les constants cinètiques (K_m) pel glicolaldehid i pel NAD^+ (19).

1.2.3.3. GLICERALDEHID-FOSFAT DESHIDROGENASA.

La gliceraldehid-fosfat deshidrogenasa d'E.coli va ésser purificada i caracteritzada per D'Alessio i Josse (35,36). L'enzim, amb el codi E.C.1.2.1.12, participa a la glicòlisi catalitzant la transformació del gliceraldehid-3-fosfat en 1,3-difosfoglicerat. És per tant, un enzim amb doble activitat, l'oxidativa i la fosforiladora. Es induït pel creixement aeròbic d'E.coli en glucosa i glicerol, respecte el succinat.

Segons aquests autors, l'enzim natiu, que presenta un pes molecular de 144.000 daltons, consta de 4 subunitats idèntiques de 36.000 daltons. En un estudi comparatiu realitzat amb altres enzims gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa de diferents organismes, els autors manifesten que no hi ha diferències apreciables entre ells, quant a forma, mida i composició d'aminoàcids.

Un estudi de tipus genètic sobre la gliceraldehidfosfat deshidrogenasa d'E.coli és el realitzat per Hillman i Fraenkel (76), on es descriu que el gen que codifica per a aquest enzim (gap) està localitzat aproximadament en el minut 34 dins el cromosoma circular d'E.coli, amb l'ordre transduccional de gap-fadD-eda. En la realització d'aquest estudi va resultar de gran utilitat un mutant termosensible que presentava un enzim gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa més làbil en front d'un tractament tèrmic, que l'enzim de la soca progenitora. Una característica important dels mutants d'E.coli deficients en l'activitat gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa és la incapacitat de créixer en medis que contenen les següents fonts

de carboni : glucosa, glicerol, gluconat, fructosa, galactosa, malat, glicerat, succinat i acetat. Però poden créixer en medis en glicerol+malat.

L'enzim gliceraldehidfosfat deshidrogenasa d'E.coli va ésser també purificat per Hillman, en un procés totalment diferent al descrit per D'Allesio, en el que s'inclou una cromatografia d'afinitat en agarosa-hexà-NAD . L'enzim homogèni es va utilitzar com a antígen en la inoculació a conills per tal d'obtenir anticossos específics. Els estudis immunològics en plaques de doble difusió van evidenciar una característica important : quan s'usava enzim homogèni com a antígen, només apareixia una línia de precipitació, però quan s'usaven extractes cel.lulars d'E.coli apareixien dues bandes (75). Ambdues línies de precipitació eren específiques i s'obtenien per la interacció de l'anticòs amb determinants antigènics de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa, pel que semblava que aquest enzim està present en dues formes en els extractes cel.lulars d'E.coli tipus salvatge.

Després de descartar la possibilitat de que una de les bandes de precipitació fós conseqüència d'una interacció amb un producte de proteòlisi de l'enzim natiu, i de comprovar que l'existència d'aquestes dues formes no era deguda a diferències en la quantitat de NAD^+ o d'altres lligants units, l'autor suggereix la possibilitat de que la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa existeixi en un equilibri entre el dímer i el tetràmer, a l'igual que succeix amb l'enzim de múscul de porc.

1.2.3.4. ALDEHID DESHIDROGENASA L·LIGADA A COENZIM A.

L'enzim aldehid edshidrogenasa lligada a CoA present a E.coli B va ésser escollit per Rudolph i col per a realitzar un estudi de tipus cinètic, sobre el mecanisme d'acció dels sistemes enzimàtics amb tres substrats (137).

L'enzim està present en els extractes cel·lulars d'E.coli B feta créixer en un medi mineral basal suplementat amb glucosa i peptona. La reacció que catalitza és reversible i d'aquesta mena :



És un enzim dependent de reactius de grups sulfhidril (2-mercaptoetanol i DTT) car en absència d'aquests compostos a la mescla d'assaig és totalment inactiu. La incubació previa amb NAD^+ és necessària per tal d'obtenir velocitats inicials normals. El pH òptim reportat per a aquest enzim es de 7,0 en solució amortidora de fosfat potàssic.

És actiu sobre acetaldehid, propionaldehid i butiraldehid. El gliceraldehid no és substrat de la reacció enzimàtica. Els productes de la reacció s'han identificat com a NADH i acetil-CoA. Experiments de velocitat inicial suggereixen un mecanisme ping-pong. En la reacció reversa, sembla que l'acetil-CoA s'uneix a l'enzim abans de l'addició de NADH. En l'altre sentit de la reacció, són el NAD^+ i l'acetaldehid els que interaccionen amb l'enzim abans de l'addició de CoA.

El paper fisiològic d'aquest enzim aldehid deshidrogenasa lligada a CoA podria estar relacionat amb el metabolisme de la

valina. En Pseudomonas aureginosa, una de les etapes del catabolisme d'aquest aminoàcid és la transformació de propionaldehid en propionil-CoA mitjançant l'acció d'una aldehid deshidrogenasa acetiladora. (149).

El metabolisme de treonina, en una soca de B. subtilis, iniciat per la L-treonina aldolasa, comporta la formació d'acetaldehid que és transformat en acetil-CoA per una activitat enzimàtica d'aquesta mena (175).

1.3. METABOLISMES RELACIONATS AMB LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA D' E. COLI.

1.3.1. METABOLISME DE L-FUCOSA I L-RAMNOSA EN E. COLI.

La L-fucosa és metabolitzada en E. coli a través de l'acció seqüencial d'una serie d'enzims induïbles : la fucosa permeasa (69), la fucosa isomerasa (65), la fuculosa quinasa (73) i la fuculosa-1-fosfat aldolasa (57). Per l'acció d'aquest darrer enzim es forma fosfat de dihidroxiacetona i L-lactaldehid. Aeròbicament, el lactaldehid és oxidat a L-lactat per una lactaldehid deshidrogenasa constitutiva (150). El L-lactat és transformat en piruvat per una lactat deshidrogenasa induïble (probablement del tipus flavoproteïna) (32,89)(figura 3).

Anaeròbicament, tot el lactaldehid és reduït a propandiol per l'acció d'un enzim induïble, la propandiol òxido-reductasa i excretat al medi (32) (figura 3). En aquest procés es regenera NAD^+ , fet indispensable per a l'ulterior metabolisme de la L-fucosa.

La L-fucosa i la L-ramnosa són dos sucres naturals que E. coli pot utilitzar com a font de carboni i energia. La diferència estructural entre la fucosa (6-deoxi-galactosa) i la ramnosa (6-deoxi-manosa) radica únicament en la posició del radical hidroxil dels C_2 i C_4 .

La L-ramnosa és metabolitzada en E. coli mitjançant l'acció seqüencial d'una serie d'enzims induïbles : la ramnosa permeasa (125), la ramnosa isomerasa (161), la ramnulosa qui-

nasa (29,162) i la ramnulosa-1-fosfat aldolasa (30,142) (figura 3).

Com a conseqüència de l'actuació d'aquest darrer enzim, es forma fosfat de dihidroxiacetona i L-lactaldehid. Aeròbicament, el lactaldehid pot ésser oxidat a piruvat per l'acció seqüencial de la lactaldehid deshidrogenasa (150) i de la lactat deshidrogenasa (32). Anaeròbicament, el L-lactaldehid és transformat a propandiol per la propandiol òxido-reductasa i excretat al medi (13).

S'ha de destacar que, si bé existeix una completa analogia entre les reaccions implicades en el catabolisme de la fucosa i de la ramnosa (figura 3), els enzims que hi participen són altament específics per a cada via, així com la seva inducció.

La localització cromosòmica dels gens d'ambdós sistemes és totalment diferent. Així, mentre el sistema de la fucosa (fuc) està situat en el minut 59, el responsable de la metabolització de la ramnosa (rha) ho està en el minut 86, dins el cromosoma circular d'E.coli (7). Per tant, malgrat la gran similitud estructural entre la fucosa i la ramnosa, així com entre les seves vies de degradació, els sistemes fuc i rha es comporten de forma diferent pel que fa als quatre primers enzims de la via metabòlica. Tots dos sistemes semblen tenir una organització genètica diferent. Així, els gens estructurals que codifiquen per a la L-ramnosa isomerasa, L-ramnulosa quinasa i L-ramnulosa-1-fosfat aldolasa semblen estar sota el control positiu d'una proteïna reguladora, quin gen estaria agrupat amb els anteriors (125).

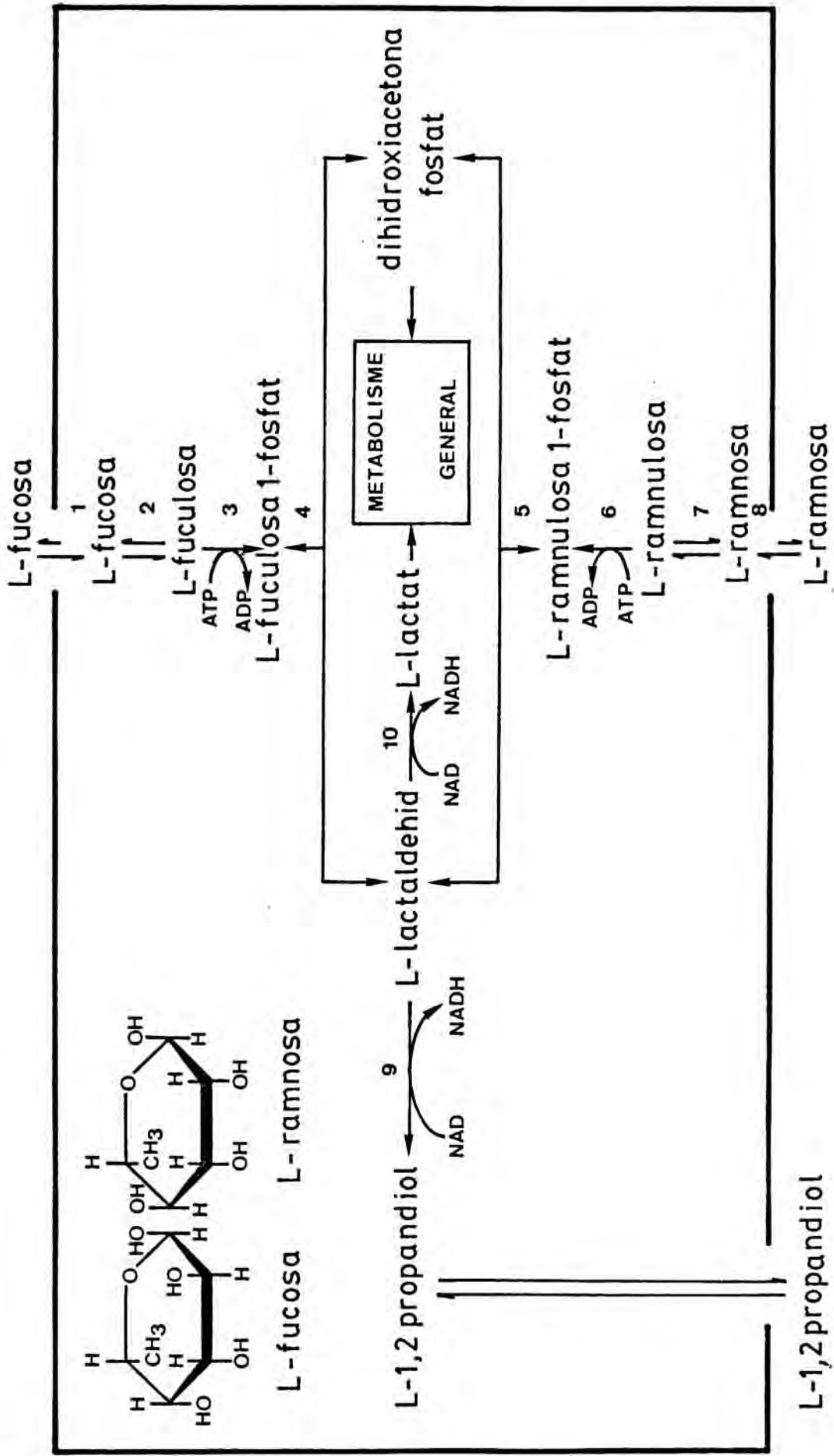
En canvi, pel sistema fuc, tindria agrupats sota un mateix tipus de control els gens de la permeasa, isomerasa i quinasa, mentre que els corresponents a l'aldolasa, la lactaldehyd deshidrogenasa i la propandiol òxido-reductasa constituïrien tres sistemes de regulació independent (26,70).

Pel que fa a la propandiol òxido-reductasa, enzim anaeròbic que comparteixen les dues vies metabòliques, cal esmentar que fucosa i ramnosa exerceixen un control diferent sobre l'expressió del gen o gens que codifiquen aquest enzim. Així, la propandiol òxido-reductasa induïda pel creixement en ramnosa està sota un control de tipus transcripcional, sintetitzant-se, només, en condicions anaeròbiques. Per contra, el creixement d'E.coli en fucosa aeròbicament comporta la síntesi de l'enzim propandiol òxido-reductasa en un estat inactiu, el qual és activat pel canvi a condicions anaeròbiques, tot indicant, que en aquest cas, l'enzim està sota un control de tipus post-transcripcional (25), si bé no es coneix encara el mecanisme que produiria l'activació.

El catabolisme aeròbic de la L-fucosa i la L-ramnosa comparteix l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa, el qual és induït de la mateixa manera pel creixement aeròbic en tots dos sucres. Quant a la localització del gen estructural d'aquest enzim, així com la seva regulació, cal esmentar que són poc conegudes. Està descrit que el gen estructural de la lactaldehyd deshidrogenasa estaria sota el control d'un inductor (molt probablement el propi L-lactaldehyd) i una proteïna

FIGURA 3. METABOLISMES AERÒBICS I ANAERÒBICS DE LA
L-FUCOSA I LA L-RAMNOSA A E.COLI.

- 1) Fucosa permeasa
- 2) Fucosa isomerasa
- 3) Fuculosa quinasa
- 4) Fuculosa-1-fosfat aldolasa
- 5) Ramnulosa-1-fosfat aldolasa
- 6) Ramnulosa quinasa
- 7) Ramnosa quinasa
- 8) Ramnosa permeasa
- 9) Propandiol òxido-reductasa
- 10) Lacatldehid deshidrogenasa



reguladora, diferents dels que controlen el sistema de la fuco-
sa (104). Aquests autors es basen en el diferent comportament
en quant a la inducció de la lactaldehyd deshidrogenasa res-
pecte els altres enzims implicats en el metabolisme de la fu-
cosa en diverses soques mutants d'E.coli analitzades.

En l'estudi portat a terme per Power, referent a l'or-
ganització genètica i regulació dels gens que componen l'ope-
rò rha, no es descriu la participació del gen de la lactal-
dehyd deshidrogenasa dins aquest sistema.

Quant a la posició de l'esmentat gen dins el cromosoma
d'E.coli. Chakrabarti i col el descriuen prop del sistema fuc
(24). Aquesta localització no concorda amb determinats re-
sultats preliminars que indicarien un gen estructural fora
del sistema fuc, si bé s'ha mapejat prop d'aquest operó una
mutació termosensible que afectaria molt probablement el gen
regulador (veure 3.5.1.5.2). Aquest aspecte serà tractat
amb detall als apartats de resultats i discussió corresponents.

1.3.2. METABOLISME DE L-1,2-PROPANDIOL EN MUTATS D'E.COLI.

E.coli tipus salvatge és incapaç de créixer en medis que
contenen L-1,2-propandiol com a única font de carboni i ener-
gia.

Sridhara i col (151) aïllaren un mutant (la soca 3) a
partir de la soca salvatge, E.coli K-12, seleccionat per la
seva capacitat d'utilitzar L-1,2-propandiol, després de muta-
gènesi amb etilmetansulfonat i posterior reciclatge (més de
10 generacions) en medis amb D,L-1,2-propandiol. D'aquesta
mescla racèmica, només utilitzava l'isòmer L-, que a concen-

tracions de 20 mM permetia el creixement amb un temps de duplicació de 140 minuts (69), donant un rendiment del cultiu molt similar a l'obtingut en glicerol (151).

Una de les característiques més importants detectades en aquest mutant era la producció constitutiva d'un enzim amb activitat propandiol deshidrogenasa. Aquesta activitat, que semblava essencial en aquest mutant no era present en la soca salvatge (151). Cocks i col identificaren aquest enzim amb la propandiol òxido-reductasa induïble en la soca salvatge pel creixement anaeròbic en fucosa i ramnosa. Encara que, ara ja sabem que la propandiol òxido-reductasa està present en els creixements aeròbics en fucosa, en forma inactiva. Aquesta presència no era detectada pels autors corresponents mitjançant la mesura d'activitat enzimàtica en els extractes cel·lulars.

Per a confirmar la identitat de la propandiol òxido-reductasa i l'enzim amb activitat propandiol deshidrogenasa del mutant, Cocks i col es guiaren per un seguit de fets que interrelacionaven la capacitat de produir i d'utilitzar propandiol, tals com que el lactaldehyd era un intermediari del metabolisme de fucosa (57) i de la ramnosa (142) i el fet que, alguns bacteris excreten propandiol durant la fermentació de ramnosa (90). A més, el locus genètic que controla la capacitat d'utilitzar L-propandiol en E.coli és a prop del locus cromosòmic que conté els gens per a la utilització de la fucosa (7).

La propandiol òxido-reductasa, en la soca 3, és constitutiva i en el metabolisme del L-1,2-propandiol catalitza la

reacció d'oxidació de l'esmentat glicol a L-lactaldehid, actuant sobre el grup alcohol primari (a diferència de la glicerol deshidrogenasa d'E.coli que actua sobre el grup hidroxil del carboni 2).

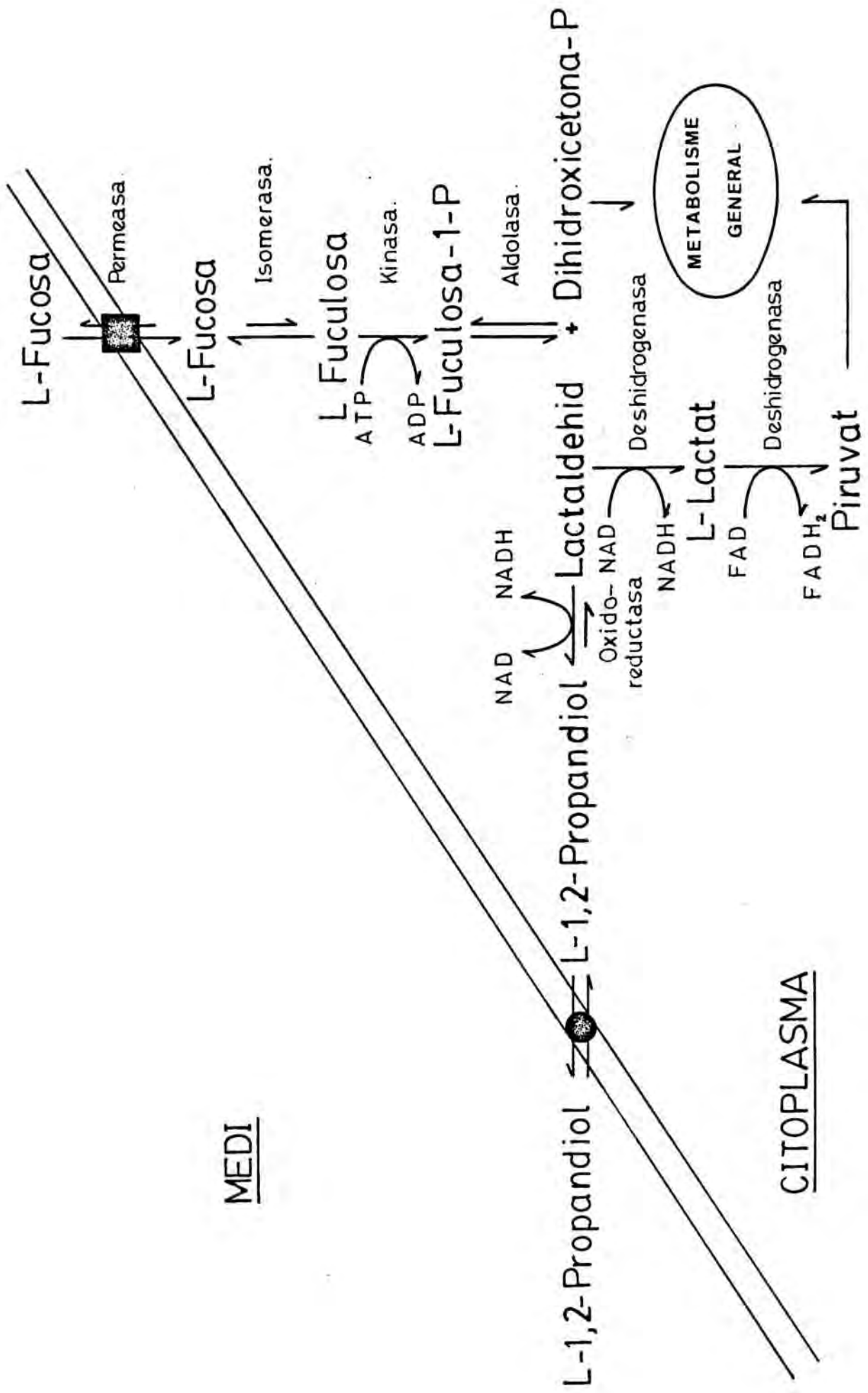
El L-lactaldehid format és oxidat a lactat mitjançant l'acció de la lactaldehyd deshidrogenasa induïda pel creixement en L-1,2-propandiòl (150), el mateix enzim descrit en el metabolisme aeròbic de la fucosa i la ramnosa. El lactat indueix una lactat deshidrogenasa que el transforma en piruvat, compost que pot ésser introduït en el metabolisme general (32).

Com es pot veure, hi ha una estreta relació entre la via de degradació del L-1,2-propandiòl en la soca 3 i la via d'utilització de la L-fucosa en la soca tipus salvatge. La ruta desenvolupada en el mutant per a la utilització d'un nou compost (el propandiòl) és un cas d'inversió de la direcció normal d'una ruta metabòlica establerta, la del metabolisme anaeròbic de la L-fucosa i la L-ramnosa, en front d'unes noves condicions externes (figura 4).

Sridhara i Wu demostraren la implicació directa de la lactaldehyd deshidrogenasa en el metabolisme del L-1,2-propandiòl (150). Aquests autors descriuen que l'enzim és sintetitzat semi-constitutivament en la soca tipus salvatge (la soca 1) i en la soca 3. Van comprovar que mutants seleccionats per la seva incapacitat de créixer en plaques que contenien discs impregnats de lactaldehyd , per tant eren deficients en l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa, eren també incapaços de

FIGURA 4. METABOLISME DEL L-1,2-PROPANDIOL I LA SEVA
RELACIÓ AMB EL METABOLISME DE LA L-FUCOSA
EN E. COLI.

MEDI



CITOPLASMA

de créixer en L-1,2-propandiol, malgrat tenir nivells constitutius de propandiol òxido-reductasa (la soca 40). Per una altra part, l'estudi de la radioactivitat incorporada per diverses soques d'E.coli a partir de D,L-1,2-propandiol marcat amb ^{14}C , demostrà que només incorporaven radioactivitat, les soques propandiol positives. La soca 40 no utilitzava el substrat radiactiu, malgrat tenir propandiol òxido-reductasa constitutiva.

1.3.3. METABOLISME DE L'ETILENGLICOL EN MUTANTS D'E.COLI.

E.coli K-12 tipus salvatge és incapaç d'utilitzar etilenglicol com a única font de carboni i energia. Malgrat tot, diverses espècies bacterianes ho poden fer (28,59,81,156) per oxidacions succesives a glicolaldehid i glicolat.

Donat que no havia estat possible l'obtenció de mutants, a partir de la soca salvatge, capaços de créixer en etilenglicol, fins i tot després de forta mutagènesi (16), es va creure d'interès desenvolupar un model d'evolució experimental per a l'estudi de l'adquisició d'aquesta nova capacitat metabòlica en E.coli, semblant al descrit per a la utilització del L-1,2-propandiol en el mateix microorganisme (14,70,151).

L'evolució experimental d'enzims és un dels mètodes per a determinar els mecanismes moleculars involucrats en l'evolució de vies metabòliques en microorganismes. Es sotmet una població microbiana a una forta pressió selectiva, i els mutants obtinguts són caracteritzats genèticament i bioquímicament (31).

En el cas de la utilització de l'etilenglicol per E.coli, es partí de la soca G3, mutant capaç de créixer en L-1,2-propandiol com a única font de carboni i energia, derivat de la soca 3 i seleccionat per la seva capacitat d'utilitzar glicolat. S'aprofità el fet que aquest mutant produïa alts nivells constitutius de propandiol òxido-reductasa (a l'igual que la soca 3), enzim que era capaç, també, d'usar com a substrat l'etilenglicol, transformant-lo en glicolaldehid. D'aquesta manera, una mutació que afectés a la producció d'una activitat enzimàtica capaç de convertir el glicolaldehid en glicolat permetria ja la utilització de l'etilenglicol (figura 5).

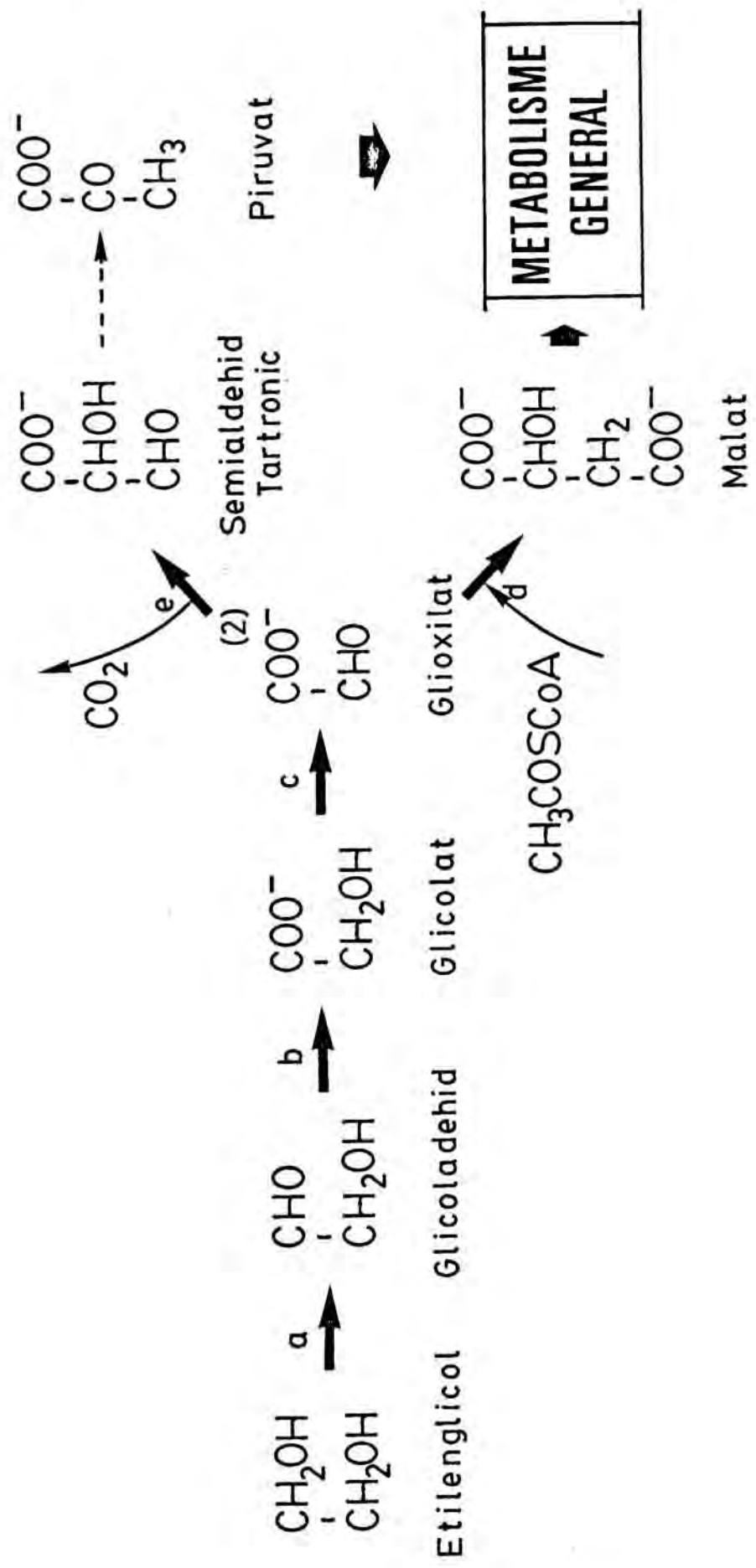
Així, a partir de la soca G3 i per mutació espontània, s'aïllà, pel seu millor creixement en etilenglicol, un mutant, la soca EG3 (16) ara anomenada JA-102. Aquest mutant presenta un temps de duplicació en etilenglicol 50 mM de 390 minuts i el rendiment del cultiu en medis que contenen un 0,2% de la font de carboni és de 10^9 cèl.lules bacterianes per mil.lilitre.

La via d'utilització de l'etilenglicol en la soca JA-102 s'indica a la figura 5.

L'entrada de l'etilenglicol dins la cèl.lula és probablement per difusió, car està descrit que aquest tipus de poliols de cadena curta són capaços d'atravessar la membrana cel.lular sense necessitat de sistemes de transport específics (102). Si bé, el L-1,2-propandiol sembla tenir un transportador de membrana que actuaria a baixes concentracions d'aquest glicol en el medi (70).

FIGURA 5. METABOLISME DE L'ETILENGLICOL EN MUTANTS
D'E.COLI.

- a) Propandiol òxid-reductasa
- b) "Glicolaldehid deshidrogenasa"
- c) Glicolat oxidasa
- d) malat sintasa
- e) glioxilat carboxil·ligasa



El proper pas, l'oxidació de l'etilenglicol a glicolaldehid està catalitzada per l'enzim propandiol òxido-reductasa, descrit ja en el metabolisme del L-1,2-propandiol i en la fermentació de fucosa i ramnosa. Es coneixia ja, que la propandiol òxido-reductasa presentava activitat creuada sobre l'etilenglicol (12) i, donat que aquest enzim actua sobre el grup alcohol primari (151), era lògic pensar que transformaria l'etilenglicol en glicolaldehid. L'evidència que l'oxidació de l'etilenglicol era funció de la propandiol òxido-reductasa, i no d'un altre enzim, s'obtingué per l'anàlisi de les activitats enzimàtiques i per transducció, comprovant que, en la soca JA-102, la recuperació de la capacitat d'utilitzar fucosa era concomitant amb la pèrdua de la capacitat de créixer en etilenglicol, a l'igual que succeix en la soca 3 amb la utilització de 1,2-propandiol.

El següent pas en el metabolisme de l'etilenglicol és l'oxidació del glicolaldehid format a glicolat, catalitzat per un enzim anomenat pels autors "glicolaldehid deshidrogenasa" (16), el qual serà comentat més endavant degut a la importància que té en aquest treball.

L'oxidació de glicolat a glioxilat es realitza mitjançant l'acció d'una glicolat oxidasa lligada a FAD. Aquest enzim és induïble pel creixement d'E.coli en glicolat (55,120). Endemés, en una espècie de Flavobacterium es descriu una glicolat oxidasa induïble, no sols pel creixement en glicolat, sinó també en etilenglicol (28). La reducció de glioxilat a glicolat està catalitzada per una glioxalat reductasa depenent de

NADP⁺.

Com es mostra a la figura 5, a nivell de glioxilat, la via metabòlica presenta un punt de divergència, donat que aquest compost participa en dues reaccions de condensació diferents : a) La reacció catalitzada per l'enzim malat sintasa, en la qual a partir d'una molècula de glioxilat i una d'acetil-CoA es forma una de malat (179) i b) La condensació de dues molècules de glioxilat per a donar semialdehid tartrònic i CO₂, catalitzada per l'enzim glioxilat carboxil·ligasa (96). Aquesta reacció és el primer pas de la via del D-glicerat, que condueix a la síntesi de glicerat-3-fosfat. Tant el glicerat-3-fosfat, com el malat, són intermediaris que poden entrar en el metabolisme central, incorporant-se a la glicòlisi i al cicle de Krebs respectivament.

Per tant, mercès a l'esmentada seqüència de reaccions, un compost de dos àtoms de carboni com l'etilenglicol és capaç de suplir les necessitats tant energètiques, com de síntesi de components cel·lulars i permetre el creixement de mutants d'E.coli K-12 en etilenglicol com a única font de carboni i energia.

1.3.3.1. ORIGEN DE L'ACTIVITAT GLICOLALDEHID DESHIDROGENASA.

L'origen de l'enzim responsable de l'oxidació del glicolaldehid a glicolat en el metabolisme de l'etilenglicol en soques mutants d'E.coli era desconegut en un principi. El que era evident és que la soca 1 (tipus salvatge) presentava ja nivells d'activitat glicolaldehid deshidrogenasa, els

quals augmentaven en la selecció pel caracter etilenglicol positiu (16).

Hi havia varies hipòtesis :

- Que la glicolaldehid deshidrogenasa involucrada en el metabolisme de l'etilenglicol fós la glicolaldehid deshidrogenasa lligada a NADP^+ descrita en la biosíntesi de la vitamina B6 en E.coli B (112,164) (veure 3.8.3)

- Que fós alguna aldehid deshidrogenasa d'àmplia especificitat. Aquests enzims estan àmpliament distribuïts en diferents espècies, si bé no n'hi ha cap de descrita a E.coli.

- Que fós funció de l'enzim lactaldehid deshidrogenasa d'E.coli descrit en el metabolisme aeròbic del 1,2-propandiòl (150), ramnosa i fucosa. Ja anteriorment, Leblanc i Mortlock (101), en l'estudi del metabolisme de la D-arabinosa per inducció dels enzims de la L-fucosa en mutants d'E.coli, descriuen una activitat glicolaldehid deshidrogenasa que oxidava el glicolaldehid, format per acció de la fuculosa-1-fosfat aldolasa sobre la D-ribulosa-1-fosfat, a glicolat. Aquests autors postulaven que l'enzim responsable d'aquesta activitat podria ésser la lactaldehid deshidrogenasa descrita per Sridhara i Wu (150).

L'enzim lactaldehid deshidrogenasa d'E.coli presenta activitat sobre els α -hidroxialdehids, entre els que s'inclou el glicolaldehid (veure 3.3.3.7). Aquest resultat, dona suport a aquesta darrera hipòtesi, si bé Sridhara i Wu presentaven a la lactaldehid deshidrogenasa com a un enzim altament específic pel L-lactaldehid.

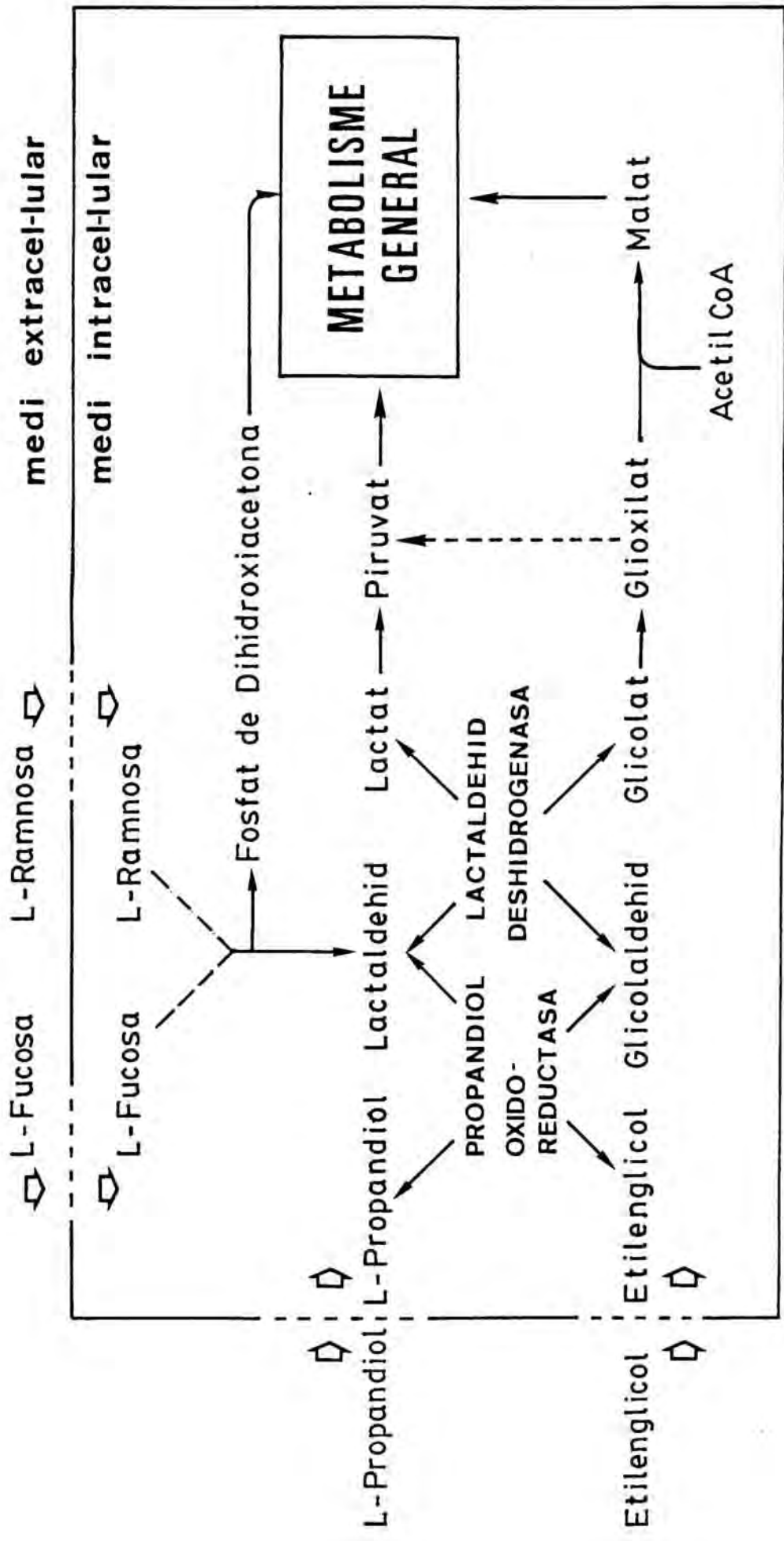
Les propietats descrites per a lactaldehyd deshidrogenasa de la soca 3 (150) i per a la glicolaldehyd deshidrogenasa de la soca JA-102 (19) són diferents en determinats aspectes, encara que cal remarcar que les comparacions no són del tot correctes si tenim en compte que les condicions d'assaig i el grau de puresa de les preparacions enzimàtiques emprades eren diferents (veure 1.2.3.1 i 1.2.3.2).

Seguint l'esquema de la darrera hipòtesi, la via de degradació de l'etilenglicol utilitzaria els mateixos enzims de la via metabòlica del L-1,2-propandiol de la soca progenitora, presentant-se un model molt interessant d'evolució. A la figura 6 es presenten les dues vies d'utilització dels glicols esmentats, el 1,2-propandiol i l'etilenglicol i la seva interrelació, conjuntament amb les de la fucosa i ramnosa.

1.3.4. METABOLISME DEL METILGLIOXAL. (33,34,92)

El metilglixal (2-oxopropanal) és un intermediari, que pot ésser format a partir de diversos metabòlits. Una característica important és el seu potent efecte citotòxic, inhibint la síntesi de proteïnes. Com a conseqüència d'aquest primer punt d'atac, queda també aturada la síntesi de DNA i de RNA. El mecanisme d'inhibició de la síntesi proteica sembla ésser per interacció amb el ribosoma. El grau d'inhibició aconseguit pel metilglixal depèn de la concentració usada, així com de la densitat del cultiu i temps d'addició de l'aldehyd al medi.

FIGURA 6. INTERRELACIÓ ENTRE ELS METABOLISMES DE LA
L-FUCOSA, L-RAMNOSA, L-1,2-PROPANDIOL I
ETILENGLICOL EN E.COLI.



Aquesta variació en la quantitat de metilglixal necessària per a produir la inhibició d'un cultiu bacterià està relacionada amb la capacitat cel·lular de desintoxicar aquest compost, mitjançant sistemes enzimàtics. Degut a l'elevada toxicitat del metilglixal, no és sorprenent el fet que els organismes hagin desenvolupat mecanismes de regulació de la concentració de l'esmentat aldehyd.

Fa aproximadament 50 anys, que el metilglixal era considerat un intermediari important en la via de la glucòlisi en animals, plantes i microorganismes, si bé des d'aleshores s'han produït diverses controvèrsies sobre la formació enzimàtica del metilglixal a partir de la glucosa, així com la descripció de la seva formació a partir d'altres fonts de carboni (74). Actualment, es té una visió més clara de quins són els mecanismes enzimàtics que porten a la formació de metilglixal i de les reaccions que l'utilitzen. Aquests aspectes seran considerats de manera general, remarcant més aquells que estarien relacionats amb el conjunt del present treball.

- Formació de metilglixal.

1) Està descrita la formació de metilglixal a partir del fosfat de dihidroxiacetona mitjançant una reacció enzimàtica irreversible, catalitzada per la metilglixal sintasa, que es pot esquematitzar de la següent manera :



L'enzim és inhibït pel P_i .

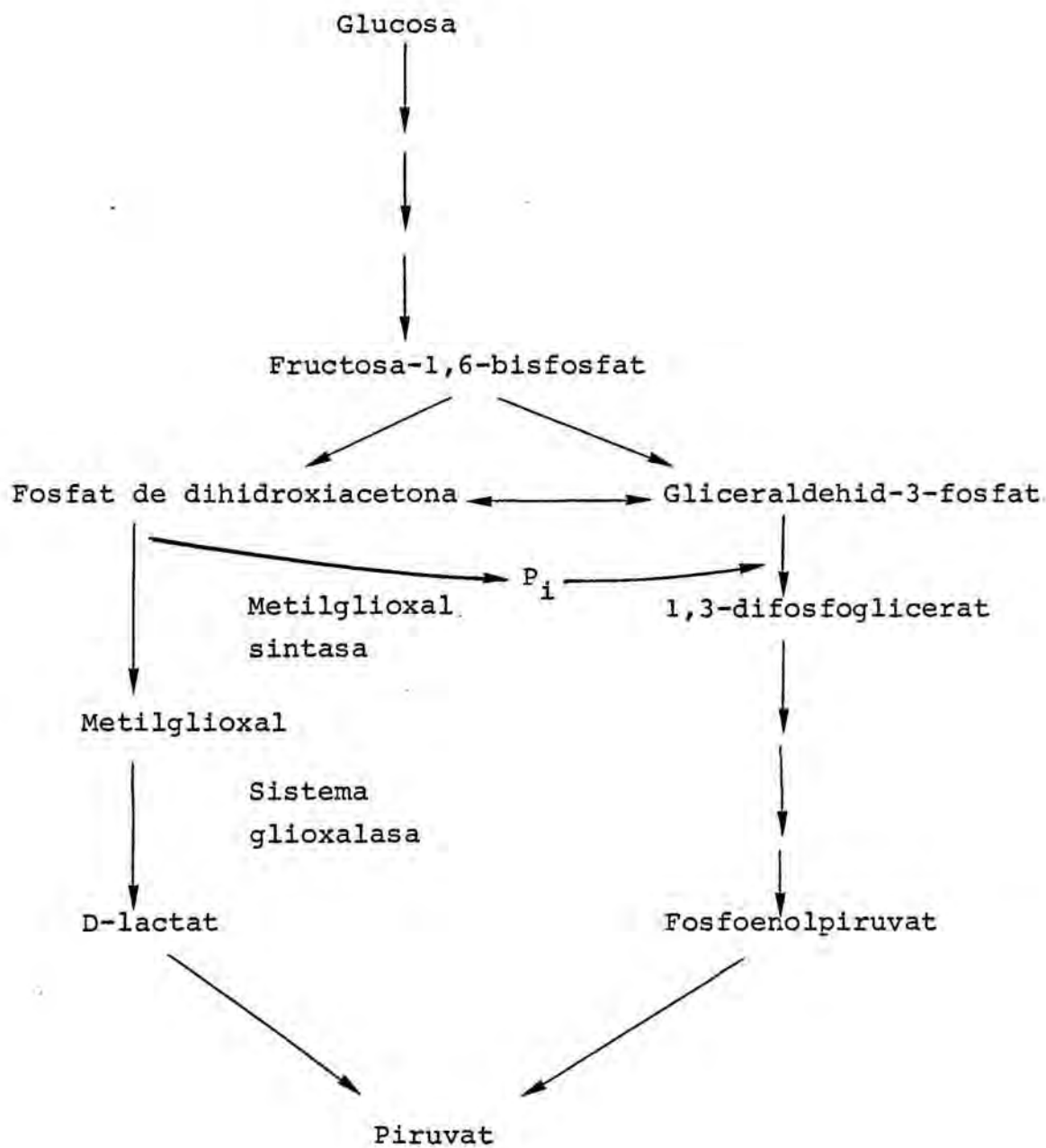
El metilglixal format és transformat en D-lactat per un sistema enzimàtic compost per dos enzims : la glixalasa I i la glixalasa II, present en molts microorganismes, en els quals s'inclou E.coli. Donada l'existència de D- i L-lactat deshidrogenases, el lactat format és transformat en piruvat.

Aquesta seqüència de reaccions a partir del fosfat de dihidroxiacetona i que porten a la formació de piruvat, via metilglixal, constitueix la via anomenada ruta alternativa del metilglixal de la glicòlisi (figura 7).

És molt difícil d'avaluar en quin grau aquesta seqüència alternativa és utilitzada en el catabolisme normal. Tots els enzims involucrats són sintetitzats constitutivament, encara que l'estudi realitzat en mutants d'E.coli afectats en diferents punts de la via d'Embden-Meyerhof , revela la incapacitat de suportar creixement en presència de glucosa, tot indicant que la ruta alternativa del metilglixal no és una alternativa normal a la via de la glicòlisi, si bé cal tenir en compte l'efecte inhibitori dels intermediaris glicolítics fosforilats.

Un tipus de mutant glicolític, defectiu en piruvat quinaasa (pyk AF) és capaç de créixer, encara que molt lentament, en maltosa o lactosa. Ambdós sucres a l'ésser catabolitzats produeixen glucosa. En aquestes condicions, es forma metilglixal. No es coneix en quin grau la ruta alternativa del metilglixal seria la responsable d'aquest lent creixement, si bé és una possibilitat.

FIGURA 7. REPRESENTACIÓ ABREVIADA DE LA VIA D'EMBDEN-MEYERHOF AMB LA RUTA ALTERNATIVA DEL METILGLIOXAL.



A més d'aquesta situació esmentada pels mutants pyk AF, es pot detectar la presència de metilglioxal en el medi de cultiu en altres circumstàncies. Així, quan mutants triosafosfat isomerasa negatius creixen en gluconat, o mutants fructosa bisfosfat aldolasa negatius creixen en glicerol, o cèl.lules d'E.coli tipus salvatge creixen en glucosa-6-fosfat, es detecta metilglioxal en el medi, a una concentració entre 0,1-0,2 mM, indicant la formació d'aquest aldehyd a partir del fosfat de dihidroxiacetona.

2) Es va descriure la formació de metilglioxal a partir del gliceraldehyd-3-fosfat, si bé no s'ha aprofundit posteriorment en aquest aspecte. Sembla que la formació a partir de gliceraldehyd-3-fosfat detectada en extractes crus d'E.coli seria conseqüència de la presència de triosafosfat isomerasa que transformaria aquest compost en fosfat de dihidroxiacetona, el qual és substrat de la metilglioxal sintasa. Aquesta hipòtesi ve confirmada per la manca de producció del metilglioxal a partir de gliceraldehyd-3-fosfat en extractes crus de mutants d'E.coli defectius en l'activitat triosafosfat isomerasa.

3) També està descrita la producció de metilglioxal a partir de reaccions no relacionades amb la degradació de la glucosa. Així, hi ha referències d'un enzim capaç de formar metilglioxal a partir d'acetol (1-hidroxiacetona), el qual és un intermediari en el catabolisme de l'isopropanol i de l'acetona.

Aquest enzim anomenat acetol deshidrogenasa usa NAD^+ com a co-factor i és induït pel creixement en acetona. En mamífers, aquest enzim s'anomena acetol monooxigenasa i utilitza NADP^+ (5).

4) S'ha descrit la formació de metilglioxal a partir d'aminacetona en Pseudomonas sp (74) i en Bacillus sp (173) com a conseqüència de la degradació de l'aminopropanol en el primer cas, i de la treonina i aminopropanol en el segon. L'enzim implicat és l'aminacetona amino transferasa.

Si bé E.coli és capaç de transformar aminopropanol en aminoacetona (106, 169, 170) no pot créixer en medis que contenen aminopropanol com a única font de carboni i nitrogen, tot indicant que l'aminacetona no és desaminada i s'acumula en el medi (170).

- Reaccions que utilitzen metilglioxal.

El metilglioxal pot ésser transformat en D-lactat o piruvat. En tots dos casos, sembla que el substrat inicial és la forma hidratada del metilglioxal, ja que està descrit que és aquesta forma la predominant en els α -cetoaldehids ($\text{CH}_3\text{-CO-CH(OH)}_2$).

La formació de D-lactat és conseqüència de l'actuació del sistema glioxalasa, mentre que el piruvat és produït per l'acció de la metilglioxal deshidrogenasa (E.C.1.1.1) o també possiblement per la formaldehid deshidrogenasa (E.C.1.2.1.1).

1) Sistema glioxalasa :

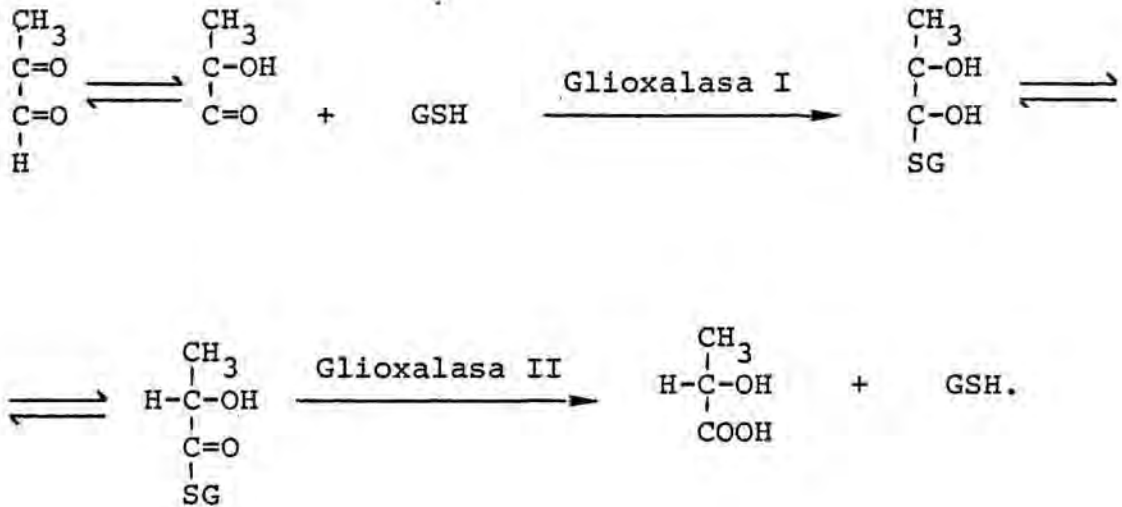
Aquest sistema fou descobert fa aproximadament 70 anys i

està ampliamet distribuït (animals, plantes i microorganismes).

Consta de dos enzims separats anomenats glioxalasa I (metilglioxalasa S-lactilglutation, E.C.4.4.1.5) i la glioxalasa II (hidrolasa S-2-hidroxiacilglutation, E.C.3.1.2.6). L'actuació consecutiva d'ambdós enzims transforma el metilglioxal en D-lactat, intervenint el glutacion com a coenzim. El mecanisme de reacció és atípic donat que el metilglioxal i el glutacion es combinen en una reacció no enzimàtica per a donar un conjugat, molt probablement un hemimercaptal, que és el veritable substrat de la glioxalasa I. El producte de la reacció catalitzada per aquest primer enzim és el S-lactilglutation en la forma enèlica. Aquest enzim presenta una àmplia especificitat de substrat sobre els α -cetoaldehids. Mutants d'E.coli, seleccionats per la utilització ràpida de metilglioxal exògen, mostren nivells d'activitat glioxalasa I de 6 a 10 vegades més elevats que la soca salvatge, mentre que l'activitat glioxalasa II roman inalterada, tot indicant que tots dos enzims no formen part de la mateixa unitat transcripcional.

La glioxalasa II catalitza la hidròlisi del S-lactilglutation (en forma cetònica) per a donar D-lactat i glutacion.

La reacció global es pot esquematitzar de la següent manera :



Estudis portats a terme en E.coli, per incubació de cèl.lules senceres amb metilglioxal 5 mM, van donar suport al paper fisiològic del sistema glioxalasa, observant-se una conversió quantitativa del metilglioxal a D-lactat. Així sembla que el sistema glioxalasa és l'únic responsable del catabolisme del metilglioxal en E.coli. Però tanmateix, quan l'estudi es realitzà en extractes cel.lulars, la taxa d'utilització del metilglioxal era només un 25% de l'observada en cèl.lules senceres (34).

2) Metilglioxal deshidrogenasa o α -cetoaldehid deshidrogenasa :

Durant molt temps es va creure que la transformació del metilglioxal en D-lactat era l'única via metabòlica d'aquest compost. Malgrat tot, aquest procés era ineficient per a aquells organismes capaços d'oxidar només la forma L- del lactat.

Així, Monder va aïllar una α -cetoaldehyd deshidrogenasa de teixit de mamífer que catalitzava, directament, l'oxidació de metilglixal a piruvat de manera irreversible. L'enzim no requeria glutatión i presentava activitat sobre altres α -cetoaldehyds com el glixal, fenilglixal i l'hidroxi-piruvic aldehyd. També descriu l'existència de dues formes enzimàtiques, una activa amb NAD^+ , l'altra amb NADP^+ (109).

Un enzim d'aquest tipus, també està descrit en microorganismes. Així, Higgins i Turner reporten la seva presència en Pseudomonas sp després del creixement en aminoacetona (74). La K_m pel metilglixal era baixa, i si bé semblava un enzim induïble, la seva activitat era molt baixa. En aquest cas particular, els enzims del sistema glixalasa es trobaven en uns nivells 30 vegades superiors.

Una situació quelcom diferent és la que presenten certs microorganismes Gram-positius quan creixen en acetona o isopropanol, donat que no tenen activitat glixalasa, però si una elevada activitat metilglixal deshidrogenasa. Aquest enzim usa NAD^+ com a cofactor i és induït pel creixement en acetona. Els resultats obtinguts pels autors corresponents semblaven indicar que la única transformació del metilglixal en aquests organismes era l'oxidació directa a piruvat.

No hi ha descrita cap activitat d'aquesta mena en E.coli, si bé l'enzim que presentem en aquest treball té activitat sobre metilglixal i donat el tipus de reacció que catalitza, és d'esperar que el producte sigui el piruvat.

3) Formaldehid deshidrogenasa :

No està clar el paper d'aquest enzim en el metabolisme del metilglixal, encara que la formaldehid deshidrogenasa pot usar metilglixal com a substrat.

L'enzim de llevat i d'altres fonts necessita glutation i es creu que és actiu sobre el conjugat format entre el formaldehid i el glutation. D'aquesta manera es formaria formilglutination, el qual seria hidrolitzat per la S-formilglutination hidrolasa (E.C.3.1.2.12) per a donar format i glutation en una reacció semblant a la descrita per a la glixalasa II. En el cas del metilglixal, el conjugat metilglixal-glutination passaria a piruvilglutination. La hidròlisi d'aquest compost donaria piruvat i glutation. Malgrat tot, sembla ésser que la S-formilglutination hidrolasa no té activitat sobre el piruvilglutination, motiu pel qual, la implicació de la formaldehid deshidrogenasa en el metabolisme del metilglixal es posa en dubte.

La natura citotòxica del metilglixal suggereix que les cèl.lules han de mantenir la concentració d'aquest aldehid sota un estricte control. Si es produïa a una velocitat més gran que la de la seva utilització, el compost s'acumularia dins la cèl.lula i en el medi de cultiu provocant, molt probablement, la inhibició del creixement.

Hi ha descrit un mecanisme de control de la formació del metilglixal a nivell de la metilglixal sintasa, però no s'ha reportat res respecte la regulació dels sistemes d'utilització de l'esmentat aldehid. De manera que, si els controls normals deixen d'operar, com a conseqüència de mutacions o d'alteracions

fisiològiques, les cèl.lules poden produir un excés de metilglixal capaç de matar-les. Així, està descrita una superproducció de metilglixal per increment en els nivells d'AMP-cíclic amb sucres que no són transportats pel sistema fosfotransferasa.

El paper fisiològic del metilglixal no està clar encara, si bé es proposen diverses funcions :

- Actuació en el des-acoblament entre el catabolisme i l'anabolisme. En aquest context, la metilglixal sintasa seria una alternativa a la reacció catalitzada per la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa en el catabolisme de les triosafosfat. Les condicions necessàries per a activar a la metilglixal sintasa són una elevada concentració de fosfat de dihidroxiacetona i una baixa concentració de P_i . Així, a l'entorn natural d'E. coli, el P_i no sempre està disponible. L'absència de P_i bloqueja la reacció catalitzada per la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa, aturant la glicòlisi. Aleshores, el catabolisme del fosfat de dihidroxiacetona a través de la metilglixal sintasa, produeix el P_i necessari per a l'actuació de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa, possibilitant així el catabolisme de la glucosa.

En aquest sentit, cal esmentar també, el paper de la via alternativa del metilglixal com a un mecanisme de desacoblament energètic (157). Així, Streetkstra i col descriuen l'existència de dos mecanismes de desacoblament energètic en cultius continus (en quimiostat) de Klebsiella aerogenes creixent en glicerol anaeròbicament. El primer mecanisme estaria associat amb la fer-

mentació del glicerol a 1,3-propandiol. Aquest procés no implica l'ATP directament, però facilita l'entrada de glicerol i el catabolisme. El segon mecanisme seria la via alternativa del metilglixal . Sembla ésser que aquesta via es dispara quan cultius limitats de glicerol són transitòriament alliberats de la seva limitació. En aquestes condicions, la via alternativa del metilglixal permet la fermentació del glicerol, sense un increment concomitant en la generació d'ATP.

La utilització d'aquestes dues vies, conjuntament amb la glicòlisi, permet a les cèl.lules ajustar la relació entre el catabolisme del glicerol i la producció d'ATP, segons les circumstàncies.

- Una altra alternativa pel metilglixal és la d'ésser un precursor del D-lactat, que en condicions aeròbiques pot donar energia a la membrana cel.lular d'E.coli, permetent així, el transport de determinats sucres i aminoàcids. En aquest sentit, és interessant remarcar que, el sistema glixalasa està situat a l'espai periplàsmic , de manera que la formació de D-lactat té lloc a fora de la membrana citoplasmàtica.

- L'acció inhibitoria del metilglixal suggereix un altre possible paper com a regulador del creixement, ja sigui del propi organisme productor, com d'altres cèl.lules que entren en contacte amb el metilglixal.

1.3.5. METABOLISME DEL GLUTAMAT.

Com es presentarà més endavant en aquest treball, l'enzim lactaldehid deshidrogenasa és induït pel creixement d'E.coli en presència de glutamat i glutamina. Si bé no sabem quin seria el mecanisme responsable d'aquesta inducció, intentarem presentar una visió general de les rutes metabòliques que utilitzen glutamat, així com de la posició del glutamat en el catabolisme d'alguns aminoàcids.

En general, les rutes catabòliques dels aminoàcids són normalment llargues i complexes, amb molts intermediaris. Molts d'aquests compostos formats durant l'oxidació dels aminoàcids tenen altres funcions dins la cèl.lula, particularment com a precursors essencials de diferents components cel.lulars. Així, resulta que les rutes catabòliques dels aminoàcids són multifuncionals i d'elles deriven moltes branques i rutes colaterals.

D'aquesta manera, en alguna de les fases del catabolisme d'almenys 11 aminoàcids, el grup α -amino és transferit enzimàticament al carboni α d'un dels tres oxoàcids diferents, el piruvat, el α -oxoglutarat i l'oxalacetat. Així, té lloc l'aminació del α -oxoàcid acceptor per a formar el α -aminoàcid anàlog.

La reacció es pot esquematitzar de la següent manera :



El α -oxoàcid corresponent al glutamat és el α -oxoglutarat i l'enzim que catalitza aquesta reacció de transaminació és

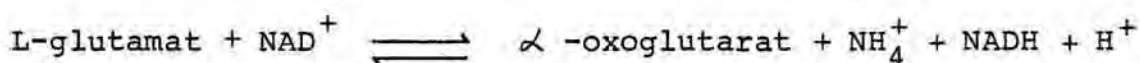
glutàmic-oxalacètic transaminasa.

La reacció es reversible, de manera que a partir de glutamat es forma α -cetoglutarat, el qual entra directament en el cicle dels àcids tricarbòxílics.

El α -oxoglutarat és l'acceptor final dels grups amino de la major part d'aminoàcids, canalitzant així, els grups amino cap a una seqüència final de reaccions a través de les quals es formen els productes nitrogenats finals.

El glutamat pot ésser utilitzat per a diverses funcions dins la cèl.lula :

- En primer lloc, i particularment en bacteris, el L-glutamat experimenta una desaminació oxidativa ràpida, catalitzada per la glutamat deshidrogenasa lligada a piridina :



D'aquesta manera, els grups amino recollits de la resta d'aminoàcids són descarregats en forma de ions NH_4^+ . La L-glutamat deshidrogenasa pot usar també NADP^+ com a acceptor electrònic, el NADPH format actua com a reductor de les reaccions biosintètiques. Aquest enzim és una peça clau en la desaminació dels aminoàcids en molts organismes, sobretot en aquells que excreten amoni, ja que és l'únic aminoàcid que té una deshidrogenasa tant activa i específica.

L'altre producte de la reacció catalitzada per la L-glutamat deshidrogenasa és el α -cetoglutarat, que pot ésser utilitzat en las reaccions de transaminació esmentades anterior-

ment i a la vegada és un intermediari del cicle dels àcids tricarbòxilics, entrant així, el metabolisme general.

- Una altra alternativa per a la utilització del glutamat en la forma D- és la seva participació com a precursor en la formació de la mureina de la pared cel.lular dels bacteris Gram-positius.

- En bacteris i plantes, l'ornitina es forma a partir de l'àcid glutàmic, a través de dues rutes generals. La via principal és la que es mostra a la figura 8. L'etapa final varia segons l'espècie. Així, en E.coli, la N-acetilornitina és hidrolitzada a ornitina i àcid acètic lliure, mentre que en altres microorganismes i plantes segueix un altre tipus de transformació. A la vegada, partir de l'ornitina i a través de varies reaccions enzimàtiques es forma arginina.

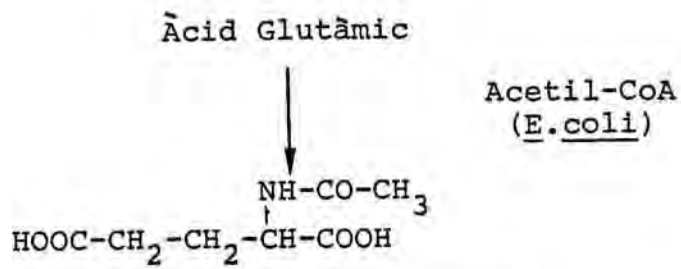
Les rutes biosintètiques de la glutamina i de la prolina parteixen, també, de glutamat. El primer aminoàcid es forma en una sola etapa, catalitzada per la glutamina sintasa. El segon es sintetitza en tres etapes, la primera dels quals és la formació del semialdehid glutàmic.

- El L-glutàmic forma part, també, de l'estructura del glutatión. Aquest últim compost és format per l'addició enzimàtica de la L-cisteïna i la glicina, en aquest ordre, sobre el L-glutàmic.

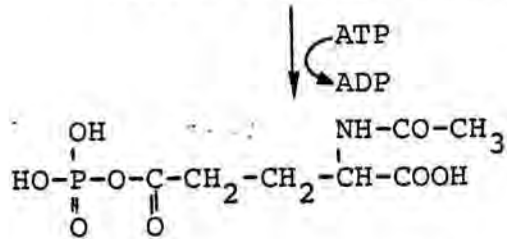
E.coli tipus salvatge no creix en glutamat com a font de carboni i energia. Aquesta incapacitat podria estar relacionada amb la presència, en E.coli, d'una glutamat descarboxilasa que transformaria el glutamat en γ -aminobutirat, compost no metabolitzable.

Una via interessant pel metabolisme del glutamat és la que presenta un mutant d'E.coli capaç de créixer en L-glutamat, aïllat per Vender i col (149). Aquest mutant és deficient en la glutamat descarboxilasa ja esmentada, alhora que presenta uns nivells molt baixos de glutamat deshidrogenasa, però alts nivells d'aspartasa. Això fa pensar en que el glutamat seria metabolitzat per tansaminació amb l'oxalacetat (i no amb el α -cetoglutarat) per a donar apartat, el qual a través de l'aspartasa seria transformat en fumarat, entrant així, en el cicle dels àcids tricarboxilics.

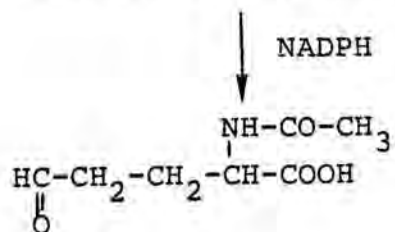
FIGURA 8. RUTA BIOSINTÈTICA DE L'ORNITINA A PARTIR
D'ÀCID GLUTÀMIC A E. COLI



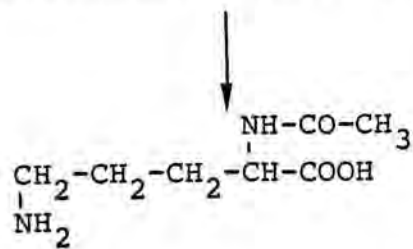
Àcid N-acetilglutàmic



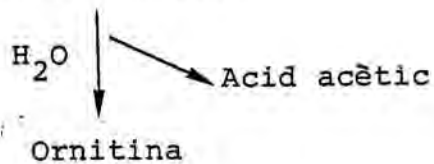
N-acetil- γ -glutamilfosfat



γ -semiladehid-N-acetilglutàmic



N-acetilornitina



1.4. METABOLISME DE FUCOSA I RAMNOSA EN ENTEROBACTERIACEAE : KLEBSIELLA SP I SALMONELLA SP.

Salmonella typhimurium i Klebsiella pneumoniae creixen aeròbicament en L-fucosa (139,153) i en L-ramnosa (117,138) com a única font de carboni i energia.

En el cas de Klebsiella aerogenes, està descrita una via d'utilització de fucosa que consta d'una fucosa isomerasa, una fuculosa quinasa i una fuculosa-1-fosfat aldolasa (153). Una via paral.lela, però específica per a la ramnosa, sembla ésser la responsable, en aquestes cèl.lules, del metabolisme d'aquest altre sucre.

En el cas de Salmonella typhimurium, no hi ha descrita a la literatura cap via d'utilització de fucosa, però sí de ramnosa (1), on aquest sucre és metabolitzat per l'acció seqüencial d'un conjunt d'enzims induïbles, que comprenen la ramnosa isomerasa, la ramnulosa quinasa i la ramnulosa-1-fosfat aldolasa.

Així, la L-fucosa i la L-ramnosa són catabolitzades aeròbicament en Klebsiella sp i en Salmonella sp per vies semblants i paral.leles a les descrites en E.coli (veure 1.3.1).

En E.coli està descrit que per l'acció de l'aldolasa, la molècula fosforilada de 6 àtoms de carboni, provinent del metabolisme tant de la L-fucosa com de la L-ramnosa, és trancada en fosfat de dihidroxiacetona i L-lactaldehid. Aeròbicament, ambdós productes són introduïts al metabolisme general : el fosfat de dihidroxiacetona via glicòlisi, i el L-lactaldehid per oxidació a lactat mitjançant la lactaldehid deshidrogenasa.

Malgrat tot, en cap de les referències bibliogràfiques trobades sobre les vies metabòliques de la L-fucosa i de la L-ramnosa en Klebsiella sp i en Salmonella sp, es descriu la transformació dels productes formats per acció de les aldolases respectives. Així doncs, no s'esmenta cap activitat lactaldehyd deshidrogenasa en aquests bacteris, en relació al metabolisme de tots dos sucres.

Anaeròbicament, Salmonella typhimurium i Klebsiella pneumoniae fermenten ambdós sucres d'idèntica manera que E.coli. El L-lactaldehyd format, en anaeròbiosi és reduït a 1,2-propandiol per una propandiol òxido-reductasa induïble i excretat al medi (8).

Aquest enzim, peça clau en el metabolisme anaeròbic de la fucosa i la ramnosa, ha estat estudiat ampliament en E.coli (13,14,15,132) i comparat des dels punts de vista d'estructura i regulació amb els enzims amb activitat propandiol òxido-reductasa de K.pneumoniae i S.typhimurium (133)

L'anàlisi estructural indicà que els tres enzims presenten el mateix pes molecular, mentre que el punt isoelèctric és lleugerament diferent per a l'enzim de S.typhimurium. Els enzims de K.pneumoniae i E.coli presenten idèntic perfil de bandes en els mapes peptídics monodimensionals, obtinguts per digestió amb diverses proteases. En canvi, l'enzim de S.typhimurium es mostra diferent, llevat de la digestió amb subtilisina, la qual cosa indica que les zones hidrofòbiques de la propandiol òxido-reductasa de les tres espècies han estat conservades al llarg de l'evolució.

L'enzim de K.pneumoniae presenta identitat immunològica amb el d'E.coli, mentre que l'enzim de S.typhimurium presenta, només, identitat parcial.

Des del punt de vista de regulació, les tres espècies indueixen una propandiol òxido-reductasa activa quan creixen anaeròbicament en fucosa i ramnosa. La presència d'aquest enzim, detectada immunològicament, en els creixements aeròbics en tots dos sucres, és diferent segons l'espècie estudiada. Així, en S.typhimurium es sintetitza una propandiol òxido-reductasa inactiva durant el creixement aeròbic en fucosa i ramnosa, la qual és activada d'inmediat pel canvi a condicions anaeròbiques. Una propandiol òxido-reductasa inactiva és també induïda en E.coli en aerobiòsi però només pel creixement en fucosa. Aquest enzim està subjecte a un control de tipus post-transcripcional quan el cultiu esdevé anaeròbic (25). En canvi, K.pneumoniae no indueix cap propandiol òxido-reductasa inactiva en condicions aeròbiques en presència de tots dos sucres. El control, per tant, és sols transcripcional en condicions anaeròbiques.

L'absència de l'enzim propandiol òxido-reductasa en els extractes cel.lulars de S.typhimurium feta créixer aeròbicament en ramnosa i fucosa, pot ésser un fet important en el metabolisme aeròbic de tots dos sucres, com ja s'indicarà a l'apartat de discussió corresponent (veure 4.6).

2. MATERIALS

I MÈTODES

2.1. SOQUES BACTERIANES I FAGS.

S'inclouen en aquest apartat les soques bacterianes utilitzades en la realització del present treball, així com en determinats casos les seves progenitores.

La soca de tipus salvatge utilitzada en aquest treball és un mutant d' Escherichia coli K-12, anomenat E 15 (6) i que designarem com a soca 1.

La soca 3 és un mutant derivat de la soca 1, obtingut per mutagènesi amb etilmetansulfonat i seleccionat per la seva capacitat de créixer en medis amb L-1,2-propandiol com a única font de carboni i energia, degut a la producció constitutiva de l'enzim propandiol òxido-reductasa (151)

La soca 40 és un mutant derivat de la soca 3 per mutagènesi amb N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina i seleccionat per la seva incapacitat de créixer en medis que contenen L-1,2-propandiol com a única font de carboni i energia, degut a la manca d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa (150)

Aquestes soques van ésser cedides gentilmente pel Prof. E.C.C. Lin del Departament de Microbiologia i Genética Molecular de Harvard Medical School, Boston, U.S.A.

La soca G3 és un derivat de la soca 3 (glicolat negativa) per mutació espontània, seleccionat per la seva reversió al fenotip glicolat positiu (16).

La soca JA-102 és un mutant espontàni derivat de la soca G3 i seleccionat per la seva capacitat de créixer en medis amb etilenglicol com a única font de carboni i energia (16).

La soca CBK-230 és un mutant d' E.coli que presenta el següent fenotip relevant : thy, arg H::Tn5.

La soca K-2.2 és un mutant d' E.coli ppc (fosfoenolpiruvat carboxilasa negatiu) amb el següent genotip : arg H, gal K, gal p, his, lac, leu, mal, mgl, hir, hrp, xyl, ppc (95)

Aquestes dues soques, la CBK-230 i la K-2.2, foren cedides pel Prof. H.L. Kornberg, Departament de Bioquímica, Universitat de Cambridge, Cambridge, U.K.

La soca JA-103 és un mutant ppc derivat de la soca 3 per tansducció generalitzada amb el bacteriofag P1 i seleccionat per la seva capacitat de créixer en medis amb propandiol + aspartat i incapacitat de fer-ho en medis amb propandiol sòl.

La soca JA-104, derivada de la soca JA-103, és un mutant temperatura sensible per a la producció de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa. Fou seleccionat per la seva capacitat de créixer en medis que contenen propandiol + acetat a 42 °C.

L'obtenció d'aquestes dues soques s'explicarà amb detall en l'apartat de resultats corresponent.

La soca JA-105 és un mutant derivat de la soca 3 per mutagènesi d'inserció de Tn5 i seleccionat per la seva incapacitat d'utilitzar propandiol en plaques de McConckey + kanamicina + propandiol. La inserció de l'element Tn5 ha afectat a l'expressió de l'enzim propandiol òxido-reductasa.

La soca ET 6016 és un mutant d' E.coli incapaç d'utilitzar ramnosa com a font de carboni i energia com a conseqüència d'una mutació que afecta al gen de la ramnulosa-1-fosfat-aldolasa. Els marcadors cromosòmics són : [ara D139]

$\Delta(\text{arg F-lac})$ 205, flb BS301, pst F25, rel A1, rps L150, $\Delta(\text{gln G i/0 gln L})$ 228, rha-10, deo C1. Aquesta soca va ésser cedida per l' E.coli Genetic Stock Center, Departament de Genètica Humana, School of Medicine, Yale University, New Haven, U.S.A.

En determinats experiments, la soca d' Escherichia coli tipus salvatge utilitzada va ésser la de l' American Type Culture Collection, Rockville Maryland, U.S.A., nº de catàleg ATCC e25404.

La soca de Klebsiella pneumoniae utilitzada en aquest treball fou la de l' ATCC nº 13882.

Així mateix, la soca de Salmonella typhimurium també pertany a la mateixa col.lecció amb el codi nº e23564.

En la Taula 1 es resumeixen les característiques més importants d'aquestes soques en relació amb el present treball.

Les soques es mantenen en tubs o plaques d'Antibiotic medium nº 3 a 0-4°C i es resembraven periòdicament. També es disposava d'aquestes soques en forma congelada en glicerol al 15% (v/v) a -80°C, a fi de poder accedir al fenotip original quan fós necessari.

Els fags utilitzats en aquest treball foren :

- Bacteriofag P1 (en les transduccions generalitzades).
- Bacteriofag λ_{467} : λ b221 cI857 (ts), rec::Tn5, 29(Am) P80 (Am). (en l'obtenció de mutants d'inserció).

TAULA 1

CARACTERISTIQUES DE LES SOQUES UTILITZADES EN AQUEST TREBALL.

Soca	Característiques	Origen
1 (E15)	Fuc ⁺ , Prd ⁻	Cedida per E.C.C.Lin (Harvard Medical School)E.U.A.
3	Fuc ⁻ , Prd ⁺	Derivada de la soca 1 Cedida per E.C.C.Lin
40	Fuc ⁻ , Prd ⁻	Derivada de la soca 3 Cedida per E.C.C.Lin
G3	Fuc ⁻ , Prd ⁺ , Glc ⁺	Derivada de la soca 3 Dpt.Bioquímica, Fac.Farmàcia, U.B.
JA-102	Fuc ⁻ , Prd ⁺ , Glc ⁺ , Etg ⁺	Derivada de la soca G3 Dpt.Bioquímica, Fac.Farmàcia, U.B.
CBK-230	<u>thy</u> , <u>arg</u> ::Tn5	Cedida per H.L.Kornberg Cambridge University, U.K.
K-2.2	<u>argH</u> , <u>galK</u> , <u>galP</u> , <u>his</u> , <u>lac</u> , <u>leu</u> <u>mal</u> , <u>mgl</u> , <u>hir</u> , <u>hrp</u> , <u>xyI</u> , <u>ppc</u>	Cedida per H.L. Kornberg
JA-103	Fuc ⁻ , Prd ⁺ , <u>ppc</u>	Derivada de la soca 3 Dpt.Bioquímica, Fac.Farmàcia, U.B.
JA-104	Fuc ⁻ , Prd ^{ts} , <u>ppc</u>	Derivada de la soca JA-103 Dpt.Bioquímica, Fac.Farmàcia, U.B.

(continuació de la taula 1)

JA-105	<u>fuc::Tn5 (Prd⁻)</u>	Derivada de la soca 3 Dpt. Bioquímica, Fac. Farmàcia, U.B.
ET 6016	[<u>araD139</u>], <u>Δ(argF-lac)205</u> , <u>flbBS301</u> <u>ptsF25</u> , <u>relA1</u> , <u>rpsL150</u> , <u>Δ(glnG i/0</u> <u>glnL)228</u> , <u>rha-10</u> , <u>deoC1</u>	<u>E. coli</u> Genetic Stock Center Yale University, E.U.A.
<u>E. coli</u> ATCC nº e25404	Tipus salvatge	American Type Culture Collection Rockville, Maryland, U.S.A.
<u>Klebsiella pneumoniae</u> ATCC nº 13882	Catalogada anteriorment com a <u>K. aerogenes</u>	American Type Culture Collection
<u>Salmonella typhimurium</u> ATCC nº e23564	LT ₂ tipus salvatge	American Type Culture Collection

2.2. TÈCNiques MICROBIOLÒGIQUES.

2.2.1. CONDICIONS DE CREIXEMENT DELS BACTERIS.

Els medis de cultiu pel creixement dels bacteris estaven compostats per un medi basal mineral, al qual s'hi adicionaven les fonts de carboni corresponents a partir de solucions més concentrades.

La composició del medi basal mineral era :

NaH ₂ PO ₄	34 mM
K ₂ HPO ₄	64 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM
FeSO ₄	10 ⁻³ mM
MgSO ₄	0,3 mM
CaCl ₂	10 ⁻² mM

La solució s'ajustava a pH 7 amb HCl.

Les fonts de carboni s'addicionaven al medi mineral a fi de quedar a una concentració de 60 mM carboni. Així, els medis de glicerol es preparaven a 20 mM; els de succinat a 15 mM; glucosa, fucosa y ramnosa a 10 mM; propandiol a 40 mM, i etilenglicol a 30 mM. En els creixements anaeròbics aquestes concentracions eren el doble.

Els medis aeròbics amb hidrolitzat de caseïna es preparaven al 0,5%, i els anaeròbics al 1% + piruvat 1mM. En determinats moments s'utilitzà com a font de carboni una barreja dels 20 aminoàcids, que s'addicionà al medi mineral al 0,5%.

La proporció de cada aminoàcid dins la barreja total era :

D,L-Alanina	0,290 g/l
L-Arginina	0,365 "
L-Asparragina	0,580 "
L-Aspàrtic	0,145 "
L-Cisteïna	0,073 "

L-Glutàmic	0,440	g/l
Glicina	0,145	"
L-Histidina.HCl	0,110	"
L-Isoleucina	0,365	"
L-Leucina	0,365	"
L-Lisina	0,365	"
L-Metionina	0,145	"
L-Fenilalanina	0,145	"
L-Prolina	0,145	"
L-Serina	0,073	"
L-Treonina	0,290	"
L-Tritòfan	0,073	"
L-Tirosina	0,145	"
L-Valina	0,365	"
L-Glutamina	0,365	"

Pels creixements en medi líquid complet s'utilitzava un medi LB amb la següent composició : 10 g de Triptona, 5 g de NaCl i 10 g d'extracte de llevat per 1 litre d'aigua destil.lada.

Els medis de McConkey usats per a la selecció dels mutants incapaços de créixer en 1,2-propandiol es preparaven de la següent manera :

Peptona	20	g/l
NaCl	2,5	g/l
Roig neutre	0,05	g/l
Cristall violeta	0,001g	/l
Propandiol	40	mM

El creixement dels mutants ppc en fonts de carboni que es metabolitzen a través de piruvat , requeria la presència , en el medi , de glutamat o aspartat a la concentració de 5 mM.

Els medis sòlids contenien agar al 1,5%.

Els creixements aeròbics es realitzaven a 37°C en matrassos d'erlenmeyer plens en un 20% de la seva capacitat amb el medi de cultiu corresponent. S'agitaven vigorosament en agitadors orbitals (250 r.p.m.) ja de calor sec, ja amb bany d'aigua.

Els creixements anaeròbics s'efectuaven a la mateixa temperatura, en ampolles completament plenes de medi de cultiu, no tancant-les hermèticament a fi de permetre la sortida dels gasos quan aquests es produïen per efecte del creixement bacterià. El cultiu s'agitava suaument amb una barra magnètica.

El seguiment de l'augment de la biomassa bacteriana en cultius líquids es va fer mesurant la densitat òptica dels mateixos, a 420 nm pels medis mínims i a 550 nm pel medi LB, en un espectrofotòmetre Beckman DB-GT.

2.2.2. TRANSDUCCIO GENERALITZADA AMB EL BACTERIOFAG P1.

2.2.2.1. PREPARACIÓ DEL LISAT DEL BACTERIOFAG P1.

Es preparaven dilucions del lisat original de P1 fins 10^5 , 10^6 , 10^7 , pfu/ml en LB + CaCl_2 5 mM. A continuació, 0,1 ml de cada una d'aquestes dilucions s'afegien a alíquotes de 0,2 ml d'un cultiu d'una nit de la soca donadora en LB + CaCl_2 5mM i es mantenia així durant 20 minuts a 37°C. Seguidament, s'addicionaven a 3 ml d'agar tou LB + CaCl_2 5 mM atemperat a 45°C i es distribuïen en plaques de LB + CaCl_2 5mM, incubant-les a 37°C fins a obtenir lisi confluent en alguna de

les dilucions (de 6-8 hores). A cada placa s'addicionaven 5 ml de LB + CaCl₂ 5 mM i es deixaven a 40C tota la nit. Després es recollia el sobrenadant amb una pipeta estèril, s'afegia 5 gotes de cloroform, es remenava vigorosament durant 30 segons i es deixava a temperatura ambient 10 minuts. Tot seguit, es centrifugava i el sobrenadant es decantava en un tub roscat estèril i es guardava a 40C.

2.2.2.2. TITULACIÓ DEL LISAT OBTINGUT.

A 3 ml d'agar tou LB + CaCl₂ 5 mM líquid s'afegien 0,2 ml d'un cultiu de la soca 1 en plena fase exponencial i 0,1 ml d'una dilució del lisat obtingut. Les dilucions utilitzades estaven compreses entre 10⁻² i 10⁻¹⁰. Aquestes barrejaes s'extenien pel damunt de plaques de LB + CaCl₂ 5 mM i s'incubaven tota la nit. A partir del nombre de plaques de lisi observades es podia calcular el títol del lisat .

2.2.2.3. TRANSDUCCIÓ AMB EL BACTERIOFAG P1.

Es feia créixer la soca receptora tota la nit en un medi ric LB + CaCl₂ 5 mM. El cultiu es centrifugava i les cèl·lules es resuspenien en un volum igual a l'original amb Mg₂SO₄ 100mM + CaCl₂ 5 mM. S'incubava a 37 0C durant 15 minuts amb agitació. A continuació, al·iquotes de 0,1 ml d'aquesta suspensió cel·lular eren dipositades en 5 tubs estèrils i infectades amb 0,1 ml de diferents dilucions del lisat de P1 (dilucions 1, 10⁻¹, 10⁻² i 10⁻³). A un dels tubs no s'hi afegia P1 i servia com a control del procés. Tot

seguit, s'incubava a 37°C durant 20 minuts sense agitació. Passat aquest temps, s'addicionava 0,2 ml de citrat sòdic 1 M, el qual actua com a quelant dels ions Ca^{2+} , necessaris per a la viabilitat del bacteriòfag P1. Seguidament, el contingut dels tubs s'extenia mitjançant un asa de Digrafsky en plaques de selecció incubant-se adientment.

2.2.3. OBTENCIÓ DE MUTANTS PER INSERCIÓ DE Tn5.

Per a l'obtenció de mutants d' E.coli per inserció de Tn5 es seguí el mètode descrit per Davis (39). Es feia créixer la soca desitjada en un medi ric de LB fins a una densitat de 10^9 cèl.lules/ml. Diferents alíquotes del cultiu eren incubades a 37 °C durant 30 minuts amb el fag λ 467, el qual porta insertat el transposó Tn5 en el gen rec. La multiplicitat d'infecció era de 0,5. Passat aquest temps, s'addicionava citrat sòdic 20 mM a fi de quelar el Mg^{2+} necessari per a l'adsorció del fag a la cèl.lula bacteriana.

La selecció dels mutants amb el fenotip desitjat (Prd^-) es feia sembrant alíquotes de les incubacions descrites per tal d'obtenir de 200 a 400 colònies per placa (100 plaques totals). El medi de selecció escollit fou el McConckey addicionat de L-1,2-propandiol 40 mM i kanamicina 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La presència d'aquest antibiòtic en el medi de selecció permetia només el creixement d'aquells bacteris que havien incorporat l'element Tn5. Els mutants incapaços d'utilitzar el propandiol donaven colònies blanques quan creixien en McConckey-propandiol, ja que al no metabolitzar aquest compost no acidificaven el medi.

2.3. PREPARACIÓ D'EXTRACTES CEL·LULARS.

Habitualment, i llevat de certes ocasions que ja s'especificaran, els cultius eren recollits per centrifugació cap el final de la fase exponencial de creixement. Les cèl·lules es resuspenien en solució amortidora fosfat sòdic 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3 i es tornaven a centrifugar. Tot seguit, es resuspenien en la mateixa solució amortidora, en un volum 4 vegades superior al pes humit de les cèl·lules. Fins aquest punt, el procés es realitzava a 0-4°C. A continuació, es procedia a la desintegració ultrasònica de les cèl·lules en suspensió en un sonicador MSE de 150 watts. L'amplitud de l'ona dels ultrasons variava segons el volum de mostra a processar, oscil·lant entre 12 i 24 microns. El temps de sonicació era de 30 segons/ml de suspensió. Durant tot aquest procés les mostres es mantenien a 0-4°C mitjançant un bany de gel i sal a -20°C.

Els extractes així obtinguts es centrifugaven a 30.000 x g durant 30 minuts a 0-4 °C. La fracció sobrenadant l'anomenarem extracte cel·lular.

2.4. TÈCNiques DETERMINATIVES.

2.4.1. DETERMINACIÓ DE PROTEÏNA.

La concentració de proteïna era mesurada pel mètode de Lowry (107) que permet detectar baixes concentracions de proteïna, de l'ordre de 20 a 200 µg/ml.

A 0,2 ml de la mostra protèica s'afegia 1 ml de la següent solució : NaKC_4O_6 1 mM, CuSO_4 0,4 mM, Na_2CO_3 0,2 M i NaOH 0,1 mM. Es deixava 10 minuts a temperatura ambient i s'addicionava, tot mantenint el tub en agitació, 0,1 ml del reactiu fenol segons Folin-ciocalteus. Després de 30 minuts a temperatura ambient, es mesurava l'absorbància del complex colorejat format a 750 nm en un espectrefotòmetre Beckman DB-GT.

La corba de calibració es preparava amb albúmina sèrica bovina.

Totes les dilucions, tant les de les mostres problema, com les de la corba patró es feien amb aigua destil·lada, per tal d'evitar interferències degudes a components de l'amortidor.

2.4.2. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

Totes les determinacions d'activitats enzimàtiques s'han fet mitjançant mètodes espectrofotomètrics. S'han utilitzat semi-microcubetes de 1 ml de capacitat, amb un pas de llum de 1 cm. Les variacions d'absorbància eren enregistrades gràficament i caculades en un espectrefotòmetre termostatitzat de doble feix Shimadzu UV 240.

2.4.2.1. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

Rutinariament, l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa dependent de NAD^+ era determinada a 25°C mesurant la formació de NADH a 340 nm en 1 ml de mescla de reacció que consistia en: solució amortidora glicina- NaOH 100 mM $\text{pH } 9,5$, NAD^+ $2,5\text{ mM}$ i glicolaldehyd 1 mM . La reacció era iniciada per l'addició de la font enzimàtica.

Es defineix una unitat d'activitat enzimàtica com la quantitat d'enzim necessària per a produir $1\ \mu\text{mol}$ de NADH per minut.

Quan l'activitat enzimàtica era determinada en presència d'altres aldehyds com a substrats, les concentracions en l'assaig eren : lactaldehyd $0,1\text{ mM}$; gliceraldehyd $0,5\text{ mM}$; i metilgloxal 2 mM .

En els estudis comparatius de les activitats enzimàtiques glicolaldehyd deshidrogenasa i lactaldehyd deshidrogenasa, aquesta última activitat era mesurada segons una modificació de l'assaig descrit per Sridhara i Wu (150) Es mesurava l'increment d'absorbància a 340 nm degut a la formació de NADH , a 25°C , en 1 ml de mescla de reacció que consistia en : solució amortidora glicina- NaOH 100 mM $\text{pH } 10,5$, glutation 1 mM , NAD^+ $2,5\text{ mM}$ i lactaldehyd $0,1\text{ mM}$. La reacció era iniciada per l'addició de la font enzimàtica.

2.4.2.2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ALDEHID DESHIDROGENASA L·LIGADA A CoA.

L'activitat aldehid deshidrogenasa lligada a coenzim A era mesurada a 28°C segons descriuen Rudolph i col (137). La mescla de reacció, en un volum total de 1ml, contenia : solució amortidora fosfat potàssic 500 mM, pH 7.0, acetaldehid 50 mM, NAD⁺ 0,5 mM, CoA 23 µM, i DTT 10 mM. L'enzim s'incubava a 28°C durant 15 minuts amb solució amortidora, NAD⁺, CoA i DTT. La reacció s'iniciava per l'addició de l'acetaldehid i es mesurava l'increment d'absorbància a 340 nm degut a la formació de NADH.

Es defineix una unitat d'activitat enzimàtica com la quantitat d'enzim necessària per a produir 1 µmol de NADH per minut.

2.4.2.3. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT PROPANDIOL ÒXIDO-REDUCTASA.

L'activitat propandiol òxido-reductasa era determinada espectrofotomètricament a 25°C mesurant la formació de NADH a 340 nm en 1 ml de mescla de reacció que consistia : solució amortidora glicina NaOH 100 mM pH 9.5, D,L-1,2-propandiol 50 mM i NAD⁺ 0.33 mM. La reacció era iniciada amb l'addició de la font enzimàtica. Es defineix una unitat d'activitat enzimàtica com la quantitat d'enzim necessària per a produir 1 µmol de NADH per minut.

2.4.3. DETERMINACIÓ DE 1,2-PROPANDIOL.

Per a la determinació del 1,2-propandiol excretat al medi

com a conseqüència de determinats cultius en ramnosa de diverses soques bacterianes es seguí el mètode colorimètric descrit per Jones i Riddick (85). Aquest mètode està basat en la deshidratació soferta pel 1,2-propandiol en un medi de sulfuric concentrat, donant una barreja d'alcohol alílic i la forma enòlica del propionaldehid. Aquesta mescla forma amb la ninhidrina, en presència de sulfuric concentrat, un complex de color violeta, el qual pot ésser quantificat per mesura de l'absorbància a 595 nm.

De cada cultiu a analitzar, es dipositaven en el fons d'un tub pyrex (160 x 15 mm) 15 i 30 μ l del medi centrifugat i lliure de cèl.lules, diluint fins a 1 ml amb aigua destil.lada. A cada tub s'afegien 5 ml de sulfuric concentrat, s'agitaven amb molta cura i es col.locaven en un bany a 70°C durant 10 minuts. Passat aquest temps, els tubs s'atemperaven a 25°C. S'addicionava 0,2 ml d'una solució aquosa de ninhidrina al 3% i bisulfit sòdic al 5%. Tot seguit, s'incubaven a 25°C durant 1 hora. A continuació, es diluïa el contingut de cada tub fins a 12,5 ml amb àcid sulfuric concentrat. Després de 5 minuts (temps suficient pel desenvolupament del color) es mesurava l'absorbància a 595 nm. El color és estable fins a 30 minuts.

Paral.lelament, es preparava una recta patró amb diferents concentracions de 1,2-propandiol compreses entre 5 i 50 μ g/ml.

2.5. PURIFICACIÓ DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA D' E. COLI.

Per a purificar l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa d'E. coli, les cèl.lules es feien créixer aeròbicament en hidrolitzat de caseïna al 0,5%. Es partia de 6 litres de cultiu i tot el procés de purificació es realitzava a una temperatura de 0-4°C. (20)

2.5.1. PRECIPITACIÓ FRACCIONADA AMB SULFAT AMÒNIC.

Els extractes cel.lulars, obtinguts com s'indica a l'apartat 2.3, eren addicionats de sulfat amònic sòlid per tal de portar-los al 50 % de saturació (42). L'addició es feia molt lentament, tot mantenint l'extracte cel.lular a 0°C (en bany de gel) i en constant agitació. Després, es mantenia en agitació durant 20 minuts i seguidament es centrifugava a 30.000 xg durant 15 minuts.

La fracció sobrenadant, on hi restava l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa, era addicionada novament de sulfat amònic per a portar-la fins al 75 % de saturació i es centrifugava a 30.000 xg durant 15 minuts tot descartant-se la fracció sobrenadant.

La fracció de proteïna precipitada es redissolia en solució amortidora de pH fosfat sòdic 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3, en un volum aproximat de 10 ml.

A continuació i per tal d'eliminar l'excés de sulfat amònic, la mostra protèica era dialitzada durant una nit en front de 50 volums de solució fosfat sòdic 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3.

2.5.2. CROMATOGRAFIA DE BESCOANVI IÒNIC EN DEAE-SEPHADEX.

La fracció anterior, ja dialitzada, era introduïda en una columna de DEAE-sephadex (3 x 12 cm) equilibrada amb solució amortidora de pH fosfat sòdic 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3. Seguidament, es rentava la columna amb la mateixa solució fins que ja no eluia proteïna. Tot seguit, s'aplicava un gradient lineal de NaCl entre 0 i 500 mM, en 500 ml de la mateixa solució amortidora. El flux d'equilibració, rentat i elució va ésser de $8,5 \text{ ml} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$. En les fraccions col·lectades (8 ml) s'hi assajava l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa, la qual eluia a una concentració de NaCl d'aproximadament 260 mM.

Les fraccions més actives eren mesclades i concentrades per ultrafiltració fins a un volum aproximat de 3-4 ml, en un concentrador Amicon, emprant una membrana del tipus PM-10.

A continuació, la solució de proteïna era dialitzada exhaustivament en front de solució amortidora fosfat sòdic 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3, per tal d'eliminar el NaCl provinent del gradient i que podria interferir en el proper pas de purificació.

2.5.3. CROMATOGRAFIA D'AFINITAT EN AGAROSA-NAD.

En aquesta cromatografia d'afinitat s'emprà una columna amb una matriu d'agarosa que porta NAD^+ acoblat mitjançant una cadena de sis àtoms de carboni.

Així doncs, la fracció anterior, ja dialitzada, era introduïda en una columna d'agarosa-NAD de 2 x 2 cm, equilibrada amb solució amortidora fosfat sòdic 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3. A continuació, es rentava la columna amb la mateixa solució amortidora de pH, fins que ja no eluia proteïna. Tot seguit, s'aplicava un gradient lineal de NAD^+ entre 0 i 20 mM, en 30 ml del mateix amortidor, ajustat novament a 7.3. El flux d'equilibració, rentat i elució va ésser de $4,8 \text{ ml} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$. En les fraccions col·lectades (2 ml) s'assajava l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa, la qual eluia a una concentració de NAD^+ aproximada de 10 mM.

Les fraccions més actives eren mesclades i concentrades per ultrafiltració fins a un volum aproximat de 1-2 ml, en un concentrador Amicon, emprant una membrana del tipus PM-10.

2.5.4. CROMATOGRAFIA DE GEL-FILTRACIÓ EN ULTROGEL ACA-34

De 1 a 2 ml de la fracció anterior eren aplicats a una columna d'Ultrogel ACA-34 (límit d'exclusió 350.000 daltons) de 1,5 x 94 cm equilibrada i eluida amb solució de fosfat sòdic 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3 (flux $7 \text{ ml} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$). Les fraccions eluides (1,5 ml) eren assajades per l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa.

Les fraccions més actives eren mesclades i concentrades per ultrafiltració fins a un volum aproximat de 1-2 ml, en un concentrador Amicon, emprant una membrana del tipus PM-10.

2.5.5. CROMATOGRAFIA EN HIDROXIAPATITA.

L'acoblament d'aquesta cromatografia al procés de purificació de la lactaldehyd deshidrogenasa, fins ara detallat, permetia obtenir preparacions homogènies. Donat que la utilització d'aquesta matriu cromatogràfica ha estat un dels resultats positius en la realització del present treball, el desenvolupament de la cromatografia, així com la seva importància seran detallats en l'apartat de resultats corresponent (veure 3.2).

Cal remarcar que en realitzar aquest tipus de cromatografia en hidroxiapatita es prenen totes les precaucions necessàries per tal d'evitar la carbonatació de la matriu cromatogràfica.

Les preparacions purificades eren guardades en alíquotes a -20°C en presència de glicerol al 20% i DTT 1 mM.

2.6. TÈCNiques IMMUNOLÒGiques.

2.6.1. OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS ANTI-LACTALDEHID DESHIDROGENASA D' E.coli.

El sèrum anti-lactaldehid deshidrogenasa d' E.coli fou obtingut injectant proteïna purificada homogènia a conills albins (de raça de Nova Zelanda). El protocol seguit per a la immunització va ésser el següent :

- 250 µg de l'enzim purificat en 300 µl de solució fosfat sòdic 10 mM, NaCl 0,9% (p/v) eren emulsionats en 300 µl d'adjuvant de Freund complet. Per a aconseguir una bona emulsió, la barreja anterior es sonicava 10 segons a 12 µm d'amplitud d'ona en un sonicador MSE. La via d'injecció fou subcutània.
- A les dues setmanes, es donava la primera injecció de record, consistent en 400 µg d'enzim purificat en solució isotònica emulsionats en adjuvant de Freund incomplet i administrats per via subcutània.
- Al cap de 10 dies, es donava la segona injecció de record, consistent en 400 µg de proteïna enzimàtica en solució isotònica emulsionats en el mateix volum d'adjuvant de Freund incomplet i administrats, també, per via subcutània.
- Havent passat una setmana des de la darrera administració, els conills es degollaren. La sang col·lectada es mantingué a 37°C durant 1 hora, centrifugant-la seguidament a baixes revolucions (3000 r.p.m.) durant 30 minuts. Finalment, es recollí el sèrum.

2.6.2. PREPARACIÓ DE LA FRACCIÓ γ -GLOBULINA A PARTIR DE ANTISÈRUM ESPECÍFIC.

La fracció de γ -globulines presents en el sèrum s'obtenia per precipitació amb sulfat amònic. S'afegia, gota a gota, el volum necessari d'una solució de sulfat amònic al 89% ajustada a pH 7,0, fins a assolir una saturació final del 35%. El procés es realitzava a 0-4°C, amb agitació suau. Després de 30 minuts d'equilibració, es centrifugava a 10.000 x g durant 30 minuts, a 4°C.

El precipitat obtingut es resuspenia en la meitat del volum inicial amb Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 mM, pH 7,5. Aquesta solució es dialitzava exhaustivament en front del mateix amortidor a fi d'eliminar el sulfat amònic present.

La preparació de γ -globulines, així obtinguda, es guardava a -20°C en alíquotes de 1 ml.

2.6.3. MÈTODE DE DOBLE DIFUSIÓ (PLAQUES D'OUCHTERLONY).

Les plaques de doble difusió es preparaven seguint la tècnica descrita per Ouchterlony (121).

Es preparava una solució de glicina 7,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), azida sòdica 0,1% (p/v), s'hi afegia agar noble al 2% i es portava a ebullició fins a fondre l'agar (5-6 minuts a partir de l'ebullició). Tot seguit, aproximadament 10 ml d'aquesta solució s'abocaven en plaques de Petri de 5 cm de diàmetre i es deixava solidificar damunt d'una superfície plana. Passats uns 30 minuts, les plaques es col·locaven a 0-4°C durant 5 minuts abans de fer-hi les cavitats de 4 mm de diàmetre

que contindrien l'antígen o l'anticòs. La distància entre ells era de 1 cm. El desenvolupament de la doble difusió es feia a 0-4°C en una cambra humida durant 48-72 hores.

2.6.4. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA EN MEDI LIQUID.

Per a immunoprecipitar la lactaldehyd deshidrogenasa es partia d'extractes cèl.lulars amb activitat enzimàtica. Alíquotes d'aquests extractes eren sotmeses a quantitats creixents d'anticòs (fracció γ -globulines preparada segons es l'apartat 2.6.2.). Aquestes barrejes eren incubades a 30 °C durant 30 minuts. Tot seguit, eren centrifugades en una centrífuga Eppendorf a 15.000 r.p.m durant 2 minuts. En el sobrenadant s'assajava l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa respecte a un control no immunoprecipitat, però tractat en les mateixes condicions. Paral.lelament, es feia un experiment control amb sèrum no immune.

2.7. ACOBLAMENT DE CLORUR DE DANSIL A PROTEÏNES.

El compost clorur de 5-dimetilamino-1-naftalensulfonil, conegut com a clorur de dansil, reacciona amb els grups amino, tiol, imidazol i grups hidroxilfenòlics. Aquest reactiu és àmpliament usat per a detectar quantitats molt petites de proteïna, per la forta fluorescència de la sulfonamida formada quan reacciona amb els grupsamins de proteïnes i pèptids (64,143) . La sensibilitat en l'ús d'aquest compost és unes 5-10 vegades superior al tintat amb Blau Brillant de Coomassie.

L'acoblament del clorur de dansil a proteïnes es va fer segons el mètode descrit per Talbot i Yphantis (163), modificat per Tijssen i Kurstak (166). La proteïna era dissolta en Tris-acetat 100 mM, pH 8.2, SDS 12 % (p/v), fins a una concentració de 1-2 mg/ml. Tot seguit, s'afegien 0,1 volums d'una solució de clorur de dansil al 10 % (p/v) en acetona, s'agitava vigorosament i es deixava durant 30 minuts en un bany a 50°C. La posterior addició de 0,1 volums de 2-mercaptoetanol aclarava la barreja de reacció. Després de 15 minuts d'incubació addicional a 50°C, les mostres eren a punt d'ésser sotmeses a electroforesi en sistemes amb SDS.

Cal fer menció de que la presència de concentracions superiors a 25 mM de 2-mercaptoetanol en el primer pas de la reacció inhibeix completament l'acoblament inicial del clorur de dansil a la proteïna. i que la proteïna dansilada migra (en una electroforesi amb SDS) igual que la proteïna no dansilada.

2.8. TÈCNiques ELECTROFORÈTIQUES.

2.8.1. ELECTROFORESI EN GELS DE POLIACRILAMIDA EN PLAQUES.

Bàsicament, totes les electroforesis analítiques es feien en plaques donat que aquest sistema ofereix molts avantatges respecte de l'electroforesi en tub a l'hora de fer anàlisis comparatives de proteïnes i pèptids.

El sistema d'amortidors escollit va ésser el discontinu descrit per Laemmli (97) en el que la presència del detergent dodecil sulfat sòdic (SDS), fa d'ella una tècnica molt potent en separar proteïnes segons el seu pes molecular.

En el present treball, aquest sistema s'ha adaptat també per a condicions no desnaturalitzants, en absència de SDS, quan els gels eren revelats per activitat enzimàtica.

L'aparell fou construït prenent model d'altres descrits en la literatura (2,87,158).

2.8.1.1. PREPARACIÓ DELS GELS.

Per a la preparació dels gels d'acrilamida es partia de les següents dissolucions :

- Acrilamida 40% (p/v) - Bisacrilamida 1,065% (p/v) en aigua bidestil.lada. La solució era filtrada amb un filtre Millipore de 0,45 μm de tamany de porus.
- Tris-HCl 1,5 M pH 8,9 i Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, que es conservaven a 4°C.
- Extemporàniament es preparava una solució de persulfat amònic al 10% (p/v) i una de SDS al 10% (p/v).

Com a iniciador de la polimerització s'utilitzava N,N,N', N'-tetrametilendiamina (TEMED).

Les dimensions de les plaques de vidre eren 14 x 16 cm.

Rutinariament, els gels tenien 1 mm de gruix. Separadors i vidres s'acobraven i s'en feia un compartiment estanc que es segellava amb agar calent al 1,5% i es mantenia junt amb l'ajut de pinces metàliques.

La composició del gel separador, en un volum de 15 ml, era la següent:

Acrilamida-Bisacrilamida (40-1,065%)	10%
Tris-HCl pH 8,9	375 mM
SDS	0,1%
Persulfat amònic	0,05%
TEMED	0,025%

En els gels d'acrilamida preparats en condicions no desnaturalitzants s'omitia el SDS i la concentració d'acrilamida era del 7,5%.

El persulfat amònic i el TEMED s'afegien just abans d'introduir el gel entre les plaques. La polimerització es duia a terme a 37°C. Tot el material era atemperat prèviament a aquesta temperatura. Un cop mesclats suaument tots els components del gel, aquest era introduït entre les plaques de vidre fins a una alçada de 9 cm des del separador inferior. Seguidament, i amb molta cura, es superposava una capa d'aigua (també podia ésser amortidor o isopropanol) d'uns 2 mm damunt del gel separador , a fi de que es formés una superfície perfectament rectilínia. La polimerització era completa als quinze minuts aproximadament.

Una vegada el gel separador s'havia format, s'enretirava l'aigua que el cobria i es rentava la superfície amb la solució del gel empilador. A continuació, s'introduïa el formador de butxaques fins a 1 cm per sobre del gel separador. S'afegia suficient gel empilador, tenint cura de que no es formessin bombolles sota del formador de butxaques.

La composició del gel empilador, en un volum de 5 ml, era la següent :

Acrilamida-Bisacrilamida (40-1,065%)	5%
Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1%
Persulfat amònic	0,05%
TEMED	0,075%

El SDS no es posava en la preparació del gel empilador quan l'electroforesi es feia en condicions no desnaturalitzants.

Els catalitzadors (persulfat amònic i TEMED) s'afegien just abans d'introduir la solució del gel entre les plaques.

Una vegada polimeritzat el gel empilador, es rentava les butxaques amb l'amortidor d'aquest gel amb l'ajut d'una agulla hipodèrmica.

La placa així preparada podia usar-se tot seguit, o bé, després d'omplir les butxaques amb amortidor, guardada a 4°C de 1 a 3 dies, sense que s'observés cap anomalia important en el desenvolupament de la cursa electroforètica.

2.8.1.2. PREPARACIÓ DE LES MOSTRES.

Les mostres de proteïna que havien d'ésser sotmeses a electroforesi en condicions desnaturalitzants amb SDS eren

tractades de la següent manera : a un volum determinat de mostra proteïca s'addicionava la quantitat adient d'una solució reductora a fi d'obtenir les concentracions finals de SDS 5% (p/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v), EDTA 0,33% (p/v), i Tris 125 mM pH 6,8. A continuació, es deixava 3 minuts a 100°C en un bany maria, per tal d'aconseguir la dissociació de les proteïnes. Després de deixar-les refredar, s'hi afegia sacarosa 5% i Blau de Bromfenol 0,0125% abans d'aplicar-les al gel. Les mostres així preparades podien usar-se d'immediat, o bé ésser guardades a -20°C. En l'últim cas, abans d'aplicar-les al gel calia repetir l'escalfament a 100°C.

Quan la mostra proteïca era analitzada electroforeticament en condicions no desnaturalitzants, abans d'ésser introduïda en el gel, tant sols calia afegir sacarosa 5% i Blau de Bromfenol 0,0125%, no requerint cap tractament prèvi.

2.8.1.3. DESENVOLUPAMENT DE LA CURSA.

Per a una bona resolució del sistema, cal que l'alçada del volum de mostra en la butxaca no excedeixi de la meitat de l'alçada del gel empilador.

S'hi acoblaven a la placa dues cubetes, una inferior amb l'elèctrode positiu, i una cubeta superior (acoblada a la placa amb agar calent al 1,5%) amb l'elèctrode negatiu.

Les mostres proteïques eren aplicades amb cura a la butxaca corresponent on quedaven perfectament dipositades degut a la seva densitat. Tot seguit, es cobrien amb amortidor de cubetes, quina composició era : Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3. Quan el procés es feia en condicions desnaturalitzants,

aquesta solució amortidora de pH contenia també SDS al 0,1%.

La intensitat aplicada inicialment al sistema era de 15 mA. Quan l'indicador de Blau de Bromfenol arribava al límit del gel empilador, l'amperatge s'augmentava a 25-30 mA fins al final de la cursa. S'emprava un alimentador de corrent contínua ATOM 502.

Per a evitar problemes d'escalfament de la placa, aquesta es refrigerava per ventilació.

2.8.1.4. REVELAT DEL GEL.

- Revelat per proteïna.

Quan les quantitats de proteïna a detectar eren de l'ordre de 5 µg o superiors, els gels eren tintats amb Blau Brillant de Coomassie segons la tècnica descrita per Fairbanks (50).

La solució colorant consistia en Blau Brillant de Coomassie 0,1% (p/v) dissolt en una solució d'alcohol isopropilic 25% (v/v) i àcid acètic 10% (v/v), emprant-ne 10 volums per cada un de gel, a fi d'evitar la interferència del SDS en el tintat. El temps era de dues hores.

El primer decolorant del gel era una solució d'alcohol isopropilic 25% (v/v) i àcid acètic 10% (v/v). Per a acabar de decolorar el gel i obtenir un fons transparent, s'usava una solució d'àcid acètic 10% (v/v).

Els gels així tractats es guardaven a 40c en àcid acètic 10% i en aquestes condicions eren estables durant uns mesos.

Quan les quantitats de proteïna a detectar eren inferiors a 1 µg, els gels es revelaven per tinció argèntica segons modificacions dels protocols descrits en la bibliografia (44, 49, 115, 116, 180).

Un cop acabada la cursa electroforètica, el gel era tret de la placa i submergit en solució decolorant consistent en alcohol isopropilic 25% (v/v) i àcid acètic 10% (v/v) durant tota una nit, a fi d'extreure el SDS del gel. A continuació, es feien quatre rentats de 1 hora cadascun, per tal d'eliminar l'àcid del gel.

La tinció del gel es feia amb una solució amoniacal de nitrat de plata durant 15 minuts en continua agitació. La composició d'aquesta solució era la següent :

NH ₄ OH 28%	1,2 ml.
NaOH 4%	6,0 "
AgNO ₃ 20%	1,2 "
Aigua bidestil.lada	c.s.p.	120,0 "

Passat el temps de tinció, el gel es rentava exhaustivament amb aigua destil.lada, canviant de recipient, per tal d'eliminar el pH alcalí que interferiria en el revelat.

El revelat del gel es feia amb una solució d'àcid cítric 0,005% i formaldehid 0,02%. Les bandes de proteïna apareixien als 10-15 minuts.

Per tal d'aturar el revelat, el gel era submergit en un altre recipient diferent del usat en el revelat, en 200 ml d'una solució d'àcid cítric 0,05% i metilamina 0,4%.

Els gels es guardaven a 40C en aquesta solució, o bé eren secats al buit en un secador de gels GSD-4 de Pharmacia.

La metilamina evita la pèrdua de color de les bandes de proteïna durant el temps d'enmagatzematge.

- Revelat per activitat enzimàtica.

Quan els gels eren revelats per activitat enzimàtica aldehid deshidrogenasa es seguia una modificació de la tècnica descrita per Gabriel (56), basada en la visualització de les bandes d'activitat deshidrogenasa mitjançant l'acoblament d'una reacció indicadora de color, que implica la reducció d'una sal de tetrazoli al corresponent formazan (colorejat), utilitzant la fenacina metasulfat (PMS) com a intermediari en el transport electrònic.

Un cop finalitzada la cursa electroforètica en condicions no desnaturalitzants, el gel era tret de les plaques i submergit en una solució reveladora preparada extemporàniament. La composició d'aquesta solució, segons el revelat fòs per activitat glicolaldehid deshidrogenasa o lactaldehid deshidrogenasa, era la següent :

Activitat glicolaldehid deshidrogenasa : solució amortidora glicina-NaOH 100 mM (pH 9,5), NAD^+ 5mM, glicolaldehid 1,6 mM, NBT 0,3 mg/ml i PMS 0,1 mg/ml.

Activitat lactaldehid deshidrogenasa : solució amortidora glicina-NaOH 100 mM (pH 10,5), NAD^+ 5mM, lactaldehid 0,5 mM, NBT 0,3 mg/ml i PMS 0,1 mg/ml.

Els gels totalment submergits en aquesta solució s'incubaven a 37°C en completa obscuritat durant 15-20 minuts. Un cop finalitzat el procés de revelat, els gels es rentaven amb aigua destil.lada i s'introduïen en àcid acètic al 10% (v/v). En aquestes condicions el color de les bandes era estable durant uns quants mesos.

2.8.2. ELECTROFORESI EN GELS DE POLIACRILAMIDA EN TUBS.

Quan es pretenia purificar la lactaldehyd deshidrogenasa electroforeticament (veure 2.8.6) s'empraven tubs de vidre de 5 mm de diàmetre intern i 120 mm de llargada. Les solucions d'amortidors, catalitzadors, metodologia, etc, eren les mateixes que les usades en l'elaboració de les plaques.

La cursa es desenvolupava a 0,5 mA/tub mentre la mostra estava en el gel empilador i a 1 mA/tub en el separador.

2.8.3. ELECTROFORESI EN GRADIENTS LINEALS DE POLIACRILAMIDA.

Els gradients lineals de poliacrilamida s'utilitzaven a fi d'augmentar la resolució dels pèptids originats en les digestions proteolítiques limitades, on els marges de pesos moleculars varien entre 38.000 i 3.000 daltons aproximadament, ja que en plaques de concentració uniforme són difícilment resolts com a bandes ben definides.

Les solucions emprades eren les mateixes que les descrites a l'apartat 2.8.1, variant sensiblement la concentració dels catalitzadors. Els gradients es preparaven usualment del 15-20 % d'acrilamida. Les solucions, preparades tal com s'indica a la taula 2, s'introdueixen en sengles vasos comunicants de metacrilat units per la part inferior amb un tub de silicona al que s'acoblava una clau de pas. Aquest conjunt era col·locat damunt d'un agitador magnètic, el qual feia girar una barra magnètica dipositada en el recipient que contenia la solució més densa i així, ajudava a barrejar la solució menys densa a mesura que aquesta entrava en el recipient de la solució al 20%.

TAULA 2.

COMPOSICIÓ DE LES SOLUCIONS ORIGINALS EMPRADES EN LA POLIMERITZACIO DE GRADIENTS LINEALS DE POLIACRILAMIDA.

SOLUCIO	GEL 15% (10 ml)	GEL 20% (10 ml)
Acrilamida 40% - Bis 1,065%	3,75	5,0
Tris-HCl 1,5 M pH 8,9	2,5	2,5
Glicerol 50% (v/v)	1,5	2,0
Persulfat amònic 10%	0,02	0,02
SDS 10%	0,1	0,1
TEMED	0,005	0,005
Aigua bidestil.lada	2,125	0,375

L'entrada del gradient entre les plaques (preparades com es descriu a l'apartat 2.8.1.1.) es feia a temperatura ambient mitjançant una bomba peristàltica Gilson a un flux de 2 ml/min. El gradient així format era perfectament vàlid, comprovant-se per mesura de l'index de refracció, en un refractòmetre d'Abbe, de fraccions d'un ml de la solució del gel separador (una vegada introduït) en la que no s'havia afegit agents polimeritzants (ni TEMED, ni persulfat amònic).

A continuació, el gradient ja introduït entre les plaques era recobert amb 1 ml d'aigua i es deixava polimeritzar completament. Després de treure l'aigua sobrenadant, s'emplacava el gel empilador tal com es descriu en 2.8.1.1, pel damunt del gradient format prèviament.

La cursa es desenvolupava a 15 mM d'intensitat constant al llarg de tot el gel.

2.8.4. ISOELECTROENFOC EN GELS DE POLIACRILAMIDA,

2.8.4.1. PREPARACIÓ DELS GELS

Les dimensions de les plaques eren 120 x 100 x 1,5 mm. Els separadors i vidres eren acoblats i segellats tal com es descriu a l'apartat 2.8.1.1.

La composició del gel era la següent :

Acrilamida	5% (p/v)
Bisacrilamida	0,15% (p/v)
Glicerol	10% (p/v)
Amfòlits (Pharmalytes ^R)	7,5% (v/v)
Persulfat amònic	0,015 (p/v)
TEMED	0,025% (p/v)

La polimerització es feia a 37 °C prenent les màximes precaucions ja descrites en l'apartat 2.8.1.1.

2.8.4.2. PREPARACIÓ DE LES MOSTRES.

Les mostres, preparacions enzimàtiques purificades, no requerien cap tractament especial. Eran aplicades al gel mitjançant un marc de goma de silicona acoblat a la superfície del gel.

2.8.4.3. DESENVOLUPAMENT DEL ISOELECTROENFOC.

Les tires d'electrode eren impregnades amb l'anòlit i el catòlit i aplicades convenientment als extrems de la placa. Aquestes solucions variaven en funció dels marges de pH emprats. Així, usant marges compresos entre 3 i 6 (formats al barrejar parts iguals de Pharmalytes^R 2,5 - 5 i 4 - 6,5) s'utilitzaven solucions de H₂SO₄ 0,1 M i NaOH 0,1 M, com anòlit i catòlit respectivament.

El procés es desenvolupava en un aparell Multiphor (LKB) mantenint el líquid refrigerant a 4 °C. Per a la bona transmissió de la refrigeració, s'aplicava una solució de Triton X-100 al 20 % (V/V) entre la placa refrigerant i el vidre que suportava el gel. L'electroenfoc durava 6 hores, mantenint una potència constant de 8 watts mitjançant un alimentador LKB 2197.

2.8.4.4. REVELAT DEL GEL.

Un cop finalitzat el procés, el gel era tret amb cura de la placa i submergit en una solució d'àcid tricloroacètic 10% (p/v) durant 1 hora, en agitació suau. D'aquesta manera s'eliminaven els amfòlits (els quals interferirien en el tintat posterior), mentre que les proteïnes quedaven precipitades en el gel. Seguidament, es transferia a 10 volums d'una solució decolorant consistent en alcohol etílic 30% (v/v) i àcid acètic 10% (v/v) durant 2 hores, a fi d'ajustar el pH del gel al de la solució colorant. Aquesta es composava de Blau Brillant de Coomassie 0,1% (p/v) dissolt en la solució decolorant ja esmentada. El tintat durava 1 hora a temperatura ambient i tot seguit es decolorava amb la mateixa solució decolorant.

El revelat per activitat enzimàtica aldehid deshidrogenasa d'un gel sotmés a isoelectroenfoc s'efectuava tal com es descriu a l'apartat 2.8.1.4.

2.8.4.5. MESURA DEL GRADIENT DE pH.

En acabar l'electroenfoc, una tira de 100 x 10 x 1,5 mm del gel d'acrilamida era tallada en trossets de 5 x 10 x 1,5 mm , els quals eren col.locats en vials que contenien 2 ml d'una solució de KCl 20 mM. Després d'una nit, es mesurava el pH en cada vial mitjançant un pH-metre convencional.

2.8.5. ELECTROIMMUNODIFUSIÓ SEGONS LAURELL.

Es seguí bàsicament la tècnica descrita per Laurell (100). L'agarosa utilitzada per a fer aquests gels era de baixa electroendosmosis, per a evitar la formació de cues de precipitat envers el càtode.

La concentració final de l'agarosa era del 1% (p/v) i estava dissolta en Tris 225 mM, borat 125 mM, pH 8.6. Una vegada fosa l'agarosa en l'amortidor, es deixava atemperar en un bany a 55°C, durant 10 minuts. Tot seguit, s'hi adicionava l'anticòs fins a la concentració desitjada (0,4%) i, després d'una agitació suau, s'extenia la solució en una placa fins que solidificava.

Les dimensions de les plaques emprades eren 80 x 43 x 1 mm i el volum de gel d'agarosa en cada placa era de 5 ml.

Seguidament, s'encunyaven les cavitats que contindrien l'antígen.

L'electroforesi es duia a terme a 5 mA/placa, cap l'ànode, durant 3-4 hores, emprant com a amortidor de cubetes una solució Tris 125 mM, glicina 150 mM, pH 8,6.

El contacte entre les plaques d'agarosa i el tampó es feia mitjançant esponges de cel.lulosa.

Acabat el procés, el gel d'agarosa es treia del seu suport i era submergit en solució salina durant 24-48 hores, a fi d'eliminar les proteïnes no immunoprecipitades. Seguidament, els gels es rentaven amb aigua destil.lada durant unes 4-5 hores. Passat aquest temps, el revelat dels gels es feia amb Blau Brillant de Coomassie. La composició de la solució colorant i els decolorants era la mateixa que la descrita a l'apartat 2.8.1.4.

2.8.6. PURIFICACIÓ ELECTROFORÈTICA DE PROTEÏNES.

Les proteïnes que es desitjava purificar fins a un alt grau d'homogeneïtat eren sotmeses a electroforesi en tub tal com es descriu a l'apartat 2.8.2. Una alíquota de la mostra era dansilada a fi de poder seguir el procés durant la separació electroforètica, il.luminant amb llum ultraviolada de 360 nm. Quan la separació de la proteïna en qüestió era suficient, s'aturava l'electroforesi, els gels eren extrets del tub i posats en una safata sobre fons negre i il.luminats amb llum U.V. Donat que els derivats dansilats migren, en elctroforesis en condicions desnaturalitzants, igual que la proteïna no tractada amb clorur de dansil, es tallaven els trossos del gel que contenien la proteïna desitjada.

Aquests trossos eren introduïts en tubs del mateix diàmetre que tenien una petita constricció a la part inferior, tenint cura de no deixar bombolles entre les peses del gel.

Un fragment de 7 cm de tub de diàlisi de 11 mm de diàmetre, lligat amb doble nus en un dels seus extrems, s'omplia amb amortidor Tris 2,5 mM, glicina 19,2 mM, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3, i s'insertava per l'extrem obert al tub d'elució, procurant no atrapar bombolles a l'extrem d'aquest tub. La fixació del sac de diàlisi al tub que contenia les bandes de proteïna es feia amb una goma elàstica, assegurant-se que el sistema era estanc.

Les cubetes d'electroforesi s'omplien amb la solució amortidora de pH ja esmentada i s'aplicaven 4 mA/tub durant 1 hora. Si en acabar aquest temps, encara quedava proteïna per eluir, s'aplicava de nou el mateix amperatge durant 1 hora més.

La proteïna eluïda es concentrava al fons del tub i just abans de finalitzar el procés, s'invertia la polaritat del sistema durant 2-3 minuts, per a evitar que quedés proteïna adherida al tub de diàlisi. El volum del sac de diàlisi que contenia l'enzim (aproximadament 0,5 ml) es transferia a un tub del tipus Corex i es precipitava la proteïna amb 9 volums d'acetona a -20°C . En aquestes condicions un gran percentatge de SDS restava en el sobrenadant. Després de 30 minuts a 4°C , el precipitat era col·lectat per centrifugació a $12.000 \times g$.

Aquest precipitat així obtingut és útil per a sotmetre a electroforesi analítica, obtenció dels seus pèptids proteolítics, etc.

Usant aquest sistema, les pèrdues de proteïna eren mínimes. Es podia catalogar el rendiment en un 80-90%.

2.9. MAPES PEPTIDICS MONODIMENSIONALS PER DIGESTIÓ PROTEOLITICA LIMITADA.

Les proteïnes purificades electroforèticament tal com es descriu a l'apartat 2.8.6, es dissolien fins a 0,5-1 mg/ml en amortidor que contenia Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 0,5 % (p/v), glicerol 10% (v/v) i Blau de Bromfenol 0,0005% (p/v). Les mostres eren escalfades a 100°C durant 3 minuts i després d'atemperar-les a 37°C en un bany d'aigua, s'hi afegia la quantitat adient d'enzim proteolític i es deixava actuar el temps necessari. A continuació, s'addicionava SDS i 2-mercaptoetanol fins a 2% (p/v) i 10% (v/v) respectivament. La reacció s'aturava seguidament escalfant les mostres a 100°C durant 3 minuts i així tractades es sotmetien a electrofore-si segons es descriu a l'apartat 2.8.3.

Aquest protocol es seguia per a les digestions proteolítiques amb α -quimotripsina, éssent la relació lactaldehid deshidrogenasa/proteasa de 16 i el temps de 30 minuts.

La digestió amb proteasa de S.aureus V8 es feia en el gel empilador, amb una relació enzim/proteasa de 2,5, i dues hores de cursa electroforètica en el gel empilador de poliacrilamida al 5%, usant els sistema d'amortidors descrit per Laemmli.

2.10. DETERMINACIÓ DE LA COMPOSICIÓ D'AMINOÀCIDS.

2.10.1. PREPARACIÓ DE LES MOSTRES.

S'analitzà la composició d'aminoàcids de l'enzim lactal-
dehid deshidrogenasa purificat a homogeneïtat pel mètode des-
crit a l'apartat 2.5 i amb els criteris de puresa que s'in-
dicaran a l'apartat de resultats corresponent.

Les preparacions enzimàtiques purificades eren dialitza-
des en front d'un excés de solució amortidora de pH fosfat
sòdic 10 mM, per tal d'eliminar el 2-mercaptoetanol i d'al-
tres components de l'amortidor que interferirien en la detec-
ció dels aminoàcids després de la hidròlisi. Les mostres dia-
litzades eren assajades de nou en quant la seva concentració
de proteïna, pel mètode de Lowry.

2.10.1.1. HIDRÒLISI ÀCIDA AMB HCl 6N.

25 µg de proteïna purificada i dialitzada com ja s'ha
esmentat en aquest apartat eren dipositats en el fons d'un
tub Pyrex de 160 x 15 mm. A continuació, s'addicionava 5 ml
de HCl 6N de grau analític. Els tubs es tancaven al buit
amb l'ajut d'una bomba de buit d'oli i un bufador. Tot se-
guit, es col.locaven en una estufa perfectament controlada a
110°C (Haereus UT5042). El temps d'hidròlisi per a cada
mostra va ésser de 24; 48 i 72 hores. Passat aquest temps,
els tubs eren oberts i el seu contingut evaporat a seque-
tat, a baixa temperatura, en un concentrador "speed vacc"
model SAVANT.

2.10.1.2. HIDRÒLISI AMB TRIPTAMINA I P-TOLUENSULFÒNIC.

100 µg de proteïna purificada i dialitzada com ja s'ha esmentat en aquest apartat eren dipositats en el fons d'un tub de Borosilicat de 10 x 75 mm. Després de desecats en un concentrador "speed vacc" es redissolien en 100 µl de la següent solució : triptamina 2 mg i àcid p-toluensulfònic 0,58 g en 1 ml d'aigua destil·lada. A continuació, els tubs eren segellats al buit de la mateixa manera que els tubs sotmesos a hidròlisi àcida. Després, es col·locaven en una estufa controlada a 110°C (Haereus UT5042) durant 24 hores.

2.10.2. SEPARACIÓ I QUANTIFICACIÓ DELS AMINOÀCIDS.

Les preparacions enzimàtiques hidrolitzades i preparades com s'ha descrit anteriorment foren portades al Servei d'Anàlisi de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, on es realitzà la separació i determinació dels aminoàcids de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa d' E.coli, de les soques 1, 3 i JA-102.

Les mostres de la hidròlisi àcida amb HCl 6N foren dissoltes en 200 µl de solució clorhídrica 0,05 N de L-Norleucina 50 µM. Les preparacions de la hidròlisi amb triptamina i p-toluensulfònic foren processades de manera adient i dissoltes també amb una solució de L-Norleucina 50 µM.

Les solucions problema eren introduïdes en vials i processades en un analitzador Chromaspeck. Els aminoàcids eren separats per cromatografia líquida d'alta pressió, emprant una resina de bescanvi iònic on quedaven retinguts els amino-

àcids, que eren posteriorment eluïts per rentat de la columna amb tampó de citrat de liti de pH ascendent (entre 2 i 12) controlat per un programa. Bàsicament, quan el pH de l'amortidor es correspon amb el punt isoelèctric de l'aminoàcid, aquest es arrosegat pel mateix tampó cap a fora de la columna.

La detecció i quantificació dels aminoàcids es feia per fluorescència, mercès a la reacció entre l'ortoftalaldehid, el mercaptoetanol i els aminoàcids. Una cèl.lula fotoelèctrica detecta i quantifica aquest fenomen, el senyal produït és introduït, a través d'amplificadors, en un enregistrator gràfic i en un integrador.

L'aminograma consisteix en una sèrie de pics, l'àrea dels quals és proporcional a la concentració de cada aminoàcid, en un cert marge de concentracions.

Ja que la resposta a la reacció de fluorescència no és la mateixa per a tots els aminoàcids, s'utilitzen dues menes de patrons de referència : l'estàndard extern i l'estàndard intern. L'estàndard extern és una solució comercial d'aminoàcids a una concentració coneguda, a la que s'hi afegeix L-Norleucina a una concentració del mateix ordre. L'estàndard intern és la mateixa L-Norleucina esmentada, la qual s'introdueix en el problema.

El càlcul de la concentració d'un aminoàcid (aa) en la mostra problema es fa en dues etapes:

1o) Càlcul del factor de referència relatiu al aa_x

$$F.R.r._x = \frac{\text{conc de l'aa}_x \text{ a l'estàndard extern}}{\text{àrea del pic de l'aa}_x \text{ a l'estàndard extern}} \times \frac{\text{àrea del pic NLE a l'estàndard extern}}{\text{conc de NLE a l'estàndard extern}}$$

2o) Càlcul de la concentració de l'aminoàcid dins el problema:

$$C_{aa_x} = \frac{\text{àrea del pic de l'aa}_x \text{ en el problema}}{\text{àrea del pic de NLE en el problema}} \times F.R.r._x \times \text{conc de NLE en el problema.}$$

2.11. PREPARACIÓ DEL L-LACTALDEHID.

2.11.1. SÍNTESI DEL L-LACTALDEHID.

El L-lactaldehid no és un producte asequible comercialment, per tant va ésser necessari sintetitzar-lo. Aquest isòmer del lactaldehid es va preparar a partir de D-treonina, per reacció amb ninhidrina, segons el mètode descrit per Zagalak i col (183).

Es dissolien 3 g de D-treonina i 9,1 g de ninhidrina en 600 ml de solució amortidora de pH de citrat sòdic 50 mM ajustada a pH 5,4. S'escalfava en ebullició durant 15 minuts, tot mantenint la mescla en vigorosa agitació. Es deixava refredar i es filtrava (paper whatman nº 1).

El filtrat es tractava amb resina de bescanvi aniònic Dowex 1 x 8 100 en forma bicarbonat fins a donar un pH de 6,5 i tot seguit s'ajustava a pH 4,0 amb resina de bescanvi catiònic Dowex 50 x 8 50 en forma H⁺ .

Es concentrava fins a un volum de 40 ml en un rotavapor (40°C i 20 mm Hg). Aquest concentrat es tornava a tractar amb les resines d'intercanvi iònic tal com s'ha indicat anteriorment. Finalment, es concentrava fins a un volum de 20 ml i es repetien els tractaments amb les resines d'intercanvi iònic (tres o quatre vegades) fins a aconseguir la completa decoloració de la solució. El pH final de la mateixa era de 4,0.

La concentració de lactaldehid en aquest pas es determinava segons s'indicarà a l'apartat 2.11.3.1.

2.11.2. PURIFICACIÓ DEL L-LACTALDEHID,

El L-lactaldehid així preparat semblava tenir restes de productes contaminants que interferien en la determinació de l'activitat enzimàtica lactaldehid deshidrogenasa. Per tant, es va passar a purificar-lo per cromatografia, seguint una modificació del mètode descrit per Isherwood i Hanes (80) per a la separació d'àcids orgànics, emprant una mescla de n-propanol i amoníac.

S'utilitzà la tècnica de cromatografia ascendent, en paper whatman nº 3 (chroma), prèviament rentat amb un solvent de la mateixa composició que l'utilitzat en la separació cromatogràfica, que en aquest cas era n-propanol-amoníac (60:40).

Les mides del paper eren 17,5 x 18 cm. Les mostres s'aplicaven a una distància de 2,5 cm de l'extrem inferior del paper i amb una separació entre elles de 1,5 cm.

La mostra a aplicar era la següent: la solució final del L-lactaldehid, preparada com s'ha descrit a l'apartat 2.11.1., es concentrava fins a pocs mil·lilitres en rotavapor (40°C i 20 mm Hg). Aquest concentrat era posteriorment liofilitzat, obtenint-se així un líquid olèic que es dissolia en la mínima quantitat d'etanol al 20% (v/v). D'aquesta solució es dipositava com a màxim 10 µl en cada aplicació.

El solvent cromatogràfic s'afegia a la cubeta en un volum total de 200 ml i 24 hores abans de la separació de la mostra, per tal de saturar el recipient.

En el procés cromatogràfic, quan el solvent arribava a 14 cm des de la línia d'aplicació, el paper es retirava de la cubeta i es deixava secar.

Un cop sec el cromatograma, en un dels extrems, el L-lactaldehid es revelava amb un nebulitzador de 2,4-dinitrofenilhidrazina al 0,4% en HCl 2 N. Els compostos carbonílics donen taques grogues (41). Les taques corresponents al L-lactaldehid, que a la vegada eren fluorescents a la llum ultraviolada, es retallaven. L'elució del lactaldehid es feia per addició de 100 µl d'aigua destil·lada als fragments retallats i posterior centrifugació a 2.500 r.p.m durant 10 minuts en una centrífuga Janetzki T32C. Aquesta operació es repetia quatre vegades amb cadascun dels fragments del cromatograma.

Les solucions aquoses es reunien i concentraven en un rotavapor. La solució final es valorava per formació de la semicarbazona corresponent (veure 2.11.3.2.), i així eren normalment usades com a substrat en la determinació de l'activitat lactaldehid deshidrogenasa.

2.11.3. VALORACIÓ DEL L-LACTALDEHID.

S'han utilitzat dos mètodes de valoració en funció de la quantitat de mostra disponible :

2.11.3.1. VALORACIÓ DEL L-LACTALDEHID PER IODOMETRIA.

Per a la determinació del L-lactaldehid obtingut segons la síntesi de Zagalak i col (apartat 2.11.1.) s'utilitzava una tècnica volumètrica quin fonament era la capacitat d'unió de l'aldehid al bisulfit (27). Les preparacions de L-lactaldehid eren tractades amb un excés de bisulfit sòdic. Tot seguit, s'addicionava la quantitat suficient de iode per tal d'oxidar el bisulfit lliure a sulfat. La posterior addició de bicarbonat

sòdic descomposava el complex aldehid-bisulfit alliberant aquest últim compost, el qual podia ésser valorat iodimètricament.

En un matràs d'erlenmeyer de 100 ml es mesclaven 0,5 ml de la solució de lactaldehid amb 5 ml de bisulfit sòdic 0,25 M, es rentaven les parets del matràs amb 20-25 ml d'aigua destil·lada i es deixava en repòs durant 15-20 minuts a temperatura ambient. Tot seguit, s'addicionaven 5 gotes d'indicador de midó i s'eliminava l'excés de bisulfit amb iode 0,1 N addicionat des d'una bureta. A continuació, s'afegien de 1-2 g de bicarbonat sòdic i es valorava el bisulfit alliberat amb iode 0,1 N, el qual era proporcional a la quantitat de lactaldehid en la mostra.

2.11.3.2. VALORACIÓ DEL LACTALDEHID PER REACCIÓ AMB LA SEMICARBAZIDA.

El mètode espectrefotomètric emprat en aquest treball per a valorar el lactaldehid és una modificació del descrit per Olson (118), basat en la reacció de l'aldehid amb semicarbazida per a formar la semicarbazona corresponent, que pot ésser mesurada a 252 nm. Aquesta reacció és proporcional a la quantitat d'aldehid present en les mostres.

Aquest mètode s'utilitzà per a valorar el lactaldehid purificat per cromatografia (apartat 2.11.2.).

Paral·lelament a cada determinació de lactaldehid es construïa una recta patró amb glicolaldehid a concentracions entre 0-1,5 mM, la qual era tractada de la mateixa manera que la solució problema.

La mescla d'assaig contenia, en un volum total de 1ml : hidroclorur de semicarbazida 200 mM i l'aldehid a determinar, o el patró. Es deixava a temperatura ambient durant unes 2-3 hores per tal de que tingués lloc la reacció. Posteriorment, es mesurava l'absorbància a 252 nm en un espectrefotòmetre Beckman DB-GT. La relació entre l'absorbància a 252 nm i la quantitat d'aldehid es mantenia lineal a concentracions d'aldehid inferiors a 1,5 mM.

2.11.4. DESDIMERITZACIÓ DEL L-LACTALDEHID.

Les solucions de L-lactaldehid preparades i valorades tal com es descriu en els apartats corresponents al bloc 2.11 foren desdimeritzades segons el mètode descrit per Huff (78).

La solució de lactaldehid (0,03 M) es calentava a 80°C durant 10 minuts en presència d'àcid perclòric (0,13 M). A continuació, es neutralitzava amb hidròxid sòdic.

Les preparacions de L-lactaldehid, així desdimeritzades, van ésser utilitzades en l'anàlisi de l'enzim purificat.

2.12. TÈCNiques FOTOGRAFÍQUES.

2.12.1. CONDICIONS PER A PROTEÍNES REVELADES AMB BLAU BRIGHT DE COOMASSIE.

Per a proteïnes tintades amb Blau de Coomassie, tant si es tractava de gels d'agarosa com de poliacrilamida, s'usava una pel·lícula de 100 ASA, blanc i negre.

El gel en qüestió es col·locava damunt d'una planxa de metacrilat blanc translúcida, il·luminat per sota amb llum blanca. L'objectiu de la càmera es cobria amb un filtre taronja per a augmentar el contrast.

2.12.2. CONDICIONS PER A PROTEÍNES I PÈPTIDS TRACTATS AMB CLORUR DE DANSIL.

Donat que aquest producte unit a proteïnes emet fluorescència groc-verdosa quan s'il·lumina amb llum ultraviolada de 365 nm, s'emprava una pel·lícula de 400 ASA. El gel es dipositava sobre un fons negre i s'il·luminava amb dues làmpares de 15 watts cadascuna, mantenint l'habitació a fosques. Amb el diafragma completament obert (f:1,8) es prenen tres fotografies exposant 0,5 ; 1 i 2 segons.

2.13. PRODUCTES I REACTIUS UTILITZATS.

Els productes i reactius utilitzats en el present treball han sigut suministrats per les següents firmes comercials :

BDH CHEMICALS. Poole, Anglaterra

Desoxicolat sòdic

BAKER. Deventer, Països Baixos.

Acetaldehid

BIO-RAD LABORATORIES. Richmond, Ca., E.U.A.

Blau Brillant de Coomassie

Dodecil sulfat sòdic (SDS)

Hidroxiapatita

N-N'-metilenbisacrilamida

Persulfat amònic

N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED)

BOEHRINGER MANNHEIM GmbH. Mannheim, Alemanya.

Lactat deshidrogenasa (de múscul de conill)

CARLO ERBA. Milà, Italia.

Àcid glicòlic p.a

Àcid p-toluen sulfònic p.a

Clorur de 5-dimetilamino-1-naftalen sulfonil RPE

Etilenglicol p.a

Metabisulfit sòdic p.a

DIFCO. Detroit, Mich. E.U.A.

Antibiotic medium nº 3

Bacto-agar

Bacto-casaminoàcids (hidrolitzat de caseïna)

Bacto-extracte de llevat

Bacto-triptona

FLUKA A.G. Buchs, Suïssa.

Acrilamida

Lactat sòdic

KOCH-LIGHT LABORATORIES TTD. Colnbrook, Berks, Anglaterra.

Acetona p.A.R.

LKB. Bromma, Suècia.

Ultrogel ACA-34

MERCK. Darmstadt, R.F. Alemanya.

Àcid bòric p.a

Àcid clorhídric p.a

Àcid sulfosalicilic p.a

Àcid sulfúric

Azida sòdica

Bicarbonat sòdic

Blau de bromfenol

Citrat trisòdic

Clorur càlcic

Clorur ferros

Clorur manganos

Clorur de magnesi

Clorur potàssic

Clorur sòdic

Clorur de zinc

2,4-dinitrofenilhidrazina

Etilendiaminotetracetat sòdic (EDTA-Na)

Etanol

Formaldehid 37%

Fosfat dipotàssic

Fosfat monopotàssic

Fosfat disòdic

Fosfat monosòdic

Glicina

Gluconat sòdic

Glucosa

Hidroclorur de semicarbazida

Hidròxid sòdic

Iode resublimat

Iodur potàssic

2-mercaptoetanol

Piruvat sòdic
 D,L-propandiòl
 Propionaldehid
 Sacarosa
 Succinat sòdic
 Sulfat amònic
 Sulfat de coure
 Sulfat ferrós
 Sulfat magnèsic
 Tartrat sòdic potàssic

MILES LABORATORIES LTD. Stoke Poges, Slough, Anglaterra.

Adjuvant de Freund Complet
 Adjuvant de Freund Incomplet
 Proteasa V8 de S.aureus

MONTPLET I ESTEBAN (reactius PANREAC), Barcelona.

Àcid acètic glacial p.
 Àcid cítric
 Àcid clorhídric p.
 Àcid tricloroacètic p.
 Alcohol etílic p.
 Alcohol isopropílic p.
 Bisulfit sòdic
 Carbó actiu NORIT A
 Hidròxid amònic 36%
 Nitrat de plata

PHARMACIA FINE CHEMICALS. Uppsala, Suècia.

Blau dextrà 2000
 DEAE-sephadex A-50
 Pharmalytes pH 2,5-5
 pH 4-6,5
 pH 3-10

P.L. BIOCHEMICALS GmbH. St. Goar, R.F. Alemanya.

Agarosa-hexà-NAD (AGNADTM) Type 1.

SIGMA CHEMICAL Co. St. Louis, Mo. E.U.A.

Àcid sulfònic
 Agarosa (de baixa electroendosmosis)

D,L-alanina
Albúmina sèrica bovina
Alcohol deshidrogenasa de llevat
L-arginina
L-asparagina
L-aspàrtic
Benzamidina
Blau de nitrotetrazoli
Catalasa
L-cisteïna
Ditioteitrol (DTT)
Dowex 1 x 8 100
Dowex 50 x 8 50
Fenacina metasulfat
L-fenilalanina
Fluorur de fenilmetilsulfonil (PMSF)
L-fucosa
L-gliceraldehid
Glicerol
Glicolaldehid
L-glutàmic
L-glutamina
p-hidroximercuribenzoat
L-histidina HCl
L-isoleucina
Kanamicina sulfat
L-leucina
Leupeptina
L-lisina
Marcadors de baix pes molecular per a electroforesi
Metilglioxal
L-metionina
NAD àcid grau III
NAD àcid grau V
NADH, sal sòdica grau III
Ninhidrina
Ovoalbúmina
L-prolina

L-ramnosa
Reactiu de Folin
L-serina
L-tirosina
L-treonina
L-triptòfan
Tris (hidroximetil) aminometà (Tris)
Triton X-100
L-valina

WHATMAN.

Paper whatman chroma nº 1
Paper whatman chroma nº 3

WORTHINGTON BIOCHEMICAL Co. Freehold, N.Jersey, E.U.A.

α -quimotripsina.

3. RESULTATS

3.1. ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDROGENASA EN EXTRACTES CEL·LULARS D' E. COLI.

Donat que hi ha dades en la literatura referents als nivells d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli tipus salvatge quan creix en hidrolitzat de caseïna i fucosa (68) i de mutants capaços d'utilitzar 1,2-propandiòl com a ùnica font de carboni i energia (32), es va creure d'interès analitzar l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa en extractes cel·lulars de diverses soques d'E.coli fetes créixer en diferents medis i condicions per tal de caracteritzar més profundament aquesta activitat enzimàtica.

Per a realitzar aquest estudi es van utilitzar les següents soques d'E.coli : la soca 1 (tipus salvatge), E.coli ATCC nº e25404, la soca 3 i la soca 40, les quals van ésser cultivades en diferents medis i condicions d'oxigenació del cultiu. Es preparaven els extractes cel·lulars tal com es descriu a l'apartat 2.3, on s'assajava l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa. Els resultats, que es mostren a la taula 3, indicaven que l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli és semi-constitutiu, presentant nivells basals d'activitat enzimàtica en medis com glicerol i succinat.

En la soca 1, l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa era induïda pel creixement aeròbic en L-fucosa i L-ramnosa; i en la soca 3 pel creixement en 1,2-propandiòl. També era induïda en ambdues soques per l'hidrolitzat de caseïna, encara que en menor proporció .

Com es pot veure, la lactaldehyd deshidrogenasa és un enzim bàsicament aeròbic, no detectant-se nivells d'activitat

TAULA 3.

ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDROGENASA EN EXTRACTES CEL·LULARS D'E. COLI EN DIFERENTS MEDIS I CONDICIONS DE CREIXEMENT.

Font de carboni	condició de creixement	ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDROGENASA ^{A)}			
		Soca 1	<u>E. coli</u> · ATCC	soca 3	soca 40
Glucosa	+O ₂	40	30	40	N. D. ^{B)}
Glicerol	+O ₂	100	50	80	-
Succinat	+O ₂	110	-	-	-
CAA ^{C)}	+O ₂	220	85	175	N. D.
CAA ^{C)}	-O ₂	7	-	-	-
Fucosa	+O ₂	360	103	-	-
Fucosa	-O ₂	20	-	-	-
Ramnosa	+O ₂	340	100	-	N. D.
Ramnosa	-O ₂	25	-	-	-
1,2-propandiol	+O ₂	-	-	280	-

A) Mesurada tal com es descriu a 2.4.1 sobre glicolaldehid 1 mM, i expressada en mU/mg

B) No detectable

C) Hidrolitzat de caseïna.

apreciables en els creixements anaeròbics en presència de fonts de carboni inductores (hidrolitzat de caseïna, L-fucosa i L-ramnosa).

La soca 40, mutant deficient en lactaldehyd deshidrogenasa, no mostrava activitat en cap de les condicions de creixement provades.

La soca tipus salvatge utilitzada al llarg d'aquest treball fou la soca 1 (apartat 2.1). Per tal de comparar els resultats obtinguts amb una altra soca d'E.coli no manipulada prèviament en el laboratori, es va fer créixer la soca d'E.coli ATCC n^oe25404 aeròbicament en glucosa, glicerol, hidrolitzat de caseïna, ramnosa i fucosa. Els nivells d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa trobats per a aquesta soca responen al mateix tipus d'inducció que a la soca 1, si bé són més baixos, encara que proporcionalment (taula 3).

La inducció de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa pel creixement aeròbic en L-fucosa i L-ramnosa era del mateix ordre, resultat congruent donat que tots dos sucres comparteixen el metabolisme del L-lactaldehyd. Aquest aldehyd és també intermediari en el metabolisme del 1,2-propandiol en soques mutants d'E.coli (la soca 3).

La inducció observada pel creixement aeròbic en presència d'hidrolitzat de caseïna va sorprendre en un principi, ja que aquests nivells d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa en els extractes cel.lulars de la soca 1 i de la soca 3 eren considerats basals pels autors corresponents en els estudis

realitzats sobre el metabolisme de la L-fucosa i del 1,2-propandiol (68, 32).

Per a rebutjar la possibilitat de que la inducció enzimàtica observada en presència de l'hidrolitzat de caseïna fós deguda a determinades impureses del preparat comercial, es preparà un medi sintètic que contenia els 20 aminoàcids en les proporcions citades a 2.2. El creixement aeròbic de la soca 1 en presència d'aquesta barreja d'aminoàcids al 0,5% produïa el mateix grau d'inducció de l'activitat lactaldehydeshidrogenasa que el preparat comercial d'hidrolitzat de caseïna (unes 2,5 vegades), tot indicant que la inducció era deguda al metabolisme d'algun dels aminoàcids presents.

Per tal d'esbrinar quin dels aminoàcids era el responsable de la inducció esmentada, i donat que E.coli no és capaç d'utilitzar determinats aminoàcids com a font de carboni i energia (71), es preparà un sistema adient per a detectar la inducció enzimàtica (178).

Es feia créixer, en diversos matrassos, la soca desitjada (la soca 1) aeròbicament en un medi no inductor com és el glicerol, fins a una densitat òptica de 3 mesurada a 420 nm. En aquest punt, s'hi afegia l'aminoàcid a estudi per tal de quedar a la concentració de 60 mM carboni en el medi de cultiu. Es preparava un control negatiu de la inducció, al qual no s'hi afegia cap aminoàcid i un control positiu al qual s'hi afegia la barreja dels 20 aminoàcids al 0,5%. Es deixava 5 hores en agitació a 37°C i posteriorment es recollien les cèl·lules per centrifugació per a preparar els extractes cel·lulars tal com es descriu a 2.3.

Seguint aquest protocol es van provar els 20 aminoàcids individualment, i de tots ells, només s'observà inducció de la activitat lactaldehyd deshidrogenasa per glutamat i glutamina (taula 4). Donat que la glutamina és desaminada en un primer pas a glutamat, és el metabolisme d'aquest darrer aminoàcid el responsable de la inducció esmentada.

TAULA 4

INDUCCIÓ DE L'ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDROGENASA PER
GLUTAMAT EN LA SOCA 1.

Font de carboni	Addició	Activitat ^{A)} enzimàtica
Glicerol	-	60
Glicerol	barreja 20 aminoàcids	230
Glicerol	glutamat	180
Glicerol	glutamina	215

A) Activitat lactaldehyd deshidrogenasa mesurada segons es descriu a l'apartat 2.4.1 sobre glicolaldehyd 1 mM, i expressada en mU/mg.

3.2. PURIFICACIÓ A HOMOGENEITAT DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA .

El mètode de purificació de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa havia estat posat a punt en el nostre laboratori amb anterioritat a aquest treball (20), tanmateix no rendia preparacions homogènies.

El mètode, detallat a l'apartat 2.5, incluïa les següents etapes :

- Obtenció de l'extracte cel.lular.
- Precipitació fraccionada amb sulfat amònic entre el 50 i el 75% de saturació.
- Cromatografia de bescanvi aniònic en DEAE-sephadex.
- Cromatografia d'afinitat en agarosa-NAD. Aquest pas millorava molt el procés de purificació.
- Cromatografia de gel-filtració en Ultrogel ACA-34.

En la taula 5 s'aprecia el grau de purificació assolit en cadascuna de les etapes. Normalment, la lactaldehyd deshidrogenasa es purificava unes 90 vegades, amb un rendiment final del 20%.

Les preparacions enzimàtiques obtingudes a través d'aquest mètode no eren homogènies, ja que en electroforesis en gels de poliacrilamida en presència de SDS donaven al ésser tintades amb Blau Brillant de Coomassie dues bandes, una majoritària de 55.000 daltons i una minoritària de mida més petita (figura 10).

La purificació portada a terme en presència dels següents inhibidors de proteases : leupeptina 0,5 μ M, benzamidina 1mM i PMSF 0,5 mM, va rendir la mateixa preparació, amb idèntic

patró electroforètic, fet que descartà la possibilitat de que la banda minoritària fós un producte de proteòlisi de l'enzim natiu.

Per tal de separar la banda contaminant, s'introduf un últim pas de purificació provant d'altres tècniques. L'isoelectroenfoc preparatiu en gels de sephadex (Ultrodex^R) (43, 127, 128) no donà els resultats esperats. La precipitació per afinitat amb Bis-NAD (N_2, N_2' -adipodihidrazido-bis-(N^6 -carbonilmetil-NAD) (53, 99) en diferents condicions de pH i força iònica del medi donà també un resultat negatiu. No s'aconseguf precipitar la lactaldehyd deshidrogenasa, fet que també està descrit per l'alcohol deshidrogenasa hepàtica (53).

L'homogeneïtat de la preparació enzimàtica s'aconseguf mitjançant una cromatografia en hidroxapatita. En la literatura hi ha dades referents a la utilització d'aquest tipus de cromatografia en la purificació de deshidrogenases (22, 51, 93, 159).

La cromatografia en hidroxapatita es provà com a últim pas en el procés de purificació de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa després de la cromatografia de gel-filtració en Ultrogel ACA-34. Malgrat tot, s'assolia el mateix grau de puresa si s'acoplava després de la cromatografia d'afinitat en agarosa-NAD. Per tant, s'escollí aquesta segona opció que permetia eliminar la cromatografia de gel-filtració amb l'avantatge d'evitar pèrdues d'activitat per dilució de l'enzim en la gel-filtració i pèrdues de rendiment a l'hora de col·lectar les fraccions actives d'aquesta columna.

FIGURA 9. CROMATOGRAFIA EN HIDROXIAPATITA.

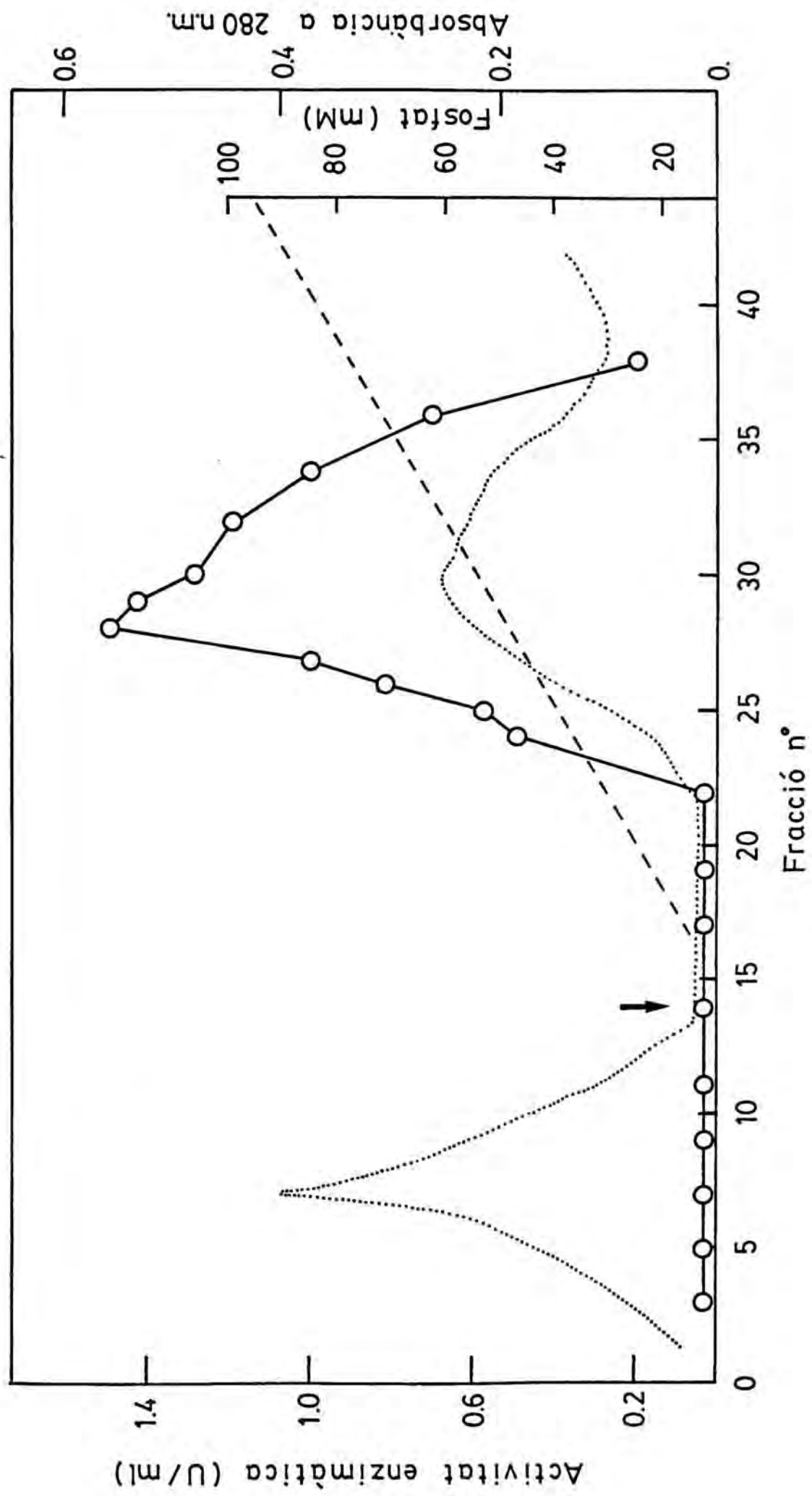
La mostra aplicada era la fracció corresponent a la cromatografia d'afinitat concentrada i dialitzada.

La cromatografia es desenvolupà segons es descriu a 3.2.

L'elució de proteïna es seguia per mesura de l'absorbància a 280 nm (.....).

L'elució de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa (o-o-o) s'aconseguí amb un gradient lineal de fosfat sòdic entre 10 i 100 mM (- - -).

La fletxa indica el moment en que s'aplicà el gradient.



La fracció corresponent a la cromatografia d'afinitat era concentrada per ultrafiltració fins a un volum aproximat de 2 ml en un concentrador Amicon emprant una membrana del tipus PM-10. Posteriorment, per a eliminar el NAD^+ , era dialitzada en front d'una solució amortidora de pH de fosfat sòdic 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,3, a la que s'addicionava DTT 1 mM a fi de protegir l'activitat d'aquesta preparació enzimàtica de baixa concentració proteïca.

La mostra dialitzada era aplicada a una columna d'hidroxiapatita (2 x 2 cm) equilibrada amb amortidor fosfat sòdic 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3. Després de rentar exhaustivament la columna amb el mateix amortidor, l'elució de l'enzim lactaldehid deshidrogenasa s'aconsegua mitjançant un gradient lineal de fosfat sòdic entre 10 i 100 mM, en 50 ml . El flux era de $3 \text{ ml} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ al llarg de tot el procés cromatogràfic. L'elució de proteïna es seguia per mesura de l'absorbància a 280 nm. En les fraccions col·lectades (1,5 ml) s'assajava l'activitat lactaldehid deshidrogenasa (figura 9).

Donat que l'enzim eluia a una concentració de fosfat sòdic entre 30 i 40 mM, rutinariament, la recuperació de la lactaldehid deshidrogenasa retinuda a la columna d'Hidroxiapatita es feia per un "cop" de fosfat sòdic a 35 mM. La proteïna contaminant eluia a una concentració de fosfat de l'ordre de 60 mM, per tant no hi havia interferències en aquest sentit.

A la taula 5 es mostren les dades referents al procés de purificació de la lactaldehid deshidrogenasa, on cal re-

TAULA 5

PURIFICACIÓ DE L'ENZIM LACTALDEHID DESHIDROGENASA D'E. COLI.

	Proteïna (mg)	Activitat específica (U/mg)	Vegades de purificació	Rendiment (%)
Extracte cel.lular	2125	0,115	1	100
Sulfat amònic	420	0,335	3	93
DEAE-sephadex	64	0,960	9	58
Agarosa-NAD	4	4,950	44	36
Gel-filtració	0,9	10,5	91	20
----- Hidroxiapatita A)	2	14,0	120	17

A) la cromatografia en hidroxiapatita permet eliminar el pas anterior: la gel-filtració.

saltar la millora aconseguida amb la utilització de la cromatografia en hidroxapatita. S'obtenen preparacions enzimàtiques amb una activitat específica de 14 U/mg (120 vegades de purificació) i un rendiment del 17%.

L'enzim lactaldehid deshidrogenasa purificat a partir de creixements aeròbics en hidrolitzat de caseïna, tant de la soca 1 com de la soca 3, seguia el mateix comportament al llarg de tot el procés, manifestant-se indidtingibles des d'aquest punt de vista.

3.2.1. CRITERIS D'HOMOGENEITAT.

La preparació enzimàtica de lactaldehid deshidrogenasa d'E.coli purificada emprant la cromatografia en hidroxapatita com a últim pas del procés era homogènia des dels següents criteris :

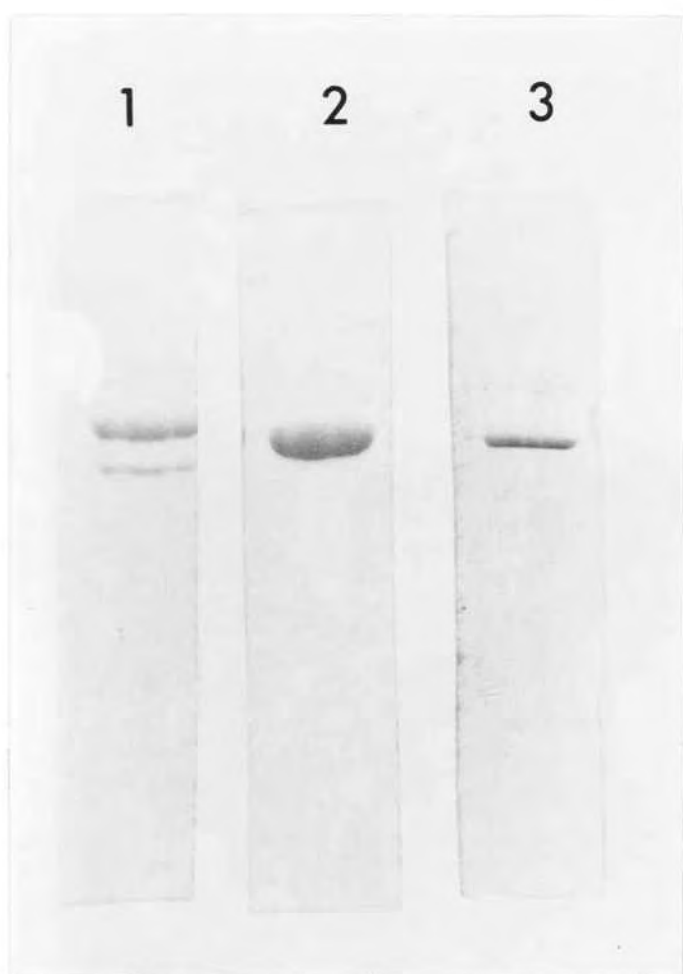
- L'electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS de 25 µg de lactaldehid deshidrogenasa purificada donava una única banda de proteïna amb Blau Brillant de Coomassie (figura 10). El mateix resultat s'obtenia al revelar per tinció argèntica 1 µg de l'enzim purificat i sotmès a separació electroforètica en condicions desnaturalitzants (figura 10).

- L'enfoc analític en gels d'acrilamida de 15 µg d'enzim purificat donava una única banda a l'esser revelat ja per proteïna amb Blau Brillant de Coomassie, ja per activitat enzimàtica (figura 14).

- L'electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions no desnaturalitzants de 70 µg de lactaldehid deshidrogenasa

FIGURA 10. ELECTROFORESI EN GELS DE POLIACRILAMIDA-SDS DE PREPARACIONS PURIFICADES DE LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

- 1) 20 μg de la preparació purificada fins a la gel filtració, revelats amb Blau Brillant de Coomassie.
- 2) 25 μg de la preparació purificada usant la cromatografia en hidroxiapatita, revelats amb Blau Brillant de Coomassie.
- 3) 1 μg de la mateixa preparació purificada que 2), però el revelat es va fer tinció argèntica.



purificada donava una única banda d'activitat enzimàtica.

3.2.2. ESTABILITAT

L'enzim es mostrà altament inestable en absència d'agents reductors al llarg del procés de purificació, sobretot en les diàlisis on la pèrdua d'activitat era considerable. La incorporació del 2-mercaptoetanol a l'amortidor emprat en la purificació solventà aquest problema, però tanmateix l'estabilització no era total, ja que la pèrdua d'activitat enzimàtica en els processos de diàlisi era encara del 10%.

La inactivació era més marcada en les últimes etapes del procés de purificació, on la concentració de proteïna de la preparació enzimàtica era més baixa, perdent-se l'efecte estabilitzador de les proteïnes contaminants. Això va conduir a l'addició de DTT 1 mM a la última diàlisi del procés (a més del 2-mercaptoetanol ja present), abans de la cromatografia en hidroxapatita i a la preparació purificada per a ésser emmagatzemada.

L'efecte estabilitzador de les proteïnes contaminants també es posà de manifest en els processos de congelació-descongelació, on la preparació resultava bastant estable en els primers passos (extracte cel.lular, sulfat amònic, etc), però, si no s'hi afegia res més, la preparació de la gel-filtració perdia el 90% de la seva activitat enzimàtica després de 48 hores congelada a -40°C .

La presència d'EDTA en les solucions amortidores de pH era necessària per a evitar la inactivació de l'enzim per

ions divalents (veure 3.3.2.4). L'enzim era inactivat quasi totalment en les cromatografies de gel-filtració en Ultrogel ACA-34 en absència d'EDTA.

El NAD^+ present en la preparació eluïda de la cromatografia d'afinitat tenia un efecte estabilitzador o protector de l'activitat enzimàtica.

El problema principal era l'emmagatzematge de l'enzim purificat a homogeneïtat. Després de provar diversos estabilitzadors (glicerol, albúmina, DTT) i diferents condicions (-20°C -80°C) es va optar per repertir l'enzim homogèni en alíquotes de 250 μl a les que s'addicionava glicerol per tal de quedar al 20% i DTT 1 mM, i es guardaven a -20°C (67,79). En aquestes condicions, al cap d'un mes, l'activitat enzimàtica era encara del 90%.

3.3. CARACTERITZACIÓ DE L'ENZIM LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

3.3.1. CARACTERITZACIÓ MOLECULAR.

3.3.1.1. DETERMINACIÓ DEL PES MOLECULAR DE L'ENZIM NATIU.

El pes molecular de la lactaldehyd deshidrogenasa nativa es va determinar per gel-filtració (3,4), emprant una columna (1,5 x 95 cm) d'Ultrogel ACA-34 equilibrada i eluïda amb fosfat sòdic 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3 (flux $6 \text{ ml} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$). La mostra usada era una preparació purificada guardada amb glicerol 20% i DTT 1 mM a -20°C. S'utilitzaren les següents proteïnes marcadores : ovoalbúmina(43.000 daltons), alcohol deshidrogenasa de llevat (126.000 daltons), lactat deshidrogenasa de múscul de conill (140.000 daltons) i catalasa (240.000 daltons).

D'acord amb el volum d'elució obtingut per a la lactaldehyd deshidrogenasa es va determinar un pes molecular de 220.000 daltons (figura 11), tant per l'enzim de la soca 1 com pel de la soca 3.

3.3.1.2. DETERMINACIÓ DEL PES MOLECULAR DE LES SUBUNITATS.

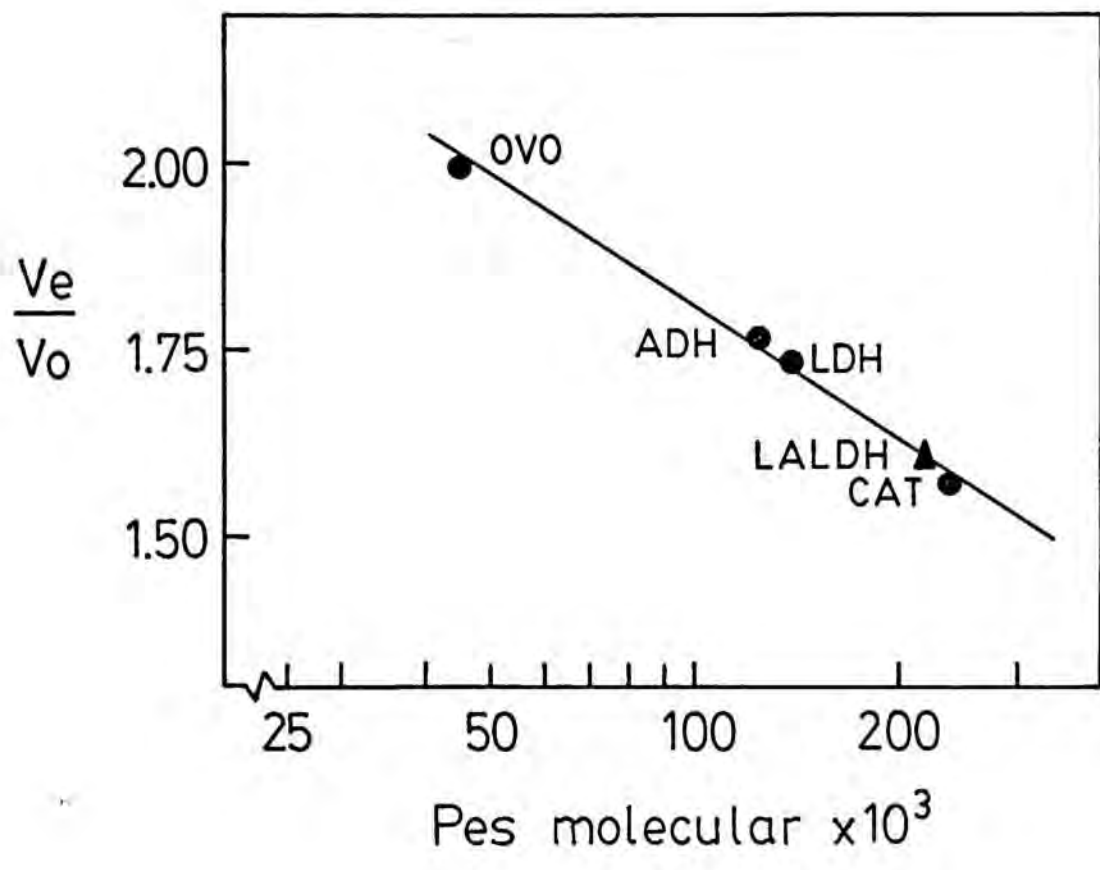
El pes molecular de les subunitats de l'enzim es va determinar per electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions dissociants. El desenvolupament de la tècnica, així com el tractament de les mostres s'indica a l'apartat 2.8.1. Es van emprar els següents marcadors protèics : inhibidor de tripsina de soja (20.000 daltons), tripsinògen (24.000 daltons),

FIGURA 11. DETERMINACIÓ DEL PES MOLECULAR DE LA LACTAL-
DEHID DESHIDROGENASA (LALDH) NATIVA PER CRO-
MATOGRAFIA DE GEL-FILTRACIÓ.

La recta de calibració es va obtenir repre-
sentant els valors V_e/V_o (volum d'elució/volum
buit) en front del pes molecular de cada una
d'aquestes proteïnes:

- OVO: ovoalbúmina (43.000 daltons)
- ADH: alcohol deshidrogenasa de llevat (126.000
daltons)
- LDH: lactat deshidrogenasa de muscul de conill
(140.000 daltons)
- CAT: catalasa (240.000 daltons)

El pes molecular de la LALDH es va determi-
nar interpolant el seu V_e/V_o a la recta.



anhidrasa carbònica (29.000 daltons), gliceraldehid-3-P-des-hidrogenasa (36.000 daltons), ovoalbúmina (45.000 daltons), albúmina sèrica bovina (66.000 daltons) i fosforilasa b de múscul de conill (96.000 daltons). A partir de la mobilitat de la lactaldehyd deshidrogenasa es va calcular un pes molecular de 55.000 daltons (figura 12).

Relacionant aquest valor amb l'obtingut per a la proteïna nativa es proposa una estructura tetramèrica per a l'enzim, format per subunitats aparentment iguals al menys de mida.

Cal resaltar que la lactaldehyd deshidrogenasa de la soca 3 i la de la soca 1 presenten la mateixa mobilitat electrofo-rètica en gels de poliacrilamida-SDS (figura 13).

3.3.1.3. DETERMINACIÓ DEL PUNT ISOELÈCTRIC.

La determinació del punt isoelèctric de l'enzim lactal-dehid deshidrogenasa es va fer per electroenfoc en gels de poliacrilamida (veure 2.8.4), emprant un gradient de pH entre 3 i 6.

L'enzim purificat donava una única banda, tant per re-velat de proteïna com per revelat d'activitat enzimàtica, co-rresponent a un punt isoelèctric de 4,6 (figura 14).

3.3.1.4. COMPOSICIÓ D'AMINOÀCIDS.

La determinació de la composició d'aminoàcids de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa va ésser feta en el Servei d'Anà-lisi de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barce-lona.

FIGURA 12. DETERMINACIÓ DEL PES MOLECULAR DE LES SUB-UNITATS DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

Aquesta determinació es va fer per electroforesi en gels de poliacrilamida al 10% en presència de SDS i emprant les següents proteïnes marcadores :

- INH TR: inhibidor de tripsina (20.000 daltons)
- TRP: tripsinògen (24.000 daltons)
- AC: anhidrasa carbònica (29.000 daltons)
- G-3PDH: gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (36.000 daltons)
- OVO: ovoalbúmina (45.000 daltons)
- BSA: albúmina sèrica bovina (66.000 daltons)
- Phb: fosforilasa b de muscul de conill (97.400 daltons)

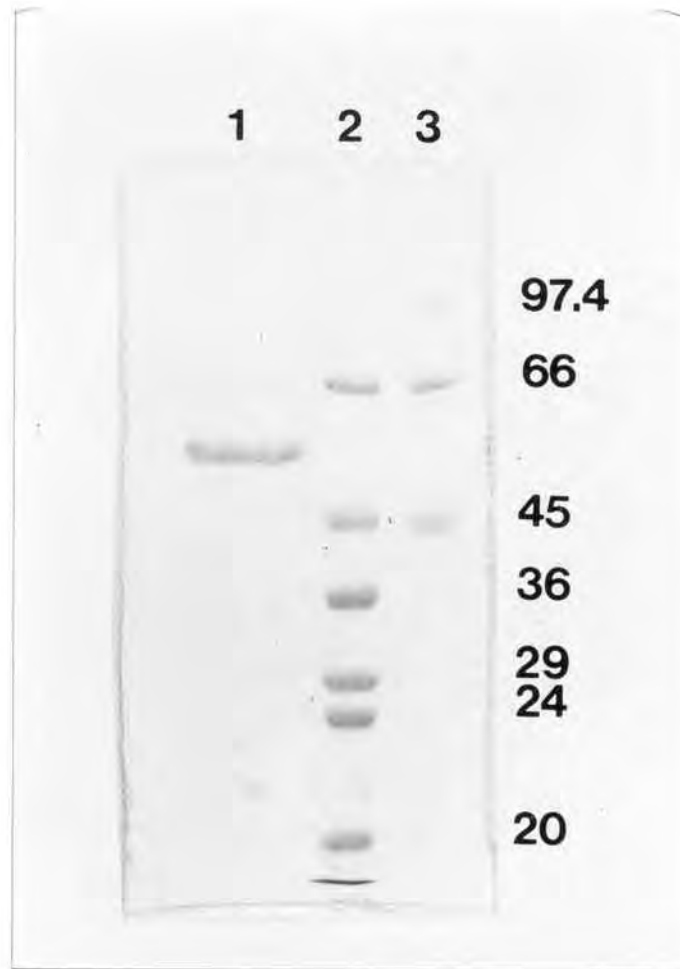
A) 1: 25 µg de lactaldehyd deshidrogenasa purificada usant la cromatografia en hidroxapatita

2 i 3 : proteïnes marcadores

El tintat del gel es va fer amb Blau Brillant de Coomassie

B) Es representen les mobilitats relatives, respecte al front de blau de bromfenol, de les proteïnes marcadores envers llurs pesos moleculars. Interpolant el valor obtingut per a la lactaldehyd deshidrogenasa (LALDH) s'obtingué un pes molecular de 55.000 daltons.

A



B

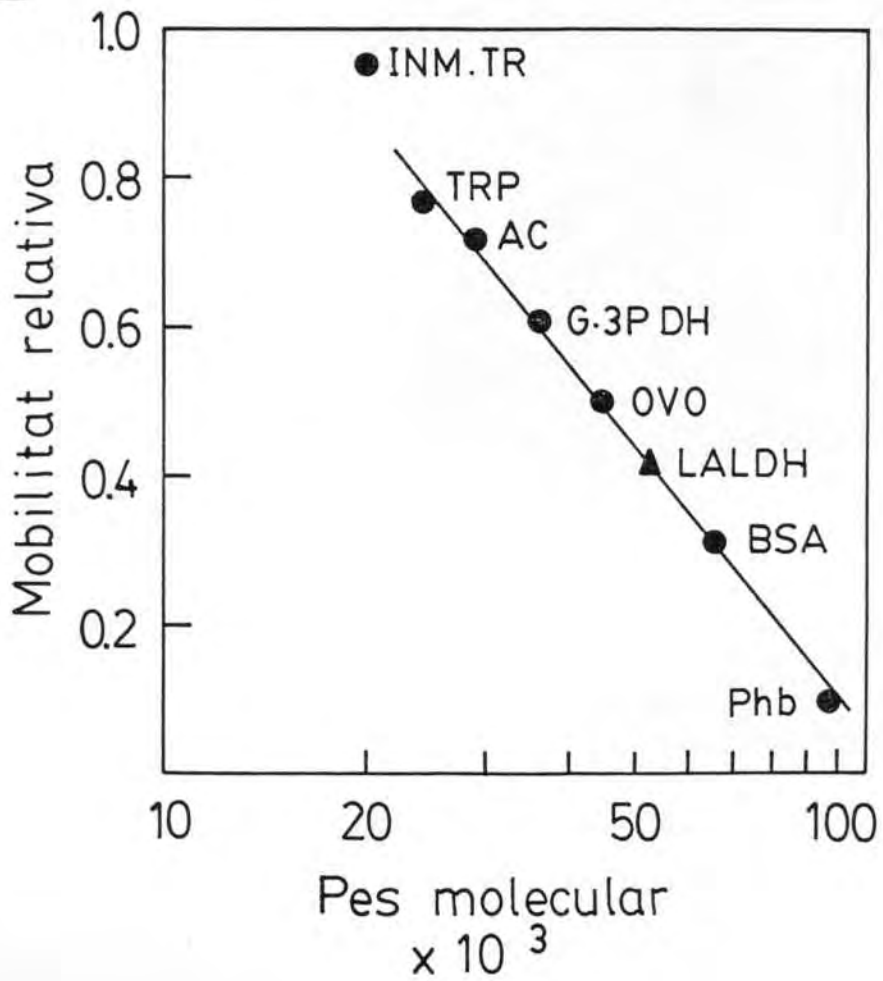


FIGURA 13. ELECTROFORESI EN GELS DE POLIACRILAMIDA-SDS DE L'ENZIM LACTALDEHID DESHIDROGENASA PURIFICAT DE DIFERENTS SOQUES D'E. COLI.

1: 15 μ g d'enzim purificat de la soca 1

2: 20 μ g d'enzim purificat de la soca 3

3: 20 μ g d'enzim purificat de la soca JA-102

La tinció es va fer amb Blau Brillant de Coomassie.

1

2

3

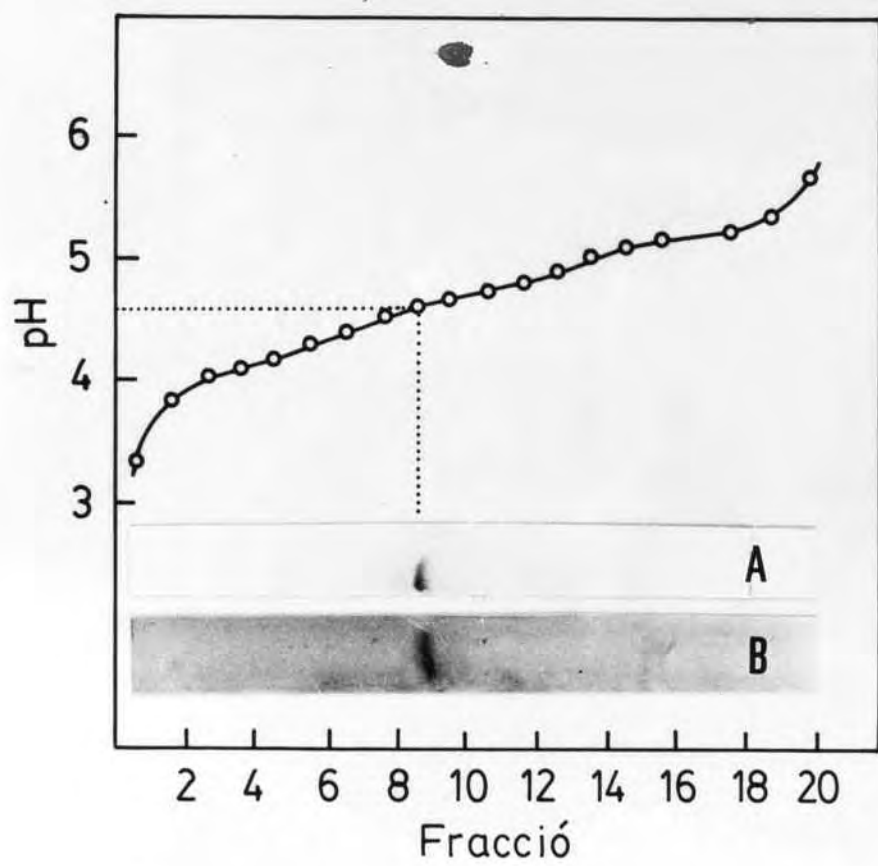


FIGURA 14. DETERMINACIÓ DEL PUNT ISOELÈCTRIC DE LA
LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

Representació del gradient de pH de l'e-
lectroenfoc analític, en gels de poliacrilami-
da al 5%.

En ordenades s'assenyalen els valors de
pH (entre 3 i 6) i en absisses les fraccions
del gel.

- A) 15 μ g d'enzim purificat, revelats per tin-
ció amb Blau Brillant de Coomassie.
- B) 15 μ g d'enzim purificat, revelats per acti-
vitat enzimàtica.



L'enzim purificat, homogèni, fou processat i hidrolitzat com es descriu a l'apartat 2.10 i portat al Servei d'Anàlisi ja esmentat on es realitzà la separació i quantificació dels aminoàcids.

A la taula 6 s'expressen els resultats com a mol d'aminoàcid per mol de proteïna enzimàtica, tenint en compte un pes molecular de 220.000 daltons. També s'ha fet un càlcul dels mols d'aminoàcid per subunitat de pes molecular 55.000 daltons, assumint que totes quatre fossin idèntiques.

Les dades presentades són la mitjana dels valors obtinguts als tres temps d'hidròlisi -24, 48 i 72 hores- amb HCl 6 N, llevat de la serina, treonina i tirosina que són els extrapolats a temps zero i dels aminoàcids hidrofòbics (isoleucina i valina) que són els valors màxims (47,54,110).

Els valors de cisteïna i triptòfan s'han obtingut a partir d'una hidròlisi més suau amb triptamina i àcid p-toluen-sulfònic (apartat 2.10.1.2).

3.3.1.5. ESPECTRE D'ABSORCIÓ I CONTINGUT DE COENZIM (NAD^+).

L'espectre d'absorció des de 200 a 700 nm de la lactal-dehid deshidrogenasa purificada a homogeneïtat i dialitzada durant una nit en front de solució amortidora de pH de fosfat sòdic 10 mM, pH 7,0, es mostra a la figura 15A. La relació d'absorbàncies $280 : 260 = 1,54$ indica l'existència de petites quantitats de NAD^+ lligat a l'enzim, la qual cosa és també corroborada pel màxim d'absorció a 278 nm.

TAULA 6

COMPOSICIÓ D'AMINOÀCIDS DE L'ENZIM LACTALDEHID DESHIDROGENASA D'E. COLI.a)

Aminoàcid	mol aa/mol prot.	mol aa/subunitat
Aspàrtic	155,7	35,6
Treonina b)	90,0	22,5
Serina b)	62,0	15,5
Glutàmic	224,0	56,0
Prolina	75,6	18,9
Glicina	172,0	43,0
Alanina	206,0	51,5
Valina c)	130,3	32,6
Metionina	7,96	1,99
Isoleucina c)	116,2	29,0
Leucina	121,2	30,3
Tirosina b)	42,0	10,5
Fenilalanina	59,6	14,9
Histidina	28,8	6,7
Lisina	84,8	21,2
Arginina	96,8	24,2
Triptòfan d)	9,6	2,4
Cisteïna d)	6,0	1,5

a) Els valors presentats són els de l'enzim purificat de la soca 1.

b) Dades obtingudes extrapolant a temps zero.

c) Valor màxim.

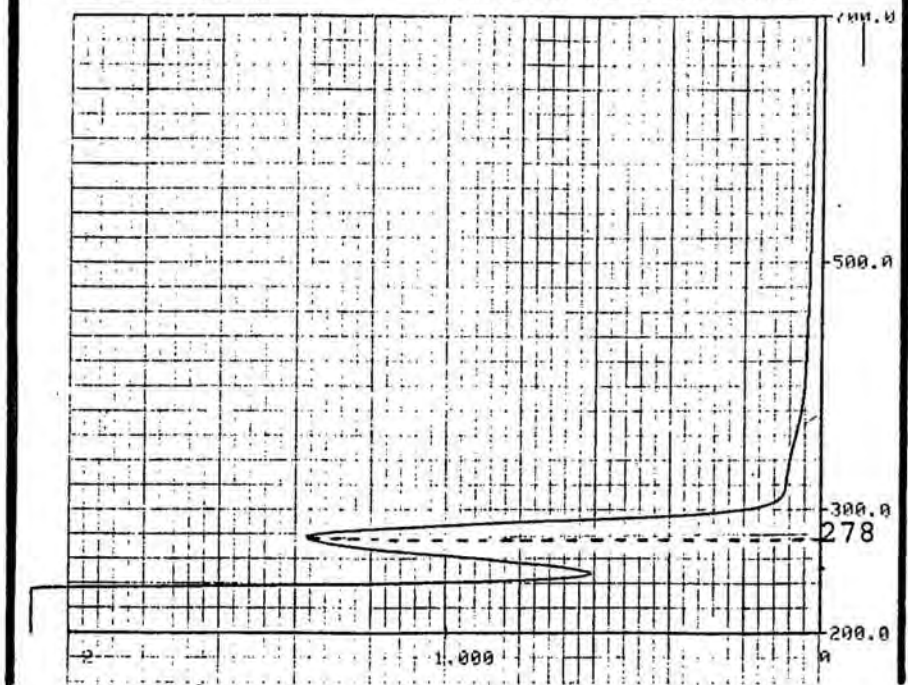
d) Dades obtingudes a partir de la hidròlisi amb triptamina i àcid p-toluen sulfònic, a 110°C, durant 24 hores.

- El reste de dades és la mitjana dels tres valors obtinguts als diferents temps d'hidròlisi amb HCl 6 N (24, 48 i 72 hores).

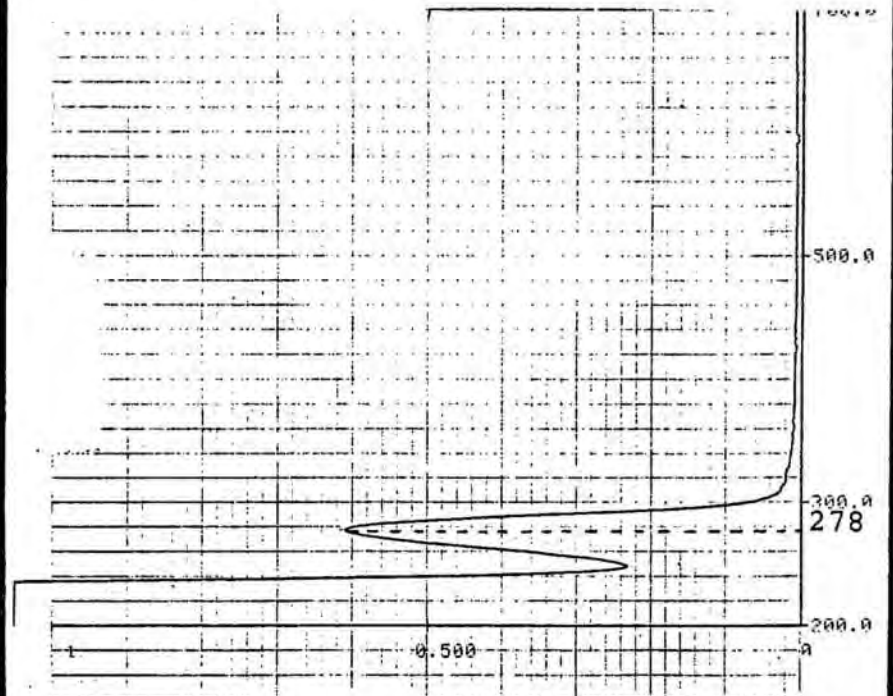
FIGURA 15. ESPECTRES D'ABSORCIÓ DELS COMPLEXES LACTALDEHID DESHIDROGENASA-NAD⁺.

- A) Lactaldehid deshidrogenasa purificada i dialitzada una nit en front de fosfat sòdic 10 mM, pH 7,0.
- B) Lactaldehid deshidrogenasa tractada amb una resina de carbó activat tipus NORIT A
- C) Lactaldehid deshidrogenasa que ha incorporat 4 mols de NAD⁺ per mol d'enzim.

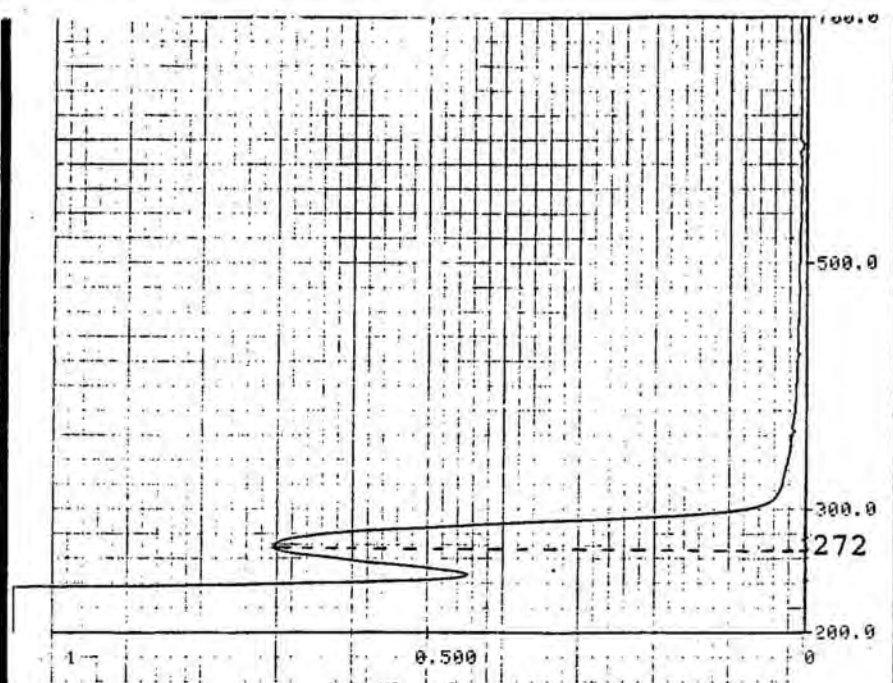
A



B



C



La relació d'absorbàncies 280 : 260 augmentava a 1,82 quan l'enzim era tractat amb NORIT A per tal de descarregar-lo totalment de coenzim. L'espectre d'absorció de l'enzim tractat amb carbó actiu es mostra a la figura 15B , on s'indica el màxim d'absorció corresponent a 278 nm.

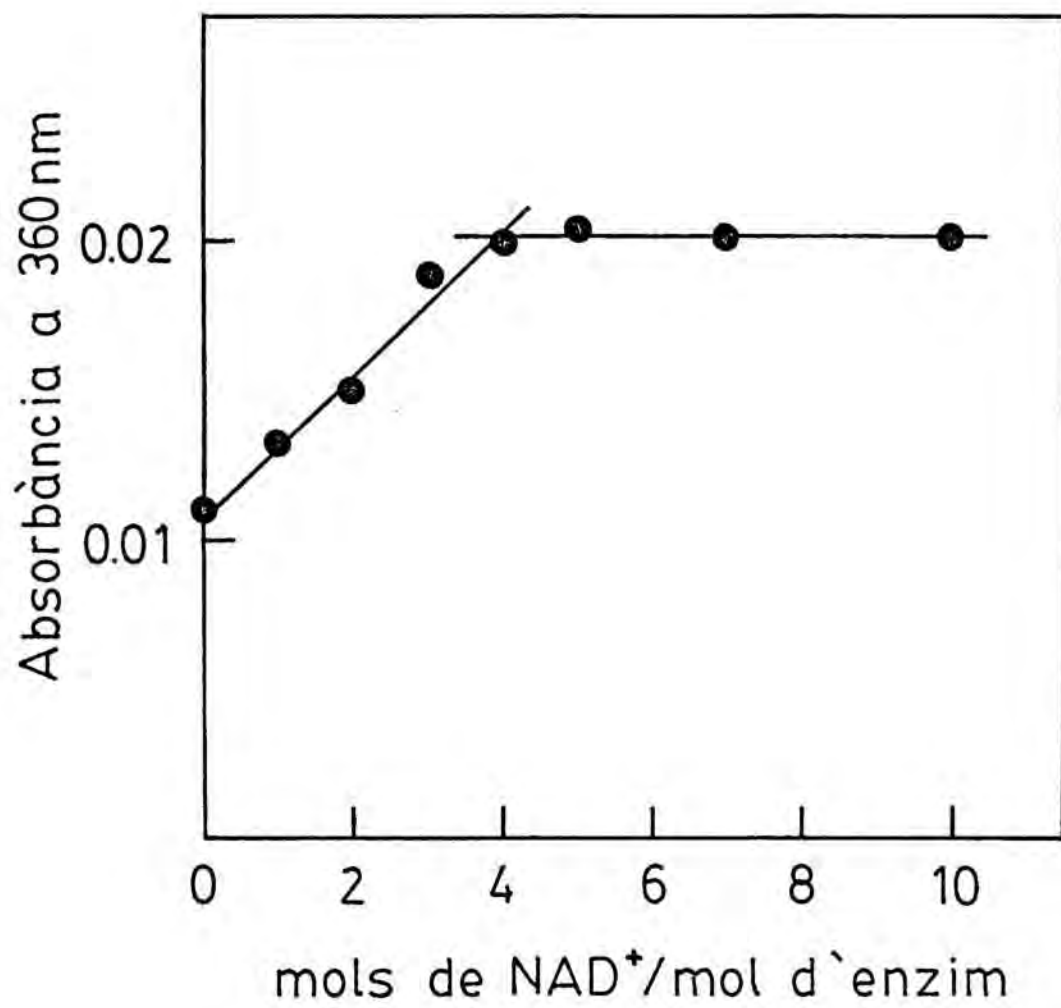
Quan l'enzim era carregat amb NAD^+ , la relació 280 : 260 era de 1,15, la λ màxima baixava a 272 nm i apareixia una àmplia banda d'absorció entre 300 i 400 nm (figura 15C) (36).

L'enzim descarregat de NAD^+ es preparava segons descriuen D'Alessio i col (36). S'addicionaven 10 mg de NORIT A sec per cada mg de proteïna en un volum de solució amortidora de pH entre 0,5-1 ml. Després d'agitar la suspensió, s'incubava durant 2 hores a 20°C. Tot seguit, es centrifugava i el precipitat era rentat amb 1 ml del mateix amortidor. Després de re-centrifugar, es reunien els dos sobrenadants i es clarificaven per una centrifugació final.

La quantitat de coenzim NAD^+ que pot ésser incorporada a l'enzim natiu lactaldehid deshidrogenasa es va determinar per addició creixent de quantitats de NAD^+ a 1 ml de solució amortidora de fosfat sòdic 10 mM, pH 7,0, que contenia 1 mg de proteïna enzimàtica purificada i tractada prèviament amb carbó actiu NORIT A. L'assaig es feia a 23°C i es mesurava la densitat òptica a 360 nm als 10 minuts després de cada addició de NAD^+ , en un espectrefotòmetre de doble feix, termostatitzat SHIMADZU UV 240 (36).

FIGURA 16. TITULACIÓ DE LA INCORPORACIÓ DE NAD^+ A L'ENZIM LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

A 1 ml d'una solució de fosfat sòdic 10 mM pH 7,0, que contenia 1 mg d'enzim purificat i descarregat de NAD^+ per tractament amb NORIT A ($6 \cdot 10^{-3}$ μmol d'enzim) s'addicionaven escalonadament volums de 10 μl d'una solució de NAD^+ 0,6 mM. Tot el conjunt es mantenia a 23 °C i es mesurava l'absorbància a 360 nm, els 10 minuts després de cada addició de NAD^+ .



La figura 16 mostra aquesta titulació, on es pot veure que l'enzim es capaç d'incorporar uns quatre mols de NAD^+ per mol de proteïna enzimàtica, assumint un pes molecular de l'enzim natiu de 220.000 daltons.

3.3.2. CARACTERITZACIÓ CINÈTICA.

L'enzim lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli (E.C.1.1.22.1) catalitza irreversiblement la següent reacció :



Per tal de caracteritzar cinèticament aquest enzim feia falta, lògicament, disposar del substrat i amb un grau de pureza adient. El L-lactaldehyd no és un producte comercialitzat en cap de les seves formes isomèriques (D-, L- i D,L-). Calia per tant obtenir aquest substrat i purificar-lo.

El L-lactaldehyd es sintetitzava a partir de D-treonina per reacció amb ninhidrina (183) segons es descriu a 2.11. Era caracteritzat per cromatografia en paper whatman nº 3 chroma en un sistema de propanol-amoniac (60:40). El posterior revelat amb 2,4-dinitrofenilhidrazina (41) donava una taca de R_f 0,83, si bé en determinades síntesis, apareixia una taca no ben definida de R_f aproximadament 0,65. Per tant, i a fi de tenir un substrat pur, sobretot per a determinar les constants cinètiques de K_m i V_{max} , el L-lactaldehyd era purificat per cromatografia en paper tal com s'indica a l'apartat 2.11.2.

Dades que presentarem a continuació (veure 3.3.2.7) indicaven que l'enzim no era tant específic com descriuen Sridara

i Wu (150). La preparació enzimàtica purificada era capaç d'oxidar altres aldehids estructuralment semblants al lactaldehyd, i que, per tant, presentaven una estructura de α -hidroxialdehids, entre els quals s'inclou el glicolaldehid. També presentava activitat sobre α -cetoaldehids, com és el metilglioal. Segons que sembla, la presència d'un grup hidroxil o cetònic en el carboni adjacent al grup carbonil de l'aldehyd, que serà oxidat enzimàticament, és una característica important o necessària per a ésser substrat de la lactaldehyd deshidrogenasa.

Donat que l'enzim presentava sobre el glicolaldehid una V_{max} més elevada en relació amb els altres aldehids i a la vegada és un producte fàcilment asequible comercialment, molts dels estudis cinètics presentats a continuació s'han fet usant aquest aldehyd com a substrat. En determinats experiments s'ha seguit l'activitat enzimàtica sobre els dos substrats: glicolaldehid i lactaldehyd, el que s'indicarà adientment en cada cas.

Així mateix, el glicolaldehid ha estat emprat rutinàriament com a substrat de l'assaig enzimàtic en extractes cel·lulars dels estudis de regulació de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa que formen part d'aquest treball.

3.3.2.1. pH ÒPTIM.

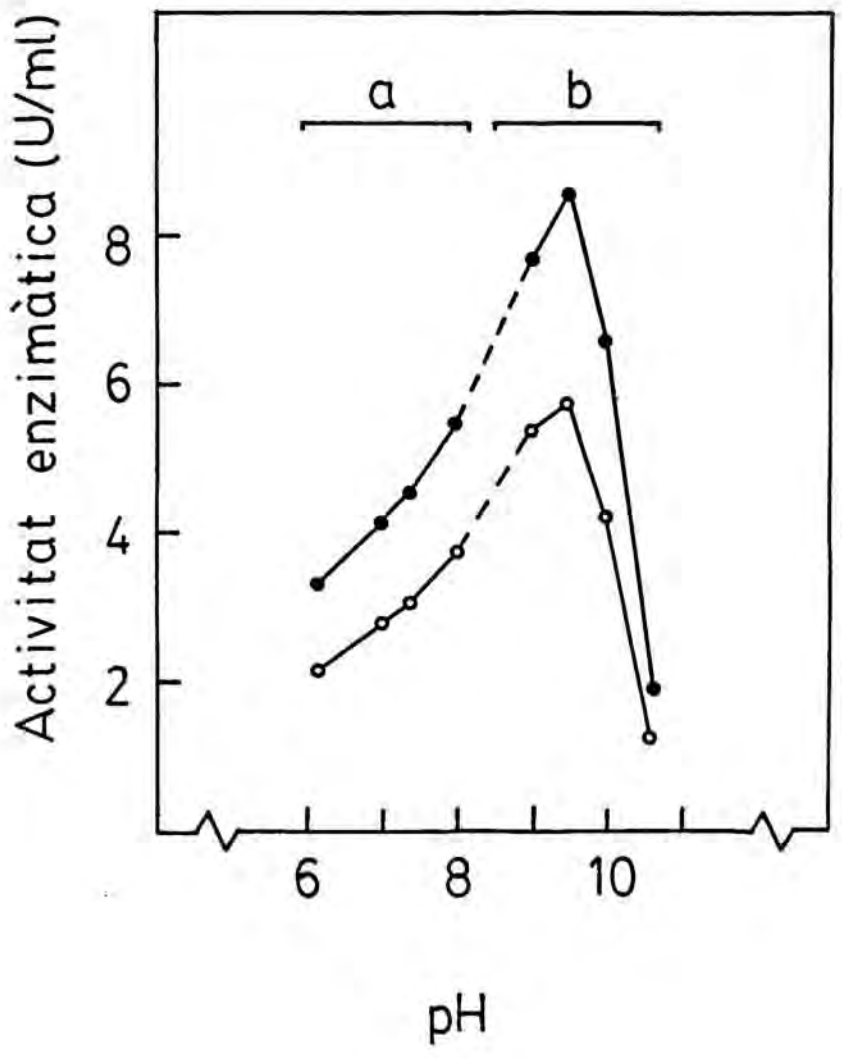
El perfil d'activitat, mesurada tant amb glicolaldehid, com amb lactaldehyd (veure 2.4.2.1) en front del pH presentava un màxim a pH 9,5 (figura 17).

FIGURA 17. EFECTE DEL pH EN L'ACTIVITAT DE L'ENZIM
LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

Una mostra de lactaldehyd deshidrogenasa purificada va ésser assajada sobre glicolaldehid 1 mM (●) i sobre lactaldehyd 0,1 mM (○), en un marge de pH comprés entre 6 i 10,5.

(a) Solució amortidora de pH fosfat sòdic 100 mM

(b) Solució amortidora de pH glicina-NaOH 100 mM



En el marge de pH comprès entre 6 i 8 s'utilitzava la solució amortidora de pH de fosfat sòdic (100 mM) i en el marge comprès entre 8,5 i 11 s'utilitzava amortidor glicina-NaOH (100 mM).

Cal esmentar que a pH alcalí s'obté un increment basal de l'absorbància a 340 nm, independent de la presència d'enzim, com a conseqüència d'una reacció entre el NAD^+ i els aldehids (40,46). Aquest efecte de base, en les nostres condicions d'assaig apenas interferia, atès que l'increment d'absorbància a 340 nm degut a la formació d'aquest complex amb el glicolaldehid i el lactaldehid - a baixes concentracions - era pràcticament despreciable en front de l'increment d'absorbància a 340 nm com a conseqüència de l'actuació de l'enzim.

Quan l'activitat aldehid deshidrogenasa es determinava sobre metilglixal, era necessari canviar d'amortidor de l'assaig, ja que en presència de glicina, la reacció quedava bloquejada, probablement per reacció del metilglixal amb la glicina formant un producte de condensació de color groc (109). Aquest problema fou solventat canviant l'amortidor de l'assaig per carbonat-bicarbonat (50 mM).

3.3.2.2. ENERGIA D'ACTIVACIÓ.

L'energia d'activació de la reacció catalitzada per la lactaldehid deshidrogenasa es calculava gràficament a partir del pendent de la recta obtinguda al representar el logaritme de les velocitats de la reacció en front dels inversos de la temperatura (en graus Kelvin) a la qual es realitzava

l'assaig (representació d'Arrhenius) (146) (figura 18).

El valor de l'energia d'activació corresponent a l'activitat deshidrogenasa sobre glicolaldehid va ésser de 8,35 Kcal/mol. Quan la determinació es va fer usant L-lactaldehid com a substrat, s'obtingué un valor de 8,65 Kcal/mol.

3.3.2.3. INACTIVACIÓ TÈRMICA.

Aquest paràmetre va ésser determinat per a la lactaldehid deshidrogenasa d'E.coli, emprant una mostra d'enzim purificat. A fi d'obtenir resultats reproduïbles i comparables, la concentració de proteïna de la mostra va ésser ajustada a 0,4 mg/ml.

Aquest estudi d'inactivació tèrmica es va realitzar incubant la preparació enzimàtica a 55°C i a diferents temps es determinava l'activitat lactaldehid deshidrogenasa remanent.

A la figura 19 es mostra el perfil d'inactivació de l'enzim lactaldehid deshidrogenasa en les condicions esmentades. L'activitat enzimàtica es seguí de dues maneres : sobre glicolaldehid 1 mM i sobre L-lactaldehid 0,1 mM.

L'enzim purificat de la soca 3 i el de la soca 1 mostren idèntic comportament en quant a la seva estabilitat tèrmica.

3.3.2.4. EFECTE DELS CATIONS DIVALENTS.

L'estudi de l'efecte dels cations divalents sobre l'enzim lactaldehid deshidrogenasa es va fer amb una mostra

FIGURA 18. ENERGIA D'ACTIVACIÓ DE LA REACCIÓ CATALITZADA PER LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

Una mostra de lactaldehyd deshidrogenasa homogènia es va assajar per activitat enzimàtica sobre L-lactaldehyd 0,1 mM (o) i sobre glicolaldehyd 1 mM (●), a diferents temperatures (17, 20, 25, 30 i 35°C).

Es representa el logaritme de les velocitats obtingudes en front dels inversos de la temperatura absoluta (°K). Els valors de l'energia d'activació es calcularen a partir del valor del pendent de la recta.

($E_a = 2,3 \times R \times \text{pendent}$), on R és la constant dels gasos.

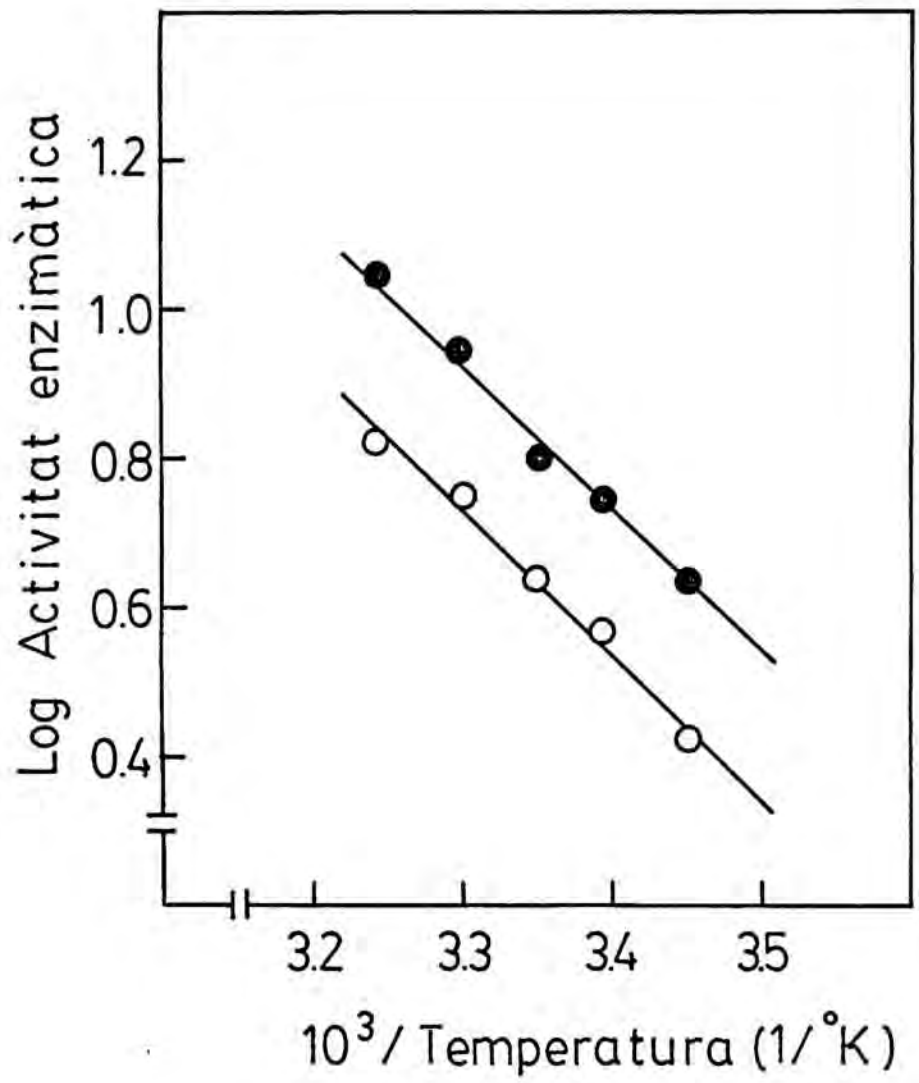
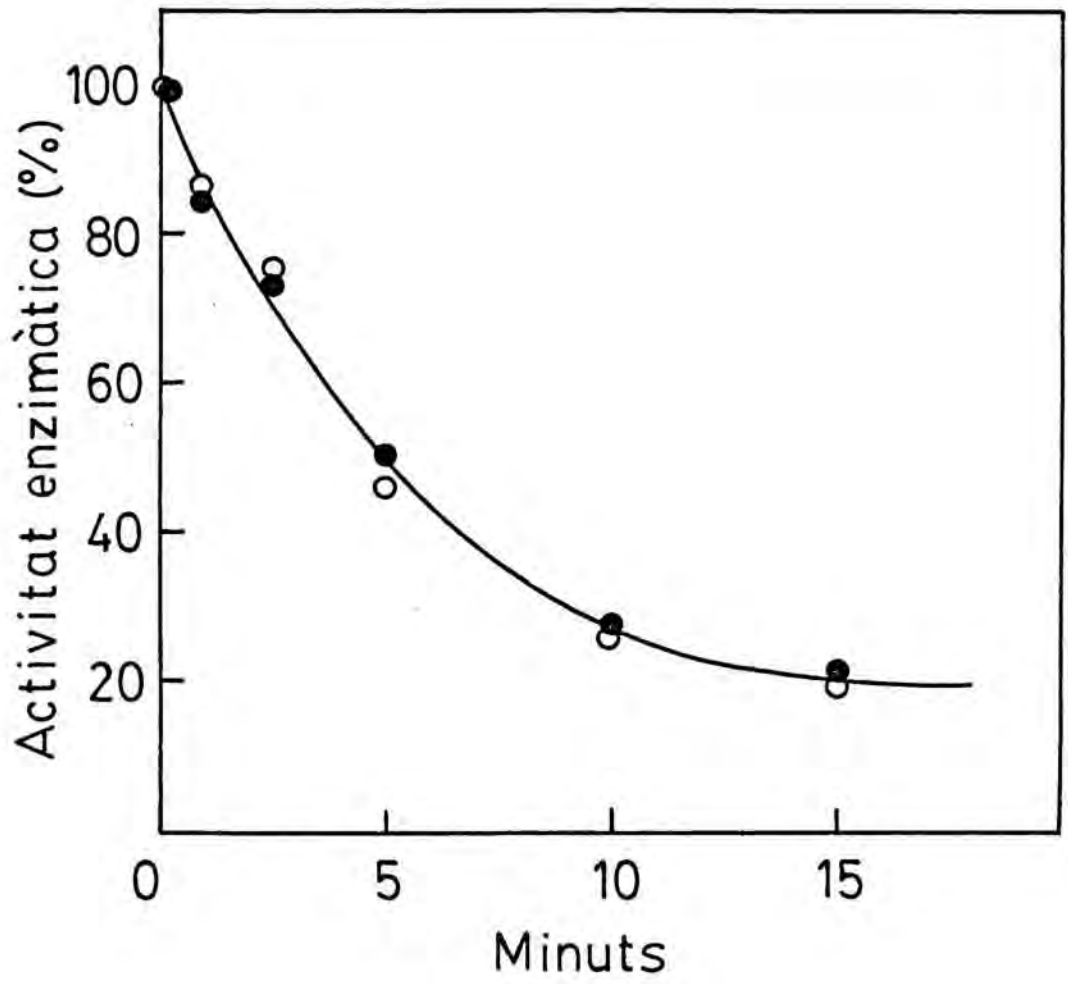


FIGURA 19. INACTIVACIÓ TÈRMICA DE L'ENZIM LACTALDEHID
DESHIDROGENASA.

Una preparació d'enzim purificat, ajustada a 0,4 mg/ml es va escalfar a 55°C, i a diferents temps es va determinar l'activitat enzimàtica remanent, sobre glicolaldehid 1 mM (●-●) i sobre lactaldehid 0,1 mM (o-o).

L'activitat enzimàtica s'expressa com a percentatge respecte a la de temps zero.



purificada i dialitzada en front de solució amortidora de pH fosfat sòdic 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM pH 7,3, a fi d'eliminar l'EDTA present a l'amortidor original, el qual tindria un efecte quelant sobre els cations a assajar.

Els cations divalents estudiats foren : Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} . S'addicionaven a la mescla d'assaig en forma de clorurs, en un rang de concentracions entre 0,05 mM i 20 mM. Com a controls s'utilitzaren el Na^+ i el K^+ , també en forma de clorurs.

A la taula 7 s'indiquen les concentracions dels cations assajats que provoquen el 50% d'inhibició de l'activitat enzimàtica. Es pot veure que els més potents són el $ZnCl_2$ i el $CuCl_2$.

La figura 20 mostra la inactivació de l'enzim en presència de diferents concentracions de $CuCl_2$ i $ZnCl_2$ a l'assaig, sense incubació prèvia. Aquesta inhibició era previnguda per la presència d'EDTA 1 mM en la barreja d'incubació (figura 21), si bé l'addició d'EDTA a les preparacions prèviament inactivades no restablia l'activitat enzimàtica, tot indicant la irreversibilitat del procés.

3.3.2.5. INHIBICIÓ PER p-HIDROXIMERCURIBENZOAT.

El p-hidroximercuribenzoat és un compost que reacciona amb els grups sulfhidril de les proteïnes. Ja que està descrit en la literatura que les aldehyd deshidrogenases són inhibides per compostos d'aquesta mena (67,83,130,155) s'ha provat l'efecte del p-hidroximercuribenzoat sobre l'activitat

TAULA 7

EFFECTE INHIBIDOR DELS CATIONS DIVALENTS SOBRE L'ENZIM
LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

Catió A)	Concentració inhibidora 50% (mM)
MgCl ₂	N.D B)
MnCl ₂	10
CaCl ₂	5
CuCl ₂	0,40
ZnCl ₂	0,25

A) Els cations en forma de clorurs s'addicionaven a la mescla d'assaig en el moment de mesurar l'activitat enzimàtica.

B) El MgCl₂ a 50 mM a l'assaig provocava només una inhibició d'un 30%. No es van provar concentracions superiors.

FIGURA 20. INHIBICIÓ DE L'ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDROGENASA PELS IONS DIVALENTS Zn^{2+} I Cu^{2+} .

Es representa l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa d'una preparació enzimàtica purificada, obtinguda a l'assajar en presència de diferents concentracions de : $ZnCl_2$ (●), $CuCl_2$ (○) i $NaCl$ (□). Aquest últim servia de control.

L'activitat enzimàtica s'expressa com a percentatge respecte a l'activitat original, determinada en absència de qualsevol ió.

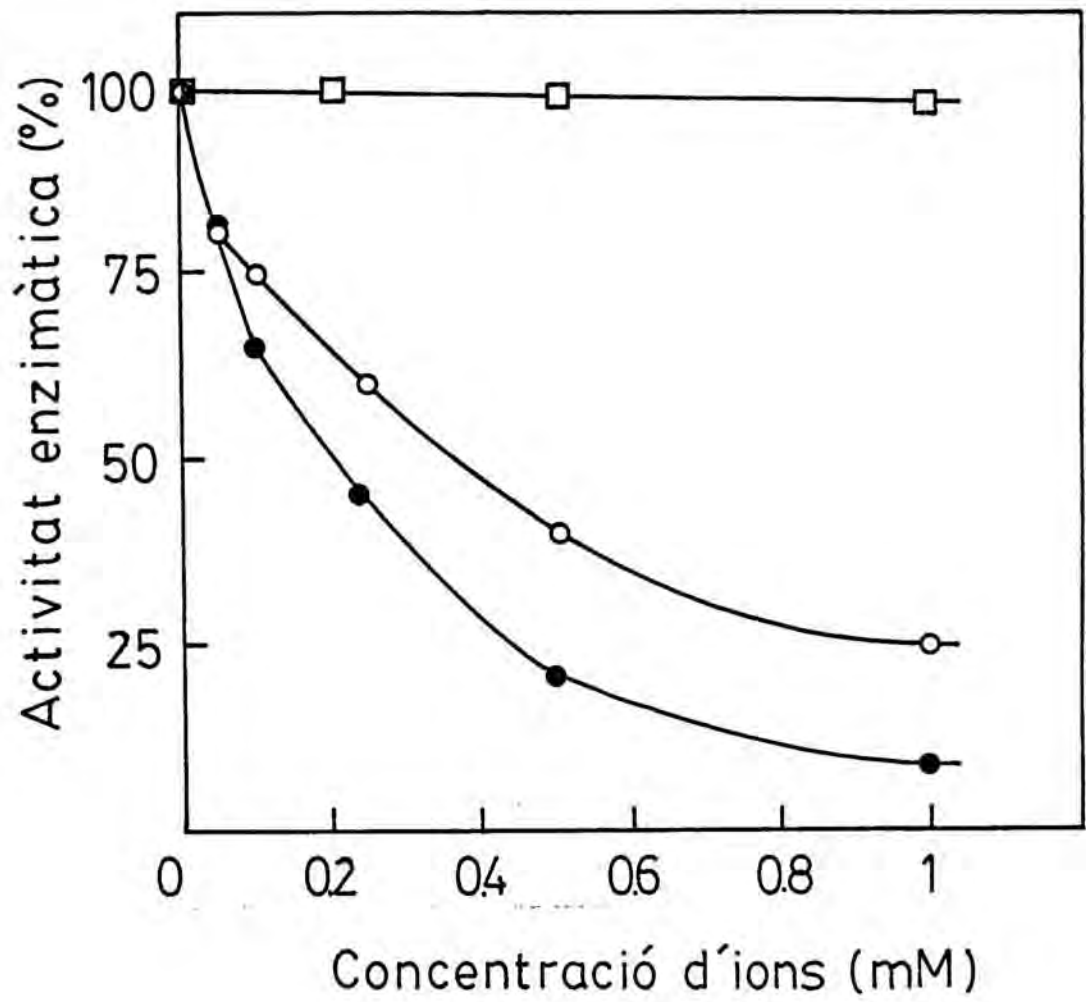


FIGURA 21. EFECTE PROTECTOR DE L'EDTA SOBRE LA INHIBICIÓ DE L'ENZIM LACTALDEHID DESHIDROGENASA PER ZnCl_2 i CuCl_2 .

Una preparació enzimàtica purificada i lliure d'EDTA s'incubava a 25°C , per un període de 10 minuts, en presència de ZnCl_2 0,075 mM i CuCl_2 0,075. Paral·lelament, es feien incubacions amb ZnCl_2 i CuCl_2 a la mateixa concentració esmentada, però en presència d'EDTA 1 mM. Com a control s'usava NaCl a les mateixes concentracions.

Es representa l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa (en U/ml) en front del temps d'incubació a les següents condicions :

- NaCl 0,075 mM (■)
- NaCl 0,075 mM + EDTA 1 mM (□)
- ZnCl_2 0,075 mM (●)
- ZnCl_2 0,075 mM + EDTA 1 mM (○)
- CuCl_2 0,075 mM (▲)
- CuCl_2 0,075 mM + EDTA 1 mM (Δ)

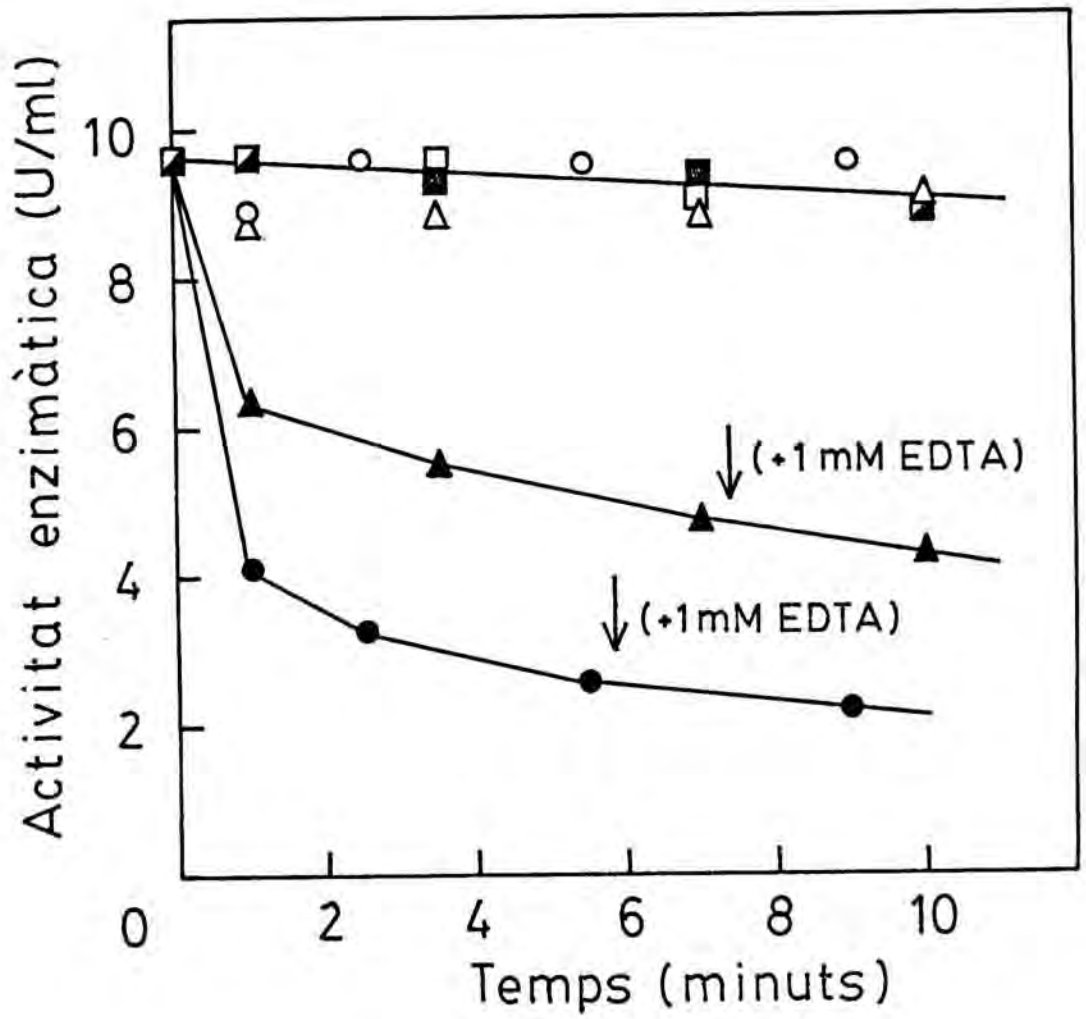
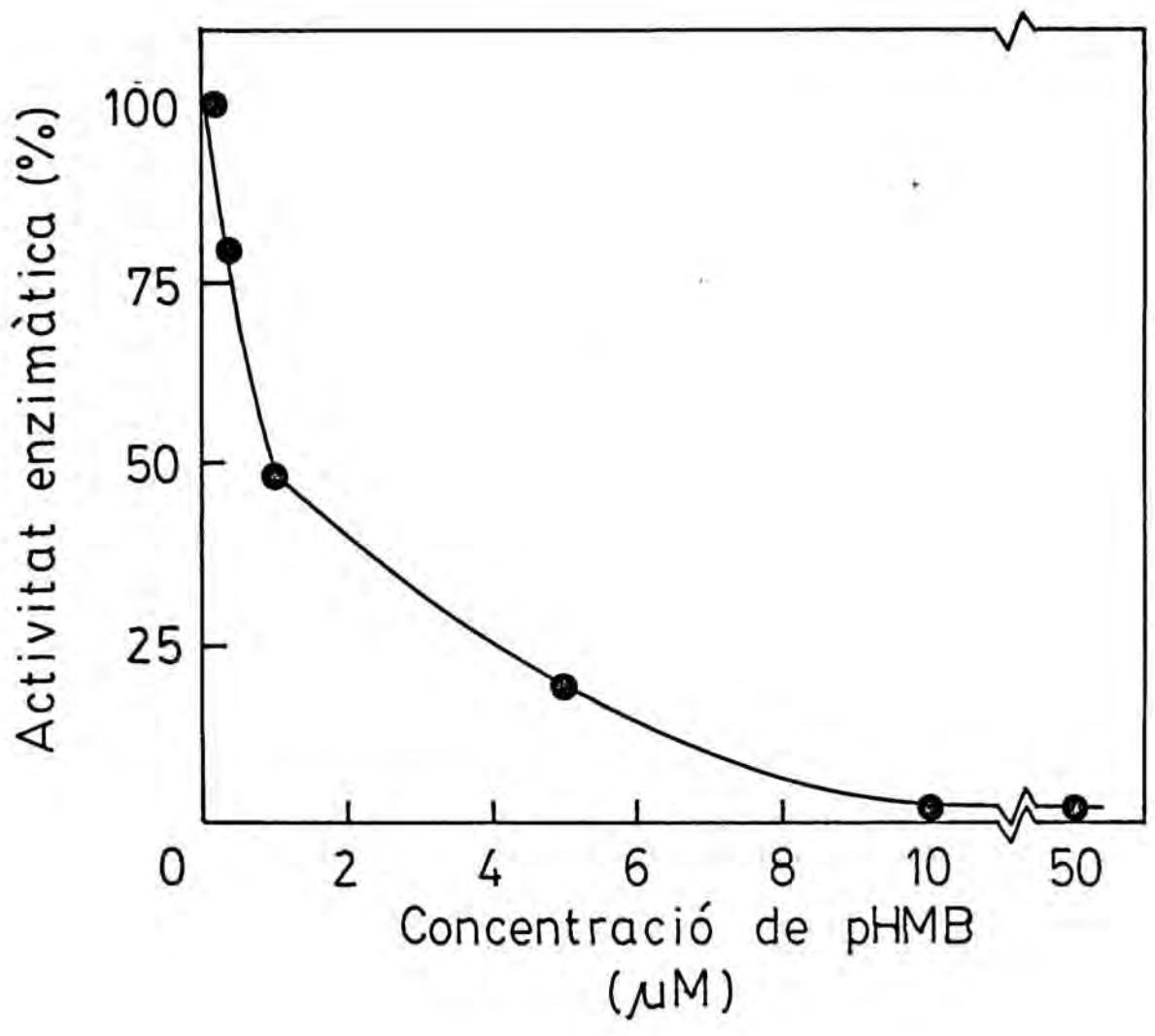


FIGURA 22. INHIBICIÓ DE L'ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDROGENASA PER p-HIDROXIMERCURIBENZOAT.

Una preparació enzimàtica purificada i lliure de 2-mercaptoetanol (1mg/ml) va ésser assajada en presència de diferents concentracions de p-hidroximercuribenzoat (pHMB).

Es representa el percentatge d'activitat enzimàtica en front les concentracions d'inhibidor addicionat a la mescla d'assaig.



enzimàtica de la lactaldehyd deshidrogenasa.

Una mostra d'enzim purificat fou dialitzada per a eliminar el 2-mercaptoetanol present a l'amortidor del procés de purificació i posteriorment assajada per activitat enzimàtica en presència de diferents concentracions de p-hidroximercuribenzoat (pHMB) (figura 22). L'enzim és inhibit totalment per concentracions de l'ordre de 10 μM . El 50% d'inhibició s'assoleix a 1 μM .

L'addició de DTT 1,6 mM a la preparació enzimàtica inhibida totalment pel pHMB 10 μM feia recuperar fins a un 35% l'activitat enzimàtica.

Aquest comportament envers un reactiu de grups sulfhidril respon al presentat per la majoria d'aldehyd deshidrogenases descrites (veure 1.1).

3.3.2.6. REVERSIBILITAT DE LA REACCIÓ.

La reacció catalitzada per l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli s'ha mesurat sempre en el sentit d'oxidació de l'aldehyd al corresponent àcid. Tots els intents de mesurar la reacció inversa, és a dir, la reducció de l'àcid al corresponent aldehyd han estat negatius, malgrat haver provat condicions diferents. Així, s'utilitzaren com a substrats de la reacció inversa diferents àcids (lactat, glicolat) a concentracions que comprenien des de 10 a 200 mM. També s'empraren diferents amortidors de pH que cobrien un rang entre 6,5 i 9,5. El cofactor NADH fou també assajat a diverses concentracions. Cap d'aquestes variants va resultar eficaç en la

determinació de la reversibilitat de la reacció catalitzada per la lactaldehyd deshidrogenasa purificada.

Aquest és un fet descrit per a les aldehyd deshidrogenases que pertanyen a la classe I segons Jakoby (83), dins la qual es pot incloure l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa objecte d'aquest treball. En la reacció catalitzada per aquests enzims, l'aldehyd és transformat quantitativament en àcid.

3.3.2.7. ESPECIFICITAT DE SUBSTRAT.

L'enzim lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli purificat a homogeneïtat va ésser assajat en presència de diversos aldehyds, per tal d'establir el tipus d'especificitat que presentava.

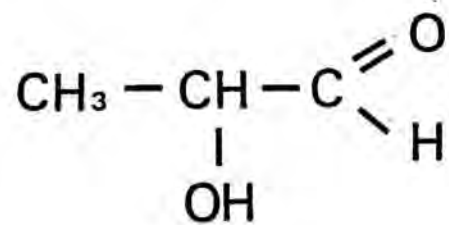
L'enzim és actiu sobre els α -hidroxialdehyds (L-lactaldehyd, L-gliceraldehyd i glicolaldehyd) i també és capaç d'oxidar α -oxoaldehyds (metilglixal). A la figura 23 es representa l'estructura dels aldehyds substrat esmentats.

L'enzim no presenta activitat sobre acetaldehyd, propion aldehyd ni formaldehyd, en un marge de concentracions comprès entre 1 i 20 mM.

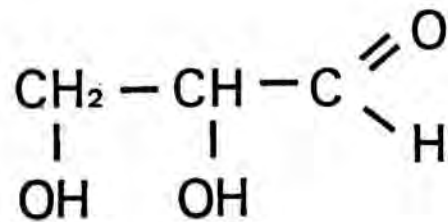
Per a determinar l'activitat relativa de l'enzim sobre els aldehyds ja citats, es va assajar l'activitat enzimàtica a diferents concentracions de cadascun dels substrats. Els resultats es mostren a la figura 24, on es pot veure que cada aldehyd presenta una concentració òptima d'assaig diferent. Així, pel L-lactaldehyd és de 0,1 mM, pel L-gliceraldehyd de 0,5 mM, pel glicolaldehyd de 1 mM i 2 mM pel metilglixal.

FIGURA 23. ESTRUCTURA DELS ALDEHIDS SUBSTRATS DE LA
LACTALDEHID DESHIDROGENASA D'E.coli.

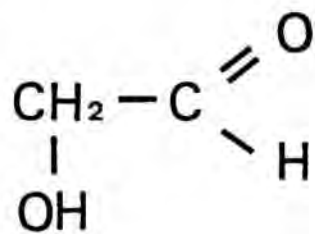
α - HIDROXIALDEHIDS



Lactaldehid

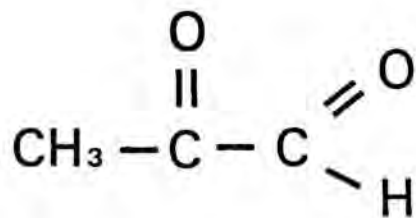


Gliceraldehid



Glicolaldehid

α - CETOALDEHIDS



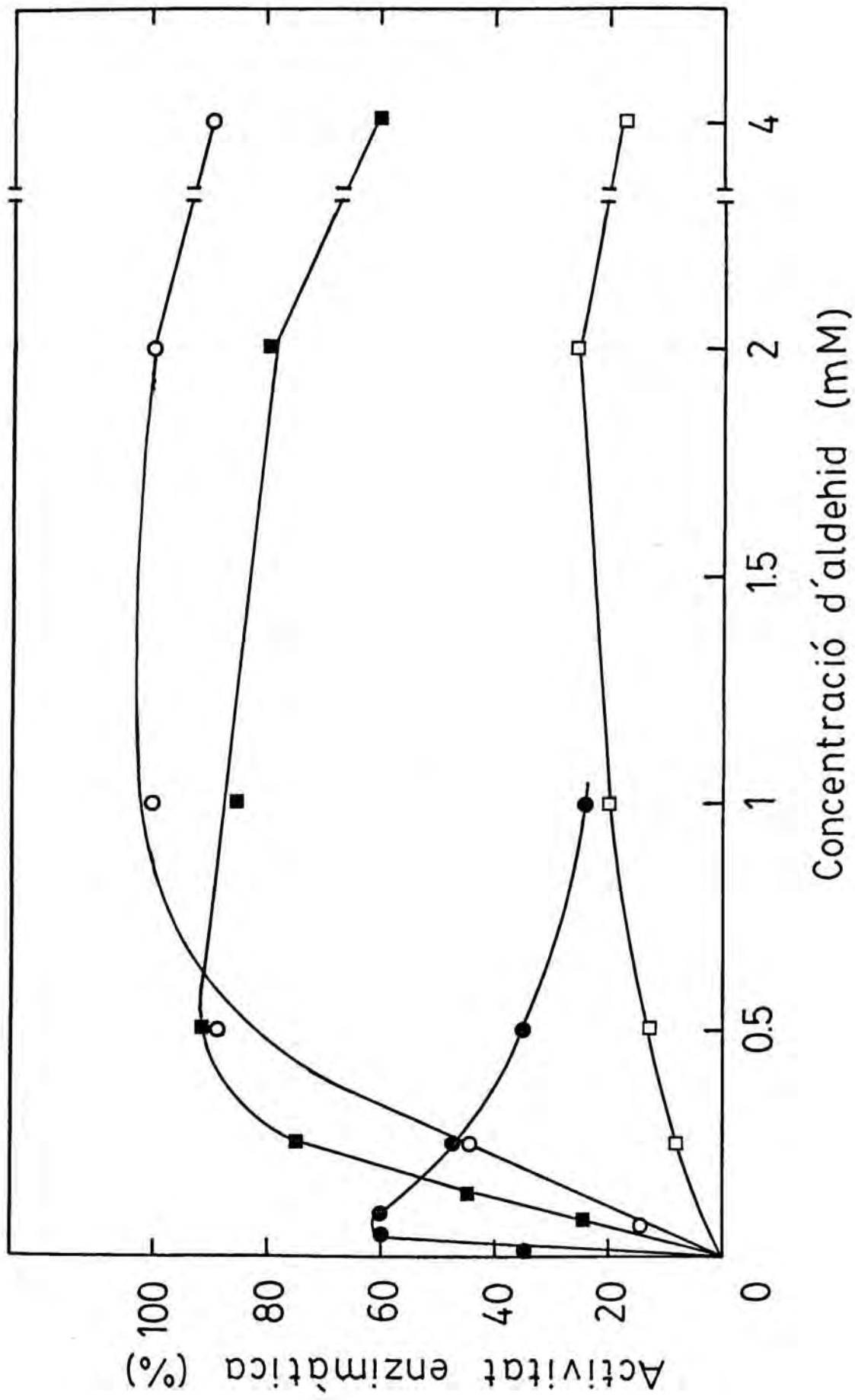
Metilglioxal

FIGURA 24.- ACTIVITAT RELATIVA DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA SOBRE DIVERSOS ALDEHIDS.

S'assajà l'activitat enzimàtica d'una preparació homogènia sobre els següents aldehyds : L-lactaldehyd (●), L-gliceraldehyd (■), glicolaldehyd (○) i metilglioaxal (□). S'utilitzaren diferents concentracions de cadascun.

En ordenades es representa l'activitat enzimàtica, expressada com a percentatge respecte al valor de l'activitat sobre glicolaldehyd 1 mM, que se l'hi assigna el valor 100.

En abscisses es representa les diferents concentracions de cada aldehyd assajades.



S'observa també un efecte d'inhibició per substrat, molt més marcat en el cas del L-lactaldehid.

Quan l'assaig enzimàtic es feia emprant L-lactaldehid com a substrat, s'evidenciava el fenomen de dimerització descrit pels α -hidroxialdehids (103). Concentracions de L-lactaldehid de l'ordre de 0,1-0,05 mM donaven activitats més baixes i no lineals en comparació amb les determinacions obtingudes a les mateixes concentracions de L-lactaldehid desdimeritzat (veure 2.11.4). Amb aquest substrat adientment tractat es podia realitzar determinacions fiables a concentracions tant baixes com 0,02 mM.

Per a fer un estudi més complet de l'efecte de la concentració dels diversos aldehids sobre l'enzim lactaldehid deshidrogenasa, es va procedir a determinar els valors de K_m per a aquests substrats. Es va utilitzar el mètode de representació dels dobles recíprocs segons Lineweaver i Burk (105). L'activitat de la lactaldehid deshidrogenasa es va assajar en presència de diferents concentracions de substrat, de manera que una d'elles fós molt propera al valor de K_m i les altres fossin superiors i inferiors a aquest valor. Els assajos corresponents a cada determinació es realitzaven per triplicat i, en tots els casos les activitats enzimàtiques es mesuraven en intervals en els que la consumició de substrat fós inferior al 5% de la concentració inicial en la mescla d'assaig.

Els valors de K_m , que són la mitjana de dues determinacions diferents, obtinguts pel L-lactaldehid, L-gliceralde-

hid, glicocaldehid i metilglioxal s'indiquen a la taula 8, conjuntament amb els coeficients de regressió de les rectes obtingudes al representar els inversos de la velocitat de reacció en front dels inversos de la concentració de substrat.

Es presenten els valors de K_m per a l'enzim lactaldehid deshidrogenasa purificat a partir de la soca 1 i de la soca 3. Com es pot veure, no s'observen diferències significatives en els valors trobats per a tots dos enzims. Pel que fa als valors del paràmetre V_{max} , cal esmentar que en determinats casos s'observen petites diferències com a conseqüència de la inestabilitat de l'enzim, dificultant d'aquesta manera la realització d'estudis comparatius (taula 8).

3.3.2.8. ESPECIFICITAT DE COFACTOR.

L'enzim lactaldehid deshidrogenasa utilitza preferentment NAD^+ com a coenzim, si bé també és actiu amb $NADP^+$, però amb una activitat 10 vegades inferior a la trobada amb NAD^+ . L'activitat depenent de $NADP^+$ és estimulada per K^+ . Aquests resultats van ésser obtinguts prèviament en extractes cel·lulars (16) i foren corroborats posteriorment amb l'enzim purificat dins l'àmbit del present treball.

Atès que la diferència d'activitat enzimàtica observada en presència d'ambdós cofactors era notable, tots els estudis cinètics es van realitzar amb NAD^+ com a cofactor. Encara que el NAD^+ usat habitualment era d'un alt grau de puresa (grau III) s'ha descrit que conté una quantitat molt petita d'una impuresa que sembla ésser un inhibidor competitiu en certs sis-

temes enzimàtics (38,177). En vistes a determinar si aquest inhibidor tenia algun efecte sobre la lactaldehyd deshidrogenasa, es va assajar l'activitat enzimàtica utilitzant NAD^+ grau III i un NAD^+ altament purificat (grau V) del qual s'havien eliminat les esmentades impureses. Ja que l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa va ésser la mateixa en ambdós casos, tot indicant l'absència d'efecte inhibidor, s'utilitzà el NAD^+ grau III per a la caracterització cinètica de l'enzim.

Els valors de K_m i V_{max} es determinaven gràficament segons el mètode de Lineweaver i Burk (105). Els assajos corresponents a cada determinació de NAD^+ es realitzaven per triplicat i es calculaven emprant dos substrats diferents, el L-lactaldehyd i el glicolaldehyd, a les concentracions saturants de 0,1 mM i 1 mM respectivament (taula 8).

Els valors de K_m , així com els de V_{max} , trobats pels enzims produïts per la soca tipus salvatge i pel mutant soca 3 van ésser molt similars, de l'ordre de $2,7 \cdot 10^{-4}$ M amb glicolaldehyd i de $1,2 \cdot 10^{-4}$ M amb L-lactaldehyd.

TAULA 8.

CONSTANTS CINÈTIQUES (Km i Vmax) DE L'ENZIM LACTALDEHID DESHIDROGENASA D'E.COLI.

SUBSTRAT	SOCA 1			SOCA 3		
	Km (M)	Vmax (U/mg)	r	Km (M)	Vmax (U/mg)	r
L-lactaldehid	$4,2 \cdot 10^{-5}$	8,0	0,996	$4,0 \cdot 10^{-5}$	7,6	0,985
L-gliceraldehid	$1,5 \cdot 10^{-4}$	12,0	0,987	-	-	-
Glicolaldehid	$3,8 \cdot 10^{-4}$	19,0	0,999	$3,9 \cdot 10^{-4}$	21,0	0,995
Metilglixal	$1,0 \cdot 10^{-3}$	2,5	0,985	-	-	-
COFACTOR						
NAD (glicolaldehid)	$2,8 \cdot 10^{-4}$	15,0	0,996	$2,6 \cdot 10^{-4}$	19,0	1,00
NAD (lactaldehid)	$1,2 \cdot 10^{-4}$	6,6	0,990	$1,3 \cdot 10^{-4}$	7,1	0,996

r = coeficient de regressió. El nombre de dades per a cada determinació va ésser de 6.
 El rang de concentracions assajades per a cada aldehid fou : L-lactaldehid (0,015-0,1 mM),
 L-gliceraldehid (0,025-0,5 mM), glicolaldehid (0,05-1 mM), metilglixal (0,5-2 mM) i NAD
 (0,05-0,5 mM).

3.4. OBTENCIÓ I UTILITZACIÓ D' ANTICOSSOS ANTI-LACTALDEHID DESHIDROGENASA D'E.COLI.

3.4.1. OBTENCIÓ DE LES PREPARACIONS D'ANTICOSSOS ANTI-LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

L'obtenció d'anticossos anti-lactaldehid deshidrogenasa d' E.coli es portà terme per inoculació a conills, de preparacions d'enzim de la soca 3, purificat a homogeneïtat i d'alta activitat específica.

Es seguí la pauta descrita a 2.6.1, la qual va resultar eficient, rendint preparacions d'anticossos altament específiques.

L'antisèrum obtingut era purificat parcialment per precipitació amb sulfat amònic com es descriu a 2.6.2, a fi d'obtenir una preparació lliure d'albúmina sèrica.

3.4.2. IMMUNODIFUSIÓ RADIAL.

La presència d'anticossos anti-lactaldehid deshidrogenasa a l'antisèrum obtingut es detectà mitjançant tècniques de doble difusió, segons el mètode d'Ouchterlony (veure 2.6.3). Com es mostra a la figura 25, la reacció antígen-anticòs es manifesta en forma d'arcs de precipitació.

La immunodifusió de la figura 25 rotulada com a C correspon a una titulació de l'antisèrum obtingut. El pouet central contenia 20 µl d'una preparació de lactaldehid deshidrogenasa purificada (0,5 mg/ml). Els pouets 2,3,4,5 i 6 contenien

20 μ l de dilucions diferents de l'antisèrum obtingut, 1/16, 1/8, 1/4, 1/2 i 1, respectivament. S'observa la formació d'immunoprecipitat en totes les dilucions assajades.

El pouet 1 contenia 20 μ l de sèrum d'un conill no immunitzat. En aquest cas, no es detectà la formació d'arcs de precipitació, excloent, per tant, la possibilitat de reaccions no específiques.

La immunodifusió de la figura 25 rotulada com a A correspon a un estudi de la identitat immunològica de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa de diverses soques d' E.coli i induït pel creixement en diferents fonts de carboni. Era necessari comprovar aquesta identitat immunològica, donat que aquestes preparacions d'anticossos serien utilitzades en els estudis de producció d'enzim lactaldehyd deshidrogenasa per diversos mutants d' E.coli, així com en el estudi dels requeriments de la inducció enzimàtica. Així, el pouet central contenia 20 μ l de la preparació d'anticossos anti-lactaldehyd deshidrogenasa purificada per precipitació amb sulfat amònic (40 mg/ml). Els pouets 1,3 i 5 contenien 20 μ l de l'enzim purificat (0,5 mg/ml) que havia estat utilitzat com a antígen en la inoculació a conills (de la soca 3 feta créixer en hidrolitzat de caseïna). Els pouets 2,4 i 6 contenien, en un volum de 20 μ l, 200 μ g d'extractes cel.lulars de la soca 1 feta créixer en ramnosa, de la soca 3 feta créixer en 1,2-propandiol, i de la soca JA-102 en etilenglicol respectivament. Tots els creixements eren aeròbics. Com es pot veure, l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa d'aquestes soques i en condicions inductores

FIGURA 25.- IDENTITAT IMMUNOLÒGICA DE L'ENZIM LACTALDEHID
DESHIDROGENASA DE DIVERSES SOQUES D'E. COLI.

A) Immunodifusió radial contenint en els pouets 1, 3 i 5, 10 µg d'enzim lactaldehyd deshidrogenasa purificat de la soca 3 (en 20 µl).

Els pouets 2, 4 i 6 conteien 200 µg (en 20 µl) dels següents extractes cel.lulars : de la soca 1 feta créixer aeròbicament en ramnosa (2), de la soca 3 crescuda aeròbicament en propandiol (4), i de la soca JA-102 feta créixer en etilenglicol (6).

El pouet central contenia 20 µl de la fracció globulines anti-lactaldehyd deshidrogenasa.

B) Immunodifusió radial contenint 10 µg de lactaldehyd deshidrogenasa purificada de les següents soques : de la soca 3 (pouets 1,3 i 5), de la soca 1 (2) i de la soca JA-102 (4).

El pouet central contenia 20 µl de la fracció globulines específiques.

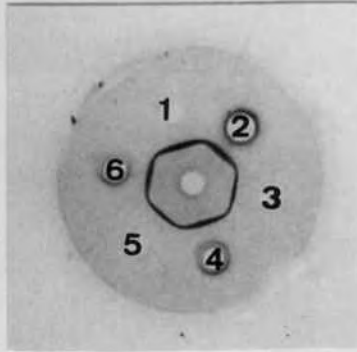
C) Immunotitulació de l'antisèrum anti-lactaldehyd deshidrogenasa.

Els pouets del 2 al 6 contenien les següents dilucions de l'antisèrum específic, per ordre : 1/16, 1/8, 1/4, 1/2 i sense diluir.

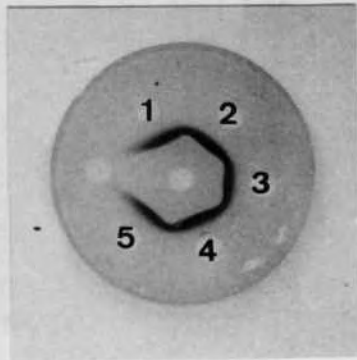
El pouet 1 contenia 20 µl de sèrum de conill no immunitzat.

El pouet central contenia 10 µg de lactaldehyd deshidrogenasa homogènia (de la soca 3).

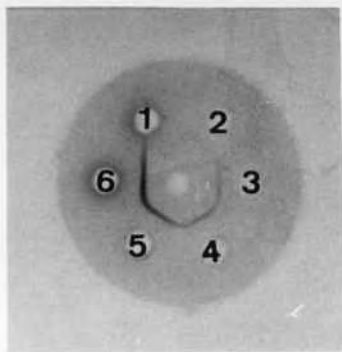
A



B



C



diferents, presenta una identitat immunològica total, fet que ens va permetre utilitzar aquestes preparacions d'anticossos en els estudis fisiològics i de regulació que presentem en aquest treball.

La immunodifusió rotulada com a B (figura 25) correspon a l'estudi immunològic realitzat amb els enzims lactaldehydeshidrogenasa purificats de tres soques diferents, la soca 1, la soca 3 i la soca JA-102. El pouet central contenia 20 μ l de la preparació d'anticòs precipitada amb sulfat amònic (40 mg/ml). Els pouets 1,3 i 5 contenien 10 μ g (en un volum de 20 μ l) de l'enzim purificat de la soca 3, el qual havia estat usat com a antígen. El pouet 2 contenia 10 μ g de lactaldehydeshidrogenasa purificada de la soca 1; i el pouet 4 contenia la mateixa quantitat de l'enzim purificat de la soca JA-102. Tots els enzims havien estat purificats a partir dels corresponents creixements aeròbics en hidrolitzat de caseïna. L'enzim lactaldehydeshidrogenasa produït per aquestes tres soques, que es troben en diferents estadis d'evolució experimental, és immunològicament idèntic.

3.4.3. IMMUNOELECTROFORESI SEGONS LAURELL.

La immunoelectroforesi segons Laurell (veure 2.8.5) fou una altra de les tècniques utilitzades per a detectar la reacció antígen-anticòs. Al llarg d'aquest treball, aquesta tècnica ha estat molt útil en la detecció, i fins i tot quantificació, de l'enzim lactaldehydeshidrogenasa en extractes cel·lulars de soques mutants d'E.coli sotmeses a diferents condicions de creixement.

En primer lloc, es va provar quina concentració d'anticòs (fracció precipitada amb sulfat amònic) era la més adient en la preparació de les plaques, amb relació a la quantitat d'antígen que es volia assajar. La relació escollida va ésser una concentració d'anticòs 0,4% (v/v) d'una preparació quina concentració de proteïna era de 40 mg/ml. Quant l'antígen, si aquest era enzim purificat, el rang idòni de concentracions era entre 0,2 i 2 µg. Si com a antígen s'emprava extracte cel·lular, la quantitat aplicada a cada pouet era habitualment de 50 µg.

A la figura 26-A es pot veure el patró obtingut al realitzar una immunoelectroforesi al 0,4% (v/v) d'anticòs, on en els pouets hi havia mostres de lactaldehid deshidrogenasa homogènia que cobrien un interval de 0,2 a 2 µg d'enzim, en un volum total de 10 µl. El procés es desenvolupà tal i com es descriu a 2.8.5. Es pot observar que els increments en la quantitat d'antígen sembrat provoquen un augment proporcional en l'alçada dels corresponents arcs de precipitació.

A la figura 26-B es representa l'alçada dels arcs de precipitació en relació amb la quantitat d'antígen sembrat, per a una concentració d'anticòs del 0,4% (v/v). S'observa una estreta relació entre ambdós paràmetres.

Aquest tipus de tècnica va posar de manifest l'especificitat de les preparacions d'anticòs, ja que en immunoelectroforesis portades a terme aplicant diferents quantitats d'extractes cel·lulars, només apareixia un únic arc de precipitació, proporcional a la quantitat d'extracte aplicat (dades no presentades)

FIGURA 26. A) IMMUNOELECTROFORESI SEGONS LAURELL DE
QUANTITATS CREIXENTS DE LACTALDEHID
DESHIDROGENASA PURIFICADA.

El gel contenia un 0,4% (v/v) d'una prepara-
ció de globulines anti-lactaldehid deshidro-
genasa.

La quantitat de lactaldehid deshidrogenasa
homogènia aplicada era :

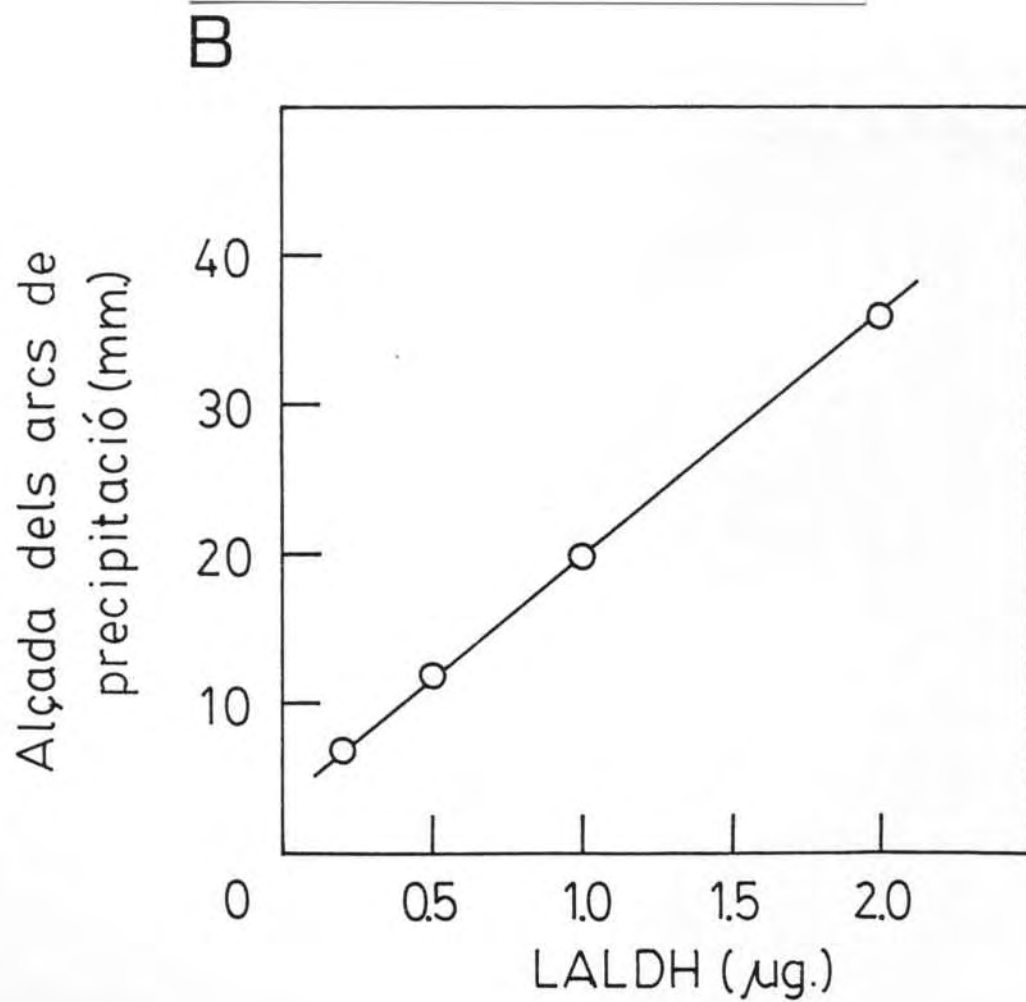
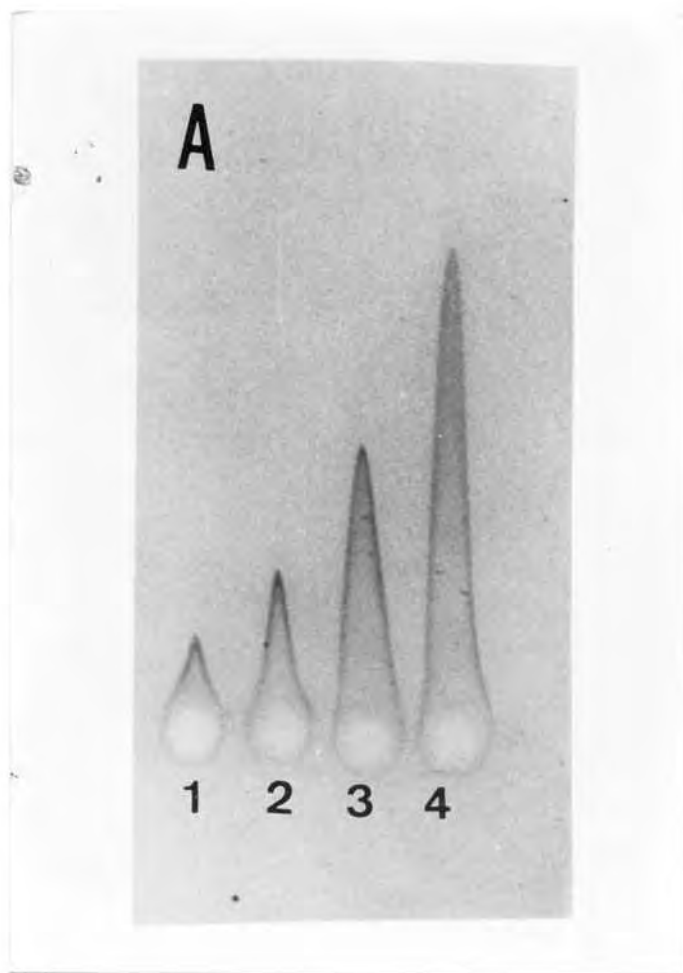
1) 0,2 μg 2) 0,5 μg 3) 1 μg 4) 2 μg .

El volum aplicat en cada cas era de 10 μl .

B) RELACIÓ ENTRE LA QUANTITAT DE LACTALDEHID
DESHIDROGENASA I L'ALÇADA DELS ARCS D'IM-
MUNOPRECIPITACIÓ.

Representació gràfica de la immunoelectrofo-
resi descrita a l'apartat A).

En ordenades s'indica l'alçada dels immunopre-
cipitats i en abcisses els μg de lactaldehid
deshidrogenasa homogènia, aplicats a cada
pouet.



Així mateix, es van realitzar immunoelectroforesis emprant fraccions de globulines de conills no immunitzats, semblant tant extractes cel.lulars amb activitat lactaldehydeshidrogenasa, com enzim purificat. En cap cas s'observà l'aparició d'arcs de precipitació, descartant-se, per tant, la possibilitat de reaccions inespecífiques.

3.4.4. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA EN MEDI LIQUID.

Les preparacions d'anticossos anti-lactaldehydeshidrogenasa obtingudes foren assajades per la seva capacitat de reconèixer i inactivar a l'enzim present en extractes cel.lulars d'E.coli. La pauta seguida és la detallada a 2.6.4.

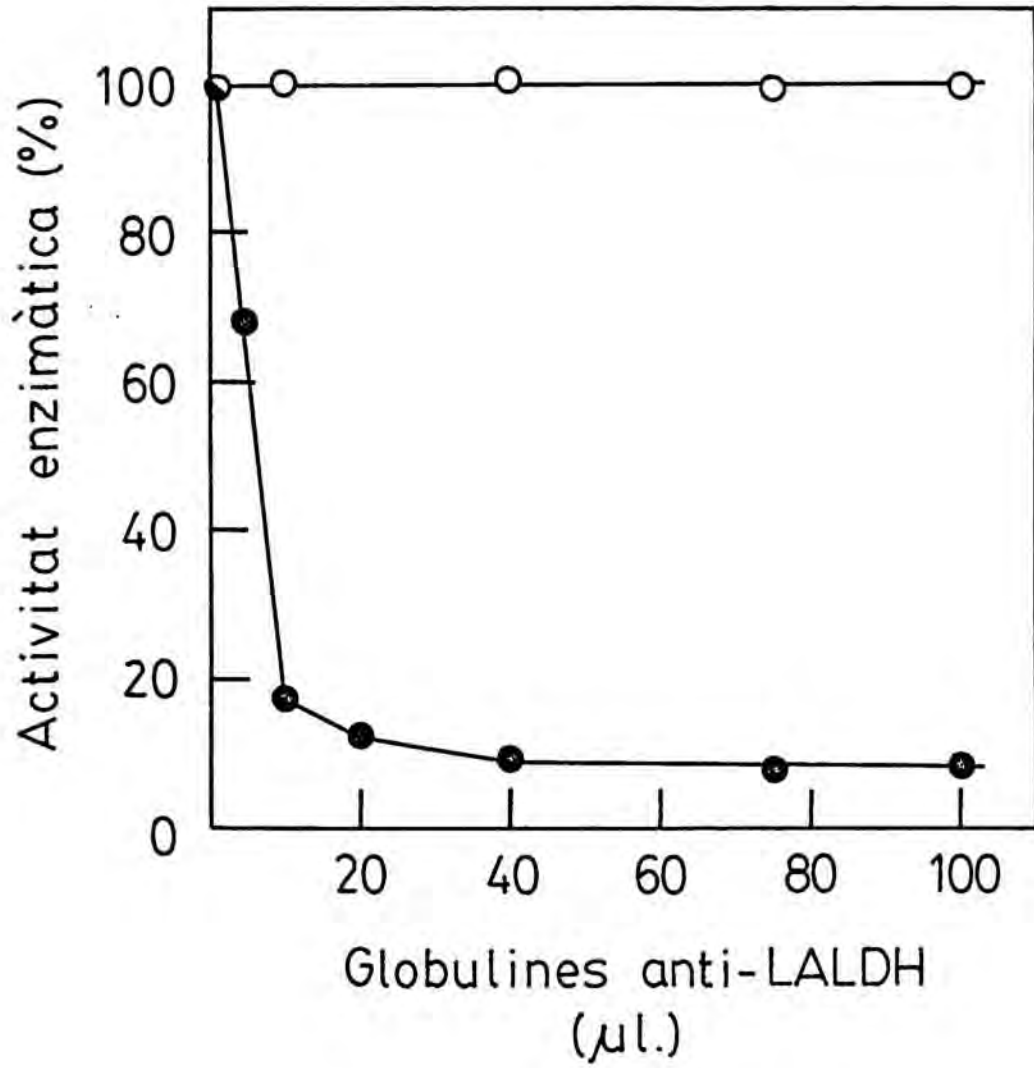
Tal com es mostra a la figura 27, la fracció globulines anti-lactaldehydeshidrogenasa era capaç d'inactivar la lactaldehydeshidrogenasa d' E.coli de manera proporcional a la quantitat d'anticòs utilitzada. A partir d'una determinada quantitat d'anticòs, l'activitat lactaldehydeshidrogenasa bloquejada era superior al 90% de l'activitat total present a l'extracte. Per contra, l'addició de quantitats equivalents de sèrum d'un conill no immunitzat era incapaç de provocar cap davallada de l'activitat enzimàtica. Això indicava que la disminució d'activitat detectada en el primer cas, no era deguda a una inactivació de l'enzim al llarg del procés d'incubació amb l'anticòs. Aquest fet era reafirmat amb un control, al qual s'hi afegia els mateixos volums de solució salina que d'anticòs a l'extracte problema, no observant-se inactivació durant el temps d'incubació a 30°C.

FIGURA 27.- IMMUNOPRECIPITACIÓ EN MEDI LIQUID DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

Es van incubar 50 μ l d'extracte cel.lular de la soca 1 crecuda aeròbicament en ramnosa (21mg/ml) amb quantitats creixents de la fracció d'anticossos precipitada amb sulfat amònic (40 mg/ml) (●-●), o de sèrum d'animals no immunitzats (o-o), a 30°C, 30 minuts.

Després de centrifugar les barrejes, es determinà l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa en els sobrenadants.

Es representa el percentatge d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa envers el volum de la fracció globulines específiques (en μ l) o de sèrum no immune , afegit.



3.5. REGULACIÓ DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

En aquest treball es presenten els resultats obtinguts en l'anàlisi dels possibles mecanismes de regulació de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa realitzats a dos nivells :

1) Regulació transcripcional, és a dir, a nivell de síntesi de l'enzim. En aquest sentit han estat de gran utilitat les preparacions d'anticossos anti-lactaldehyd deshidrogenasa, que han servit per a quantificar l'enzim present en els extractes cel·lulars de diverses soques d'E.coli mitjançant la tècnica d'immunolectroforesi descrita per Laurell.

2) Regulació post-transcripcional, intentant analitzar possibles mecanismes de regulació de l'activitat enzimàtica que afectessin a l'enzim ja sintetitzat, sense modificar la seva velocitat de síntesi.

3.5.1. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL.

3.5.1.1. ESTUDI DE LA INDUCCIÓ DE L'ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

Com ja s'ha descrit a l'apartat 3.1, l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa era induïda en E.coli pel creixement aeròbic en ramnosa i fucosa. A fi d'establir en quin moment del creixement tenia lloc la inducció (en la fase exponencial inicial o final, o bé era un enzim de fase estacionària), es va fer créixer la soca 1 en ramnosa aeròbicament. A diferents temps es mesurava la densitat òptica del cultiu a 420 nm,

la qual cosa ens permetia representar gràficament com progressava el creixement bacterià i calcular el temps de duplicació de la soca 1 en aquestes condicions. Paral·lelament, i en diferents estadis del creixement, al·lquotes del cultiu eren centrifugades i processades per a l'obtenció dels extractes cel·lulars, on s'assajava l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa .

A la figura 28 es representa el perfil de creixement de la soca 1 en un medi aeròbic en ramnosa conjuntament amb els nivells d'activitat enzimàtica lactaldehyd deshidrogenasa al llarg del mateix. Com es pot veure, la inducció de la lactaldehyd deshidrogenasa te lloc en plena fase exponencial.

3.5.1.2. REQUERIMENTS DE LA INDUCCIÓ.

A l'apartat 3.1, on es presentava l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa en els extractes cel·lulars d'E.coli, es citava ja, quines eren les fonts de carboni que comportaven un increment en els nivells d'aquesta activitat enzimàtica quan eren metabolitzades per diverses soques d'E.coli.

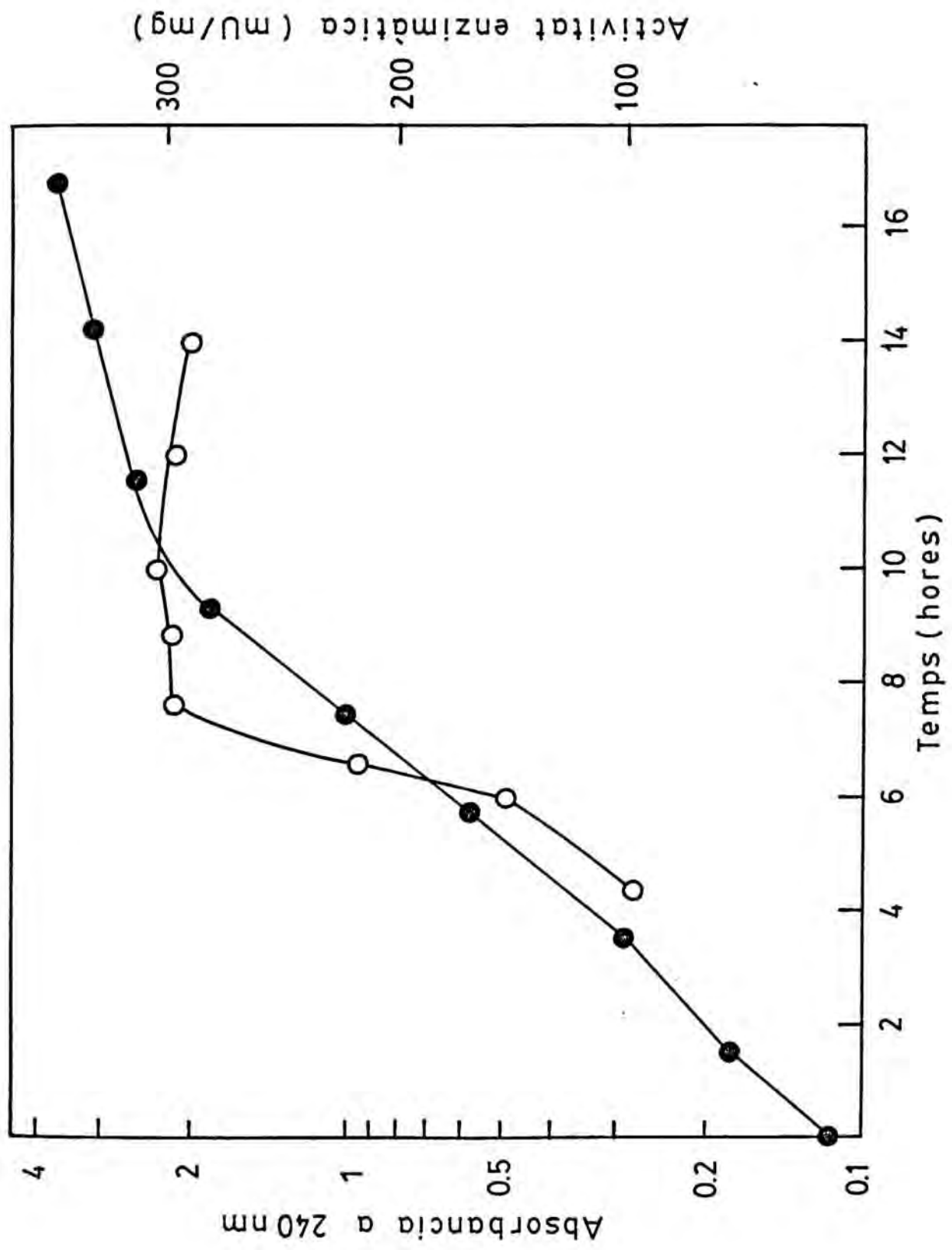
Calia esbrinar si aquesta inducció enzimàtica observada en determinades condicions de creixement era deguda a un increment en la síntesi de l'enzim. Com a resposta a l'inductor, la transcripció del gen de la lactaldehyd deshidrogenasa estaria augmentada (178).

Per tant, en els extractes cel·lulars de la soca 1 feta créixer en diferents medis i disponibilitat d'oxigen, s'assajà

FIGURA 28. ESTUDI DE LA INDUCCIÓ DE L'ACTIVITAT LACTALDEHID
DESHIDROGENASA AL LLARG DEL CREIXEMENT AERÒBIC
EN RAMNOSA DE LA SOCA 1.

En ordenades es representa l'absorbància del cultiu, mesurada a 420 nm, al llarg del temps (●), així com l'activitat enzimàtica (○) mesurada en els extractes cel.lulars obtinguts en diferents moments del creixement (a les absorbàncies de 0,35; 0,62; 0,75; 1; 1,5; 2; 3 i 4).

En abscisses es representa el temps (en hores) del cultiu.



l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa, quins valors es presenten a la taula 3. Paral·lelament, es quantificà, per immunoelectroforesi, la producció de l'enzim responsable d'aquesta activitat.

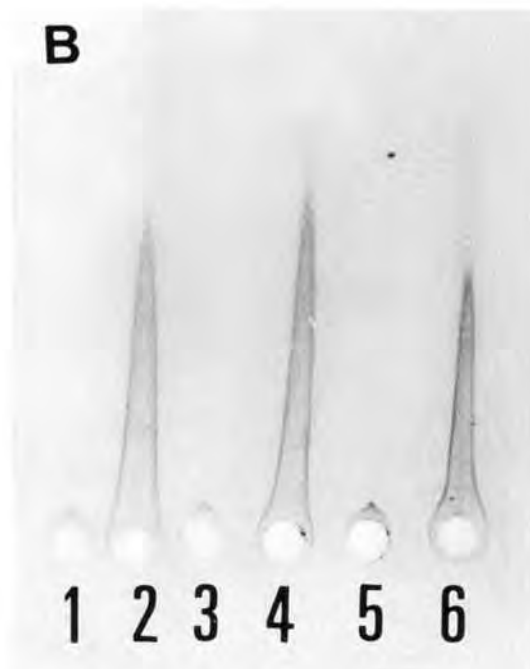
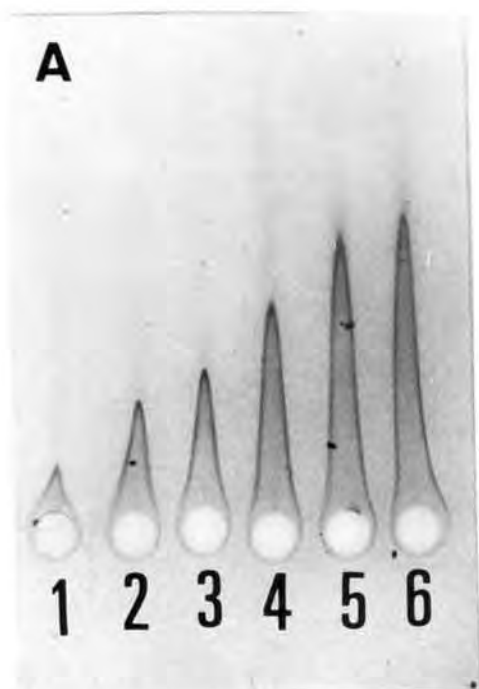
A la figura 29 es mostren les immunoelectroforesis realitzades amb 50 µg d'extractes cel·lulars de la soca 1 feta créixer aeròbicament en glucosa, glicerol, succinat, hidrolitzat de caseïna, ramnosa i fucosa. Com es pot veure, els medis inductors (veure 3.1) comporten un increment en la síntesi de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa, respecte dels medis basals. Això succeix en condicions aeròbiques, mentre que en anaeròbiosi no es detecta síntesi enzimàtica en cap dels medis de cultiu provats (figura 29-B).

Es va calcular la relació entre l'activitat específica i l'alçada de l'arc d'immunoprecipitació en els extractes crus corresponents a cadascuna de les condicions de cultiu esmentades. Els valors d'activitat específica són els que es presenten a la taula 3 i l'alçada de l'immunoprecipitat s'obtingué a partir del gel d'agarosa que es mostra a la figura 29. Els valors d'aquesta relació es donen a la taula 9, on s'observa que aquesta es mantenia constant, entre 11 i 12, en totes les condicions analitzades, tot indicant que l'increment d'activitat enzimàtica observat en els medis inductors era degut exclusivament a una síntesi enzimàtica accelerada (178). Així mateix, la quasi absència d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa observada en els extractes cel·lulars dels creixements anaeròbics en hidrolitzat de caseïna, ramnosa i fucosa

FIGURA 29. QUANTIFICACIÓ IMMUNOLÒGICA DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA PRODUÏDA PER LA SOCA 1 EN DIFERENTS MEDIS I CONDICIONS DE CREIXEMENT.

- A) IMMUNOELECTROFORESI CORRESPONENT A DIFERENTS CULTIUS AERÒBICS DE LA SOCA 1 :
- 1) Glucosa, 2) Glicerol, 3) Succinat, 4) Hidrolitzat de caseïna, 5) ramnosa i 6) fucosa.
- B) IMMUNOELECTROFORESI CORRESPONENT A DIFERENTS CULTIUS AERÒBICS/ANAERÒBICS DE LA SOCA 1 :
- 1) Ramnosa $-O_2$, 2) Ramnosa $+O_2$, 3) fucosa $-O_2$
 - 4) Fucosa $+O_2$, 5) Hidrolitzat de caseïna $-O_2$
 - i 6) Hidrolitzat de caseïna $+O_2$.

La fracció globulines anti-lactaldehid deshidrogenasa s'afegia a la placa d'agarosa al 0,4%. En cada pouet es sembrava 50 μ g d'extracte cel·lular.



TAULA 9.

FONT DE CARBONI (CULTIU AERÒBIC)

RELACIO $A_E/R^a)$

Glucosa	8,0
Glicerol	11,1
Succinat	11,0
Hidrolitzat de caseïna	11,0
Ramnosa	12,0
Fucosa	12,2

Glicerol + :

. Glutamat	11,9
. Glutamina	12,1

a) Relació entre l'activitat específica (mU/mg) i l'alçada de l'arc d'immunoprecipitació ("rocket") (mm).

es corresponia amb una manca de síntesi enzimàtica detectada immunològicament.

Cal remarcar, que la inducció de l'activitat lactaldehydeshidrogenasa produïda per la utilització del glutamat en la soca 1 és deguda, també, a un increment en la síntesi enzimàtica, mantenint-se la relació entre l'activitat específica i l'alçada de l'arc d'immunoprecipitació dins el marge ja esmentat.

Aquest estudi referent al glutamat ha estat possible, mercès a la identitat de l'enzim induït pel metabolisme d'aquest aminoàcid amb la lactaldehydeshidrogenasa. Les evidències genètiques sobre aquesta identitat es presentaran a l'apartat 3.7 i les immunològiques, si bé són indirectes es poden considerar vàlides. Així, els anticossos anti-lactaldehydeshidrogenasa han estat obtinguts en front de l'enzim purificat de la soca 3 cultivada aeròbicament en hidrolitzat de caseïna (quina inducció és deguda al glutamat) i en plaques d'ouchterlony, els enzims presents en els extractes cel·lulars corresponents a diversos creixements (ramnosa, propandiol i etilenglicol) (figura 25) donen una única banda d'immunoprecipitació amb identitat immunològica total en tots els casos.

En relació a la soca 3, cal citar que la inducció de l'activitat enzimàtica observada en determinats medis (veure 3.1) respon al mateix mecanisme d'increment de síntesi de

l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa descrit per a la soca 1, si bé no es presenten les figures corresponents donat el caire repetitiu d'aquests resultats respecte els de la soca 1.

3.5.1.3. REPRESSIÓ CATABÒLICA PER GLUCOSA I EFECTE DEL GLICEROL SOBRE LA INDUCCIÓ.

Els nivells d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa en els creixements aeròbics en glucosa eren més baixos que els presentats en medis no inductors com són glicerol i succinat. Aquest fet quedava també demostrat per la menor producció enzimàtica, quantificada immunològicament en els extractes cel·lulars obtinguts a partir de cultius en glucosa (taula 3 i figura 29).

Cal esmentar ací, que la relació entre l'activitat específica i l'alçada de l'arc d'immunoprecipitació en els extractes cel·lulars de la soca 1 feta créixer aeròbicament en glucosa era lleugerament inferior a la descrita pels creixements en altres fonts de carboni (taula 9), molt probablement perquè la quantificació immunològica no seria del tot lineal en alçades d'arcs de precipitació tant baixes.

Aquests resultats responen al model de repressió catabòlica a la que estan sotmesos molts enzims induïbles de microorganismes (178), quan aquests creixen en substrats tant simples com la glucosa.

Un altre efecte d'interès en aquest sentit, era l'observat amb el glicerol. La presència conjunta de glicerol i una

font de carboni inductora de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa en el medi de cultiu, resultava en una absència absoluta d'inducció enzimàtica.

Així, quan la soca 1 es feia créixer aeròbicament en un medi format per glicerol i la barreja dels 20 aminoàcids, i s'assajava l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa a l'extracte cru, els nivells d'activitat enzimàtica detectats eren de l'ordre dels obtinguts en els creixements en glicerol. No s'observava la inducció produïda pels aminoàcids, descrita a l'apartat 3.1.

A fi d'estudiar l'efecte del glicerol sobre la inducció de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa, es va fer créixer la soca 1 aeròbicament en hidrolitzat de caseïna fins a una absorbància de 1 mesurada a 420 nm. En aquest punt, una alíquota del cultiu va ésser processada per a l'obtenció de l'extracte cel·lular. Paral·lelament, en un dels matrassos s'addicionà glicerol 20 mM i es deixà créixer a 37°C fins a una absorbància de 5, a l'hora que un altre matràs control era tractat en les mateixes condicions, però sense glicerol. En els extractes cel·lulars obtinguts s'assajà l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa, així com la producció d'enzim per immunoelectroforesi. Els resultats mostraven que l'addició de glicerol al cultiu de la soca 1 en hidrolitzat de caseïna aturava la inducció provocada per aquesta font de carboni, detectant-se nivells d'activitat enzimàtica, així com d'enzim produït, més baixos per l'efecte de dilució sofert com a conseqüència del creixement de la biomassa del cultiu (taula 10).

TAULA 10.

EFECTE DEL GLICEROL EN LA INDUCCIÓ DE L'ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDROGENASA PEL CREIXEMENT AERÒBIC EN HIDROLITZAT DE CASEINA EN LA SOCA 1.

Glicerol A)	Absorbància a 420 de recollida del cultiu	Activitat B) enzimàtica	Quantificació C) immunològica
-	1	220	20
-	4,5	220	20
+	5	80	7

A) L'addició de glicerol 20 mM es feia quan el cultiu havia arribat a una absorbància de 1 mesurada a 420 nm.

B) Activitat lactaldehid deshidrogenasa expressada com a mU/mg.

c) Expressada com a mm d'alçada dels arcs de precipitació obtinguts en la immunoelectroforesi de 50 µg d'extracte cel.lular.

3.5.1.4. INTENTS DE CARACTERITZACIÓ DE L'INDUCTOR.

Com ja s'ha esmentat anteriorment, la lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli és un enzim semi-constitutiu que presenta nivells basals d'activitat en els creixements aeròbics en glicerol o succinat. Quan la soca 1 créix aeròbicament en ramnosa o fucosa s'observa un increment en els nivells d'activitat i síntesi de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa d'unes tres vegades. Ambdós sucres són metabolitzats per vies paral·leles que convergeixen en la formació de L-lactaldehyd, el qual, aeròbicament és oxidat a lactat per la lactaldehyd deshidrogenasa. Així mateix, quan la soca 3 creix en 1,2-propandiol, també s'observa un increment en els nivells enzimàtics. Durant el metabolisme d'aquest glicol, en la soca 3 es forma L-lactaldehyd que és transformat per la mateixa lactaldehyd deshidrogenasa que en la soca 1.

Hacking i Lin van suggerir la possibilitat de que l'inductor de la lactaldehyd deshidrogenasa fós el propi L-lactaldehyd (69). Quan aquests autors formularen aquesta hipòtesi, la lactaldehyd deshidrogenasa era considerada un enzim específic pel metabolisme del L-lactaldehyd. En el present treball s'aporten dades referents a la inducció de l'enzim durant el metabolisme del glutamat en E.coli, així com la seva participació en el metabolisme de l'etilenglicol en mutants capaços d'utilitzar aquest glicol com a única font de carboni i energia (veure 3.6). En aquest últim cas, l'enzim catalitza l'oxidació del glicolaldehyd format. A més l'enzim purificat presenta activitat sobre gliceraldehyd, glicolaldehyd i metilglixal.

Totes aquestes dades ens van portar a pensar que l'inductor que incrementaria la transcripció del gen de la lactaldehyd deshidrogenasa podria ésser qualsevol dels aldehids esmentats. Per tant, un dels primers intents de caracterització de l'inductor estaven fonamentats en l'addició d'un aldehyd (glicolaldehyd, metilglioaxal) a un cultiu aeròbic de la soca 1 en plena fase exponencial i a diferents temps, que abarcaven des de 30 minuts a 2 hores, es recollien les cèl.lules per centrifugació per a l'obtenció dels extractes crus. Els nivells d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa no incrementaven respecte a un control, després de l'addició de tots dos aldehids. A la vista dels resultats, que eren negatius, es provà diferents concentracions de glicolaldehyd i de metilglioaxal (10 i 30 mM) que s'addicionaven al cultiu en les mateixes condicions ja descrites. Tampoc es detectà cap increment en els nivells d'activitat enzimàtica.

L'experiment no es va fer amb L-lactaldehyd, ja que es requeria una gran quantitat d'aldehyd i no es disposava de la necessària en aquest cas.

L'absència d'inducció pot ésser deguda a que els aldehids provats no fossin els inductors propis de l'expressió gènica. Si bé cal remarcar que l'elevada toxicitat dels aldehids (83, 34) podria interferir en l'entrada dels mateixos dins la cel.lula o provocar la seva ràpida transformació en altres productes. Aleshores, aquest mètode d'estudi de l'inductor no seria el correcte.

3.5.1.4.1. Possible paper del L-lactaldehid com a inductor de la lactaldehyd deshidrogenasa.

L'addició de l'inductor a un cultiu creixent en un medi basal i la posterior determinació de l'efecte provocat en la producció de l'enzim induïble, és un mètode proposat per a l'estudi dels possibles inductors (178). Donat que l'addició d'aldehyds al medi de cultiu no va resultar com esperavem, es va intentar estudiar indirectament el paper del L-lactaldehyd com a inductor de l'expressió gènica de la lactaldehyd deshidrogenasa.

Amb aquest objectiu, s'utilitzà la soca ET6016, que pel que interessa en aquest treball, presenta una mutació en el gen de la ramnulosa-1-fosfat aldolasa, de manera que aquest mutant d'E.coli és incapaç de créixer en ramnosa com a única font de carboni i energia. Endemés, està descrit que els mutants de l'aldolasa quan es fan créixer en un altre font de carboni en presència de ramnosa s'intoxiquen per l'acumulació de ramnulosa-1-fosfat, no detectant-se per tant creixement (125). Com a conseqüència d'aquesta mutació no es forma L-lactaldehyd, ni fosfat de dihidroxiacetona a partir de ramnosa en la soca ET6016, però sí que es produeixen tots els intermediaris anteriors.

Per a analitzar el paper del L-lactaldehyd en la inducció de la lactaldehyd deshidrogenasa, es volia comparar la inducció d'aquest enzim en dues soques diferents, la soca tipus salvatge (soca 1) i la soca mutant ET6016, després de l'addició de ramnosa 10 mM a cultius aeròbics en glicerol en fase

estacionària d'ambdues soques. Així, es van fer créixer la soca 1 i la soca ET6016 aeròbicament en glicerol. Quan els cultius havien arribat a una densitat òptica de 3, s'afegia, en tots dos cassos, ramnosa 10 mM. La incubació aeròbica a 37°C continuava i a diferents temps (des de 30 minuts fins a 8 hores, fins i tot 24 hores), alíquotes de tots dos cultius eren centrifugades i processades per a l'obtenció dels extractes cel.lulars, on s'assajava l'activitat lactaldehydeshidrogenasa.

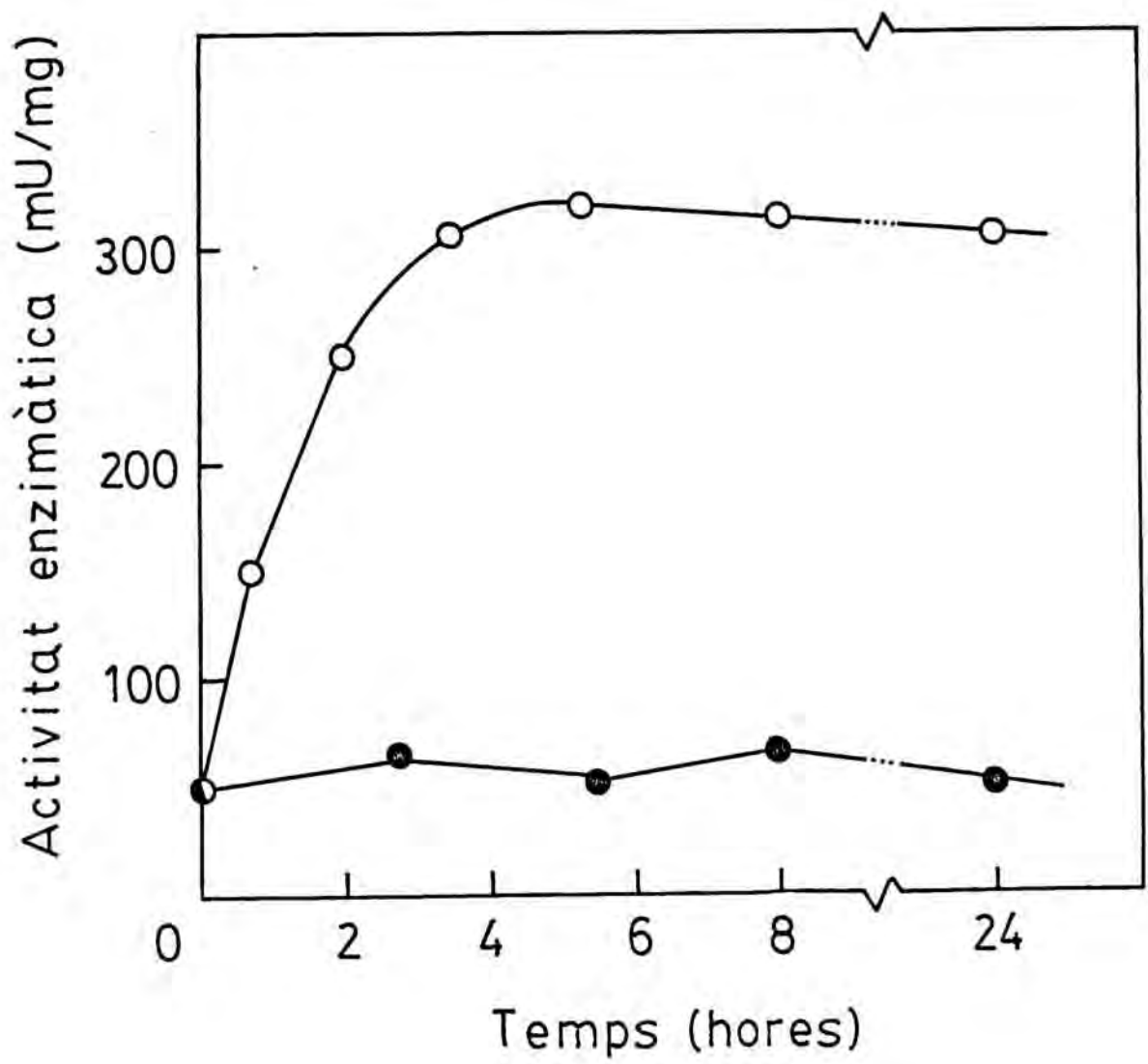
A la figura 30 es representen els nivells d'activitat enzimàtica assajats en els extractes cel.lulars de la soca 1 (◦) i de la soca ET6016 (●) en font del temps després de l'addició de ramnosa al medi de cultiu. S'observa que en la soca 1, la ramnosa indueix l'activitat enzimàtica des de nivells basals en glicerol fins els obtinguts normalment en un cultiu aeròbic en ramnosa (320 mU/mg). Tanmateix, l'addició d'aquest sucre al cultiu de la soca ET6016 no provocava cap tipus d'inducció enzimàtica, ni tant sols a les 24 hores després.

S'havia comprovat prèviament que la ramnosa entrava dins les cèl.lules mutants i era metabolitzada fins a ramnulosa-1-fosfat per la intoxicació observada en plaques de medi mineral basal que contenien com a font de carboni glicerol 20 mM i ramnosa 10 mM. Per tant, la manca d'inducció en aquesta soca, era probablement deguda a que no s'havia produït l'inductor de l'expressió del gen de la lactaldehydeshidrogenasa.

Aquest resultat donava suport a la hipòtesi que el lactaldehyd fós l'inductor de l'enzim lactaldehydeshidrogenasa,

FIGURA 30. INDUCCIÓ DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA PER L'ADDICIÓ DE RAMNOSA A CULTIUS, EN FASE ESTACIONARIA, DE LA SOCA 1 I DE LA SOCA ET 6016.

Es representa l'activitat lactaldehid deshidrogenasa (en mU/mg) envers el temps després de l'addició de ramnosa a cultius de la soca 1 (o) i de la soca ET 6016 (●) en glicerol, fets créixer fins a una absorbància de 3-3,5, mesurada a 420 nm.



car la soca 1 i la soca ET6016 comparteixen tots els intermediaris del metabolisme de la ramnosa, llevat del L-lactaldehid i el fosfat de dihidroxiacetona. El metabolisme d'aquest últim compost és aliè totalment a l'enzim lactaldehydeshidrogenasa i per tant és poc probable que sigui l'inductor d'aquest enzim.

3.5.1.4.2. Efecte de l'anaeròbiosi en la inducció de l'activitat lactaldehydeshidrogenasa.

Quan la soca 1 creix anaeròbicament en ramnosa, fucosa o hidrolitzat de caseïna, els nivells d'activitat lactaldehydeshidrogenasa en els extractes cel·lulars obtinguts a partir d'aquests cultius són pràcticament nuls. L'enzim no és sintetitzat en condicions anaeròbiques, fins i tot en presència de fonts de carboni inductores en condicions aeròbiques.

Donat que el L-lactaldehyd és un intermediari present en el metabolisme anaeròbic d'aquests dos sucres i que probablement és l'inductor de l'enzim lactaldehydeshidrogenasa en condicions aeròbiques (veure 3.5.1.4.1), ens varem plantejar quin paper jugava l'anaeròbiosi en la inducció de la lactaldehydeshidrogenasa.

Per a abordar aquesta qüestió, es va utilitzar un mutant d'inserció de Tn5, derivat de la soca 3, incapaç de créixer en 1,2-propandiol com a única font de carboni i energia, anomenat JA-105. L'obtenció d'aquest mutant es va fer seguint la pauta detallada a l'apartat 2.2.3.

L'anàlisi de les activitats enzimàtiques implicades en el metabolisme del L-1,2-propandiol mostrà l'absència d'activitat propandiol òxido-reductasa en els extractes cel·lulars d'aquesta soca feta créixer en hidrolitzat de caseïna, si bé els nivells d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa eren normals.

Donat que aquest mutant era deficient en l'enzim propandiol òxido-reductasa va ésser utilitzat en l'estudi de l'efecte inductor del L-lactaldehyd en anaeròbiosi. Aquest mutant era incapaç de créixer anaeròbicament en ramnosa per l'acumulació de lactaldehyd. Es pretenia determinar si aquest aldehyd acumulat dins la cèl.lula era capaç d'afavorir la transcripció del gen de la lactaldehyd deshidrogenasa, responsable de l'oxidació del esmentat aldehyd, actuant així com un mecanisme de desintoxicació.

Amb aquest objectiu, es va fer créixer la soca JA-105 anaeròbicament en hidrolitzat de caseïna (suplementat amb piruvat 1 mM) en presència de kanamicina 50 µg/ml (per a evitar l'escisió del Tn5 del seu lloc d'inserció) en quatre ampolles de medi de cultiu de 580 ml cadascuna, fins al final de la fase exponencial de creixement. Les cèl.lules foren recollides per centrifugació i rentades amb medi mineral (SM) en condicions estèrils. A continuació, una alíquota d'aquestes cèl.lules serví per a obtenir l'extracte cel·lular control. Amb la resta de les cèl.lules, s'inocularen 3 ampolles que contenien medi mineral basal, ramnosa 20 mM i kanamicina 50 µg/ml. S'incubaren a 37°C durant 4, 8 i 24 hores respectivament, en condicions anaeròbiques. En els extractes cel·lulars s'assajà

l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa. Els resultats es representen a la figura 31, on es pot veure que el lactaldehyd acumulat dins les cèl.lules en anaeròbiosi incrementa en quatre vegades el nivell basal d'activitat (corresponent al creixement anaeròbic en hidrolitzat de caseïna). Si bé cal remarcar que els nivells assolits estan encara un ordre de magnitud per sota els nivells aeròbics i són aproximadament equivalents als valors d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa detectats en els creixements anaeròbics en ramnosa de la soca 1.

Pel que sembla, el L-lactaldehyd, per si sol, no és suficient per a provocar la inducció de la lactaldehyd deshidrogenasa. La presència d'oxigen hi juga també un paper important.

3.5.1.5. ANÀLISI DE MUTANTS EN EL CONTROL DE L'EXPRESSIÓ DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

Per a ampliar l'estudi sobre els mecanismes de regulació de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa, s'analitzaren mutants d'E.coli deficients en l'activitat d'aquest enzim (la soca 40 i la soca termosensible JA-104) així com d'altres que presentaven una síntesi incrementada d'enzim , la qual cosa els permetia adquirir noves capacitats metabòliques (la soca JA-102).

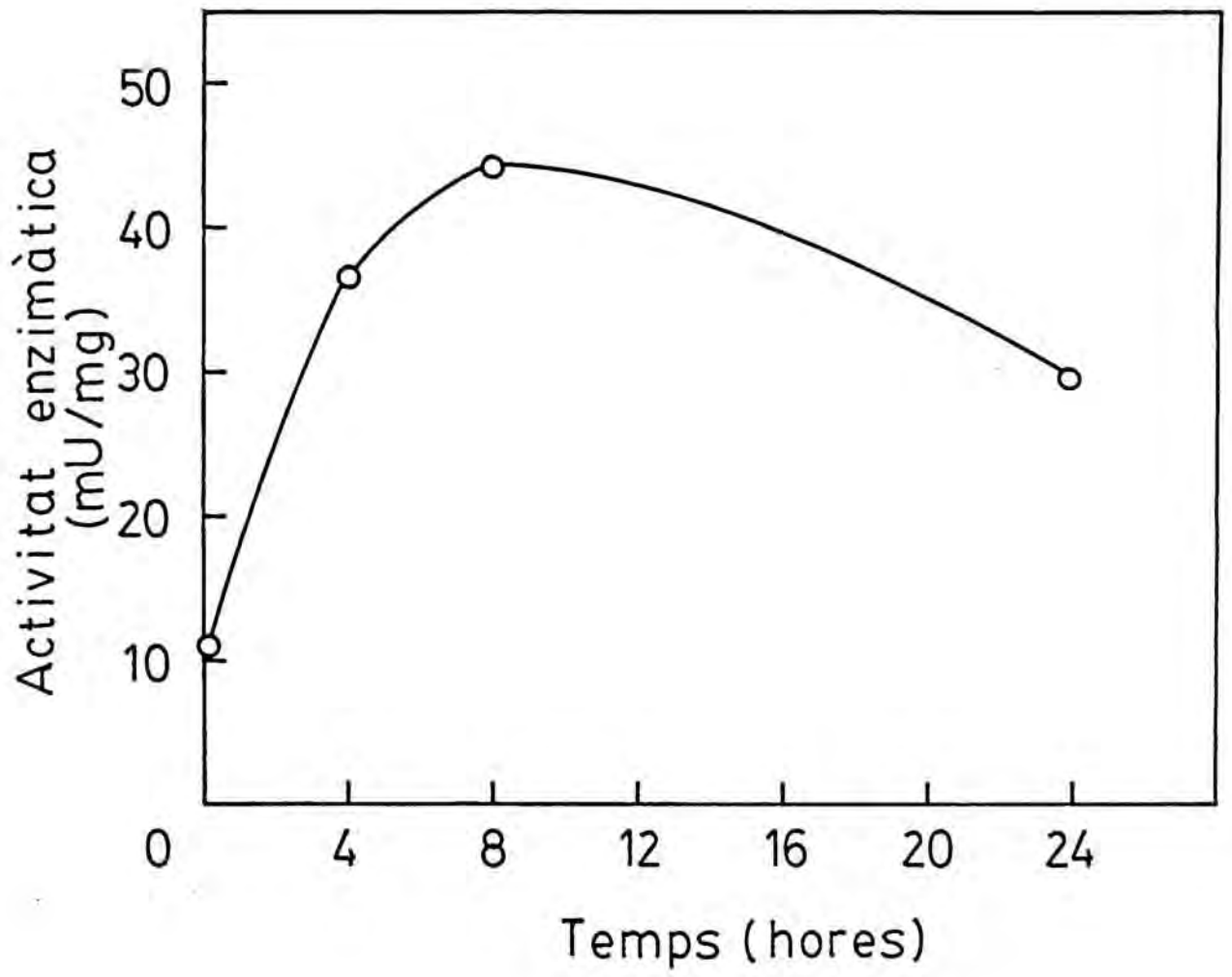
3.5.1.5.1. Descripció de la soca 40.

La soca 40 fou obtinguda per Sridhara i Wu (150) per mutagènesi de la soca 3 amb N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, i seleccionada per la seva incapacitat de créixer en 1,2-pro-

FIGURA 31. INDUCCIÓ DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA EN LA SOCA JA-105 DURANT EL METABOLISME ANAERÒBIC DE RAMNOSA.

Cèl.lules de la soca JA-105 crescudes anaeròbicament en hidrolitzat de caseïna van ésser transferides a un medi anaeròbic en ramnosa. A diferents temps, alíquotes del cultiu eren recollides per centrifugació i processades per tal d'obtenir els corresponents extractes cel·lulars.

Es representa l'activitat lactaldehydeshidrogenasa (expressada com a mU/mg) assajada en els extractes envers el temps (en hores) del cultiu en presència de ramnosa.



pandiol. Aquests autors descrivien nivells normals de l'enzim propandiol òxido-reductasa, però tantmateix, en els extractes cel·lulars d'aquesta soca, l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa era nula. Els autors utilitzaren aquesta soca per a demostrar la participació de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa en el metabolisme del 1,2-propandiol en mutants d'E.coli. Malgrat tot, no caracteritzaren el tipus de mutació d'aquesta soca.

L'estudi de la soca 40 realitzat dins l'àmbit del present treball abarcava els següents aspectes : 1) creixement aeròbic en ramnosa per a determinar el rendiment de la biomassa del cultiu i temps de generació en aquest medi; 2) determinació dels nivells d'activitat enzimàtica i quantificació immunològica de l'enzim sintetitzat en diverses condicions; i 3) excreció de 1,2-propandiol al medi durant el creixement aeròbic de la soca 40 en ramnosa.

1) Malgrat l'absència d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa, la soca 40 era capaç de créixer aeròbicament en ramnosa. El seguiment de la biomassa del cultiu en aquesta font de carboni, per mesura de l'absorbància a 420 nm, va permetre determinar un temps de generació de 250 minuts a 37°C, així com un rendiment que era la meitat del que oferia la soca progenitora, la soca 3, en les mateixes condicions de creixement. Així, quan la soca 3 creixia en ramnosa, el temps de generació era de 90 minuts i el rendiment final del cultiu es corresponia amb una absorbància de 4, mesurada a 420 nm, mentre que la soca 40, només arribava a una absorbància de 2.

Aquest valor és indicatiu de que la soca 40 només aprofita la meitat dels àtoms de carboni de la molècula original, la

ramnosa. El L-lactaldehid no és metabolitzat per la manca d'activitat lactaldehid deshidrogenasa i el cultiu creix, només, a expenses del fosfat de dihidroxiacetona.

2) La mesura dels nivells d'activitat lactaldehid deshidrogenasa en els extractes cel.lulars de la soca 40 feta créixer aeròbicament en ramnosa i hidrolitzat de caseïna confirmà l'absència d'activitat descrita per Sridhara i Wu (150) (taula 3). Paral·lelament, es realitzaren les immunoelectroforesis d'aquets extractes crus, tot comparant-les amb les dels extractes cel.lulars de la soca 3 feta créixer en les mateixes condicions. (figura 32). Els resultats mostraven que la soca 40 no sintetitzava enzim lactaldehid deshidrogenasa, la qual cosa indicava que la mutació que afectava a aquesta soca no s'havia produït en el gen estructural, si no més bé en el gen regulador, o en la zona promotora del gen que codifica per a aquest enzim.

3) La soca 40 presenta nivells constitutius de propandiol òxido-reductasa, car és un derivat de la soca 3. Aquest fet, feu pensar que el L-lactaldehid format pel creixement aeròbic de la soca 40 en ramnosa, i no metabolitzat per la manca d'enzim lactaldehid deshidrogenasa, podria ésser transformat en 1,2-propandiol per l'acció de la propandiol òxido-reductasa i excretat al medi, de manera semblant al que succeix en la fermentació anaeròbica de ramnosa en la soca 1.

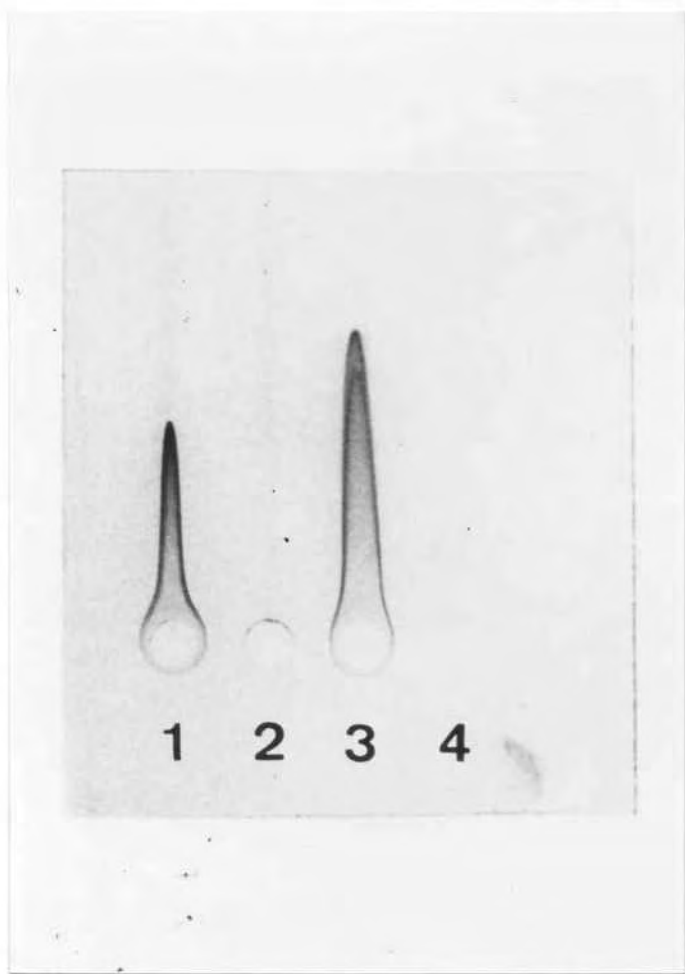
Efectivament, es mesurà el propandiol present en el medi de cultiu després del creixement aeròbic de la soca 40 en ramnosa 10 mM fins a rendiment final. S'utilitzà el mètode descrit per Jones i Riddick (85) i s'obtingué un valor de propandiol excretat al medi de 10 mM. Aquesta determinació va ésser feta

FIGURA 32. IMMUNOELCTROFORESI DELS EXTRACTES CEL·LULARS DE LES SOQUES 3 i 40 FETES CRÉIXER EN MEDIS INDUCTORS.

La placa d'agarosa contenia la fracció γ -globulines anti-lactaldehid deshidrogenasa al 0,4% (v/v).

Als pouets s'aplicaven 50 μ g d'extractes cel·lulars de creixements aeròbics de :

- 1) soca 3 en hidrolitzat de caseïna
- 2) soca 40 en hidrolitzat de caseïna
- 3) soca 3 en ramnosa
- 4) soca 40 en ramnosa



en col.laboració amb Nuria Obradors.

Aquest resultat indicaria que la propandiol òxido-reductasa actuaria com un mecanisme de desintoxicació cel.lular, per tal d'eliminar un metabòlit tòxic.

3.5.1.5.2. Mutant termosensible de lactaldehyd deshidrogenasa: la soca JA-104.

En el contexte d'aquest treball, es va creure d'interès el disposar d'un mutant termosensible de lactaldehyd deshidrogenasa. Donat que la selecció de mutants deficients en aquest enzim, obtinguts a partir de la soca 1, presentava dificultats car la pèrdua d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa no comportava canvis en el fenotip original, el mutant termosensible s'obtingué a partir de la soca 3, seleccionant un fenotip termosensible per a la utilització del L-1,2-propandiol.

- Obtenció de la soca JA-104 :

Per a l'obtenció del mutant termosensible ja esmentat, es partí de la soca 3, seguint una estratègia que ens permetés, al final, una selecció positiva del mutant desitjat. Es tractava de transformar a la soca 3 en un mutant ppc (fosfoenolpiruvat carboxilasa negatiu). Els mutants ppc s'intoxiquen i per tant no creixen en fonts de carboni que es metabolitzen a través de piruvat, amensys que es suplementin amb intermediaris del cicle de Krebs.

El procés d'obtenció del mutant termosensible per a la utilització del 1,2-propandiol constava dels següents passos :

1) Transducció de la mutació ppc (94) sobre el genotip de la soca 3 : Es va infectar a la soca 3 amb bacteriofag P1 crescut sobre la soca CBK-230 (argH:Tn5). Els transductants foren seleccionats per la resistència a la kanamicina, i es comprovà quins d'aquests transductants presentaven, a la vegada, auxotrofia per a l'arginina (el gen argH és molt proper al gen ppc). Un d'aquests transductants arg va ésser transformat en ppc per infecció amb bacteriofag P1 crescut sobre la soca K-2.2 (ppc). Es seleccionaren els transductants que havien perdut l'auxotrofia per a l'arginina per creixement en plaques de succinat. Entre els transductants arginina positius , l'adquisició de la mutació ppc s'analitzà per creixement en plaques de propandiol + aspartat i la incapacitat de fer-ho en plaques de propandiol sol (94). Es seleccionà un cló, la soca JA-103.

2) Aïllament de mutants temperatura sensibles per a la utilització de 1,2-propandiol a partir del cló JA-103, per plaqueix de 10^9 cèl.lules en plaques de propandiol + acetat, a 42°C . En aquestes condicions, només els mutants propandiol negatius podien créixer mercès a l'acetat. Els propandiol positius s'intoxicaven al metabolitzar aquest glicol. Es seleccionà un cló, la soca JA-104, degut al seu millor creixement en propandiol a 30°C.

- Caracterització del mutant JA-104.

L'anàlisi de les activitats enzimàtiques implicades en el metabolisme aeròbic del L-1,2-propandiol en els extractes

cel·lulars de la soca JA-104 feta créixer en hidrolitzat de caseïna a 30°C i 42°C mostrava nivells normals d'activitat propandiol òxido-reductasa en els creixements realitzats a les dues temperatures, mentre que l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa era nula en els cultius incubats a la temperatura restrictiva i normal en les efectuats a la temperatura permisiva (taula 15). Aquestes dades indicaven que la mutació termosensible havia afectat a l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa.

A la mateixa conclusió s'arribava a partir del rendiment final de cultius aeròbics de la soca JA-104 en ramnosa a les dues temperatures. Així, a 30°C el rendiment final era idèntic a l'aconseguit per la soca 3 en les mateixes condicions, Per contra, a 42°C el rendiment final era només la meitat, tot indicant que la ramnosa no era metabolitzada totalment, al igual que succeix en la soca 40 quan creix aeròbicament en ramnosa. Cal esmentar que degut al caracter ppc⁻ de la soca JA-104, els creixements en presència de ramnosa eren addicionats de glutamat o aspartat 5 mM.

El proper pas en la caracterització de la mutació que s'havia produït en la soca JA-104 fou el comparar l'estabilitat tèrmica de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa present en els extractes cel·lulars de les soques 3 i JA-104 cultivades aeròbicament en hidrolitzat de caseïna a 30°C. Amb aquest fi, ambdós extractes van ésser ajustats a una concentració de proteïna de 1 mg/ml i posteriorment incubats en paral·lel a 50°C a diferents temps (0, 2, 4 i 7 minuts). Passats els temps indicats, s'hi assajava l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa.

A la figura 33 es representa el percentatge de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa remanent en els extractes cel·lulars de la soca 3 (○) i de la soca JA-104 (●) envers el temps d'incubació a 50°C. En el perfil d'inactivació obtingut no s'observen diferències de comportament en quant a l'estabilitat tèrmica dels enzims sintetitzats per totes dues soques. Aquest resultat era sorprenent, ja que s'esperava observar una inestabilitat molt més marcada en el cas de l'enzim produït per la soca termosensible, la qual seria la responsable de la manca d'activitat enzimàtica a 42°C. Aquest resultat no concordava amb el tipus de mutació termosensible d'un gen estructural. Es plantejà, aleshores, la possibilitat de que fóss el gen regulador el afectat per aquest tipus de mutació.

Per a provar aquesta hipòtesi, es va realitzar la immunoelectroforesi dels extractes cel·lulars de les soques 3 i JA-104 fetes créixer aeròbicament en hidrolitzat de caseïna a 30°C i 42°C. S'observa a la figura 34 que la soca termosensible no sintetitza enzim lactaldehyd deshidrogenasa a la temperatura restrictiva, mentre que la producció enzimàtica del creixement a 30°C és comparable a la de la soca 3 a ambdues temperatures.

Aquesta manca de síntesi enzimàtica a 42°C, conjuntament amb el resultat obtingut de la inactivació tèrmica de l'enzim produït per la soca JA-104, indicarien que la mutació termosensible hauria afectat, molt probablement al gen regulador.

FIGURA 33. INACTIVACIÓ TERMICA DE L'ENZIM LACTALDEHID
DESHIDROGENASA DE LES SOQUES 3 i JA-104.

Extractes cel.lulars de les soques 3 i JA-104, fetes créixer en hidrolitzat de caseïna a 30°C, ajustats a una concentració de proteïna de 1mg/ml, foren incubats a 50°C a diferents intervals de temps (0, 2, 4 i 7 minuts).

L'activitat enzimàtica s'expressa en % respecte l'activitat inicial :

- Soca 3 (o)
- Soca JA-104 (●)

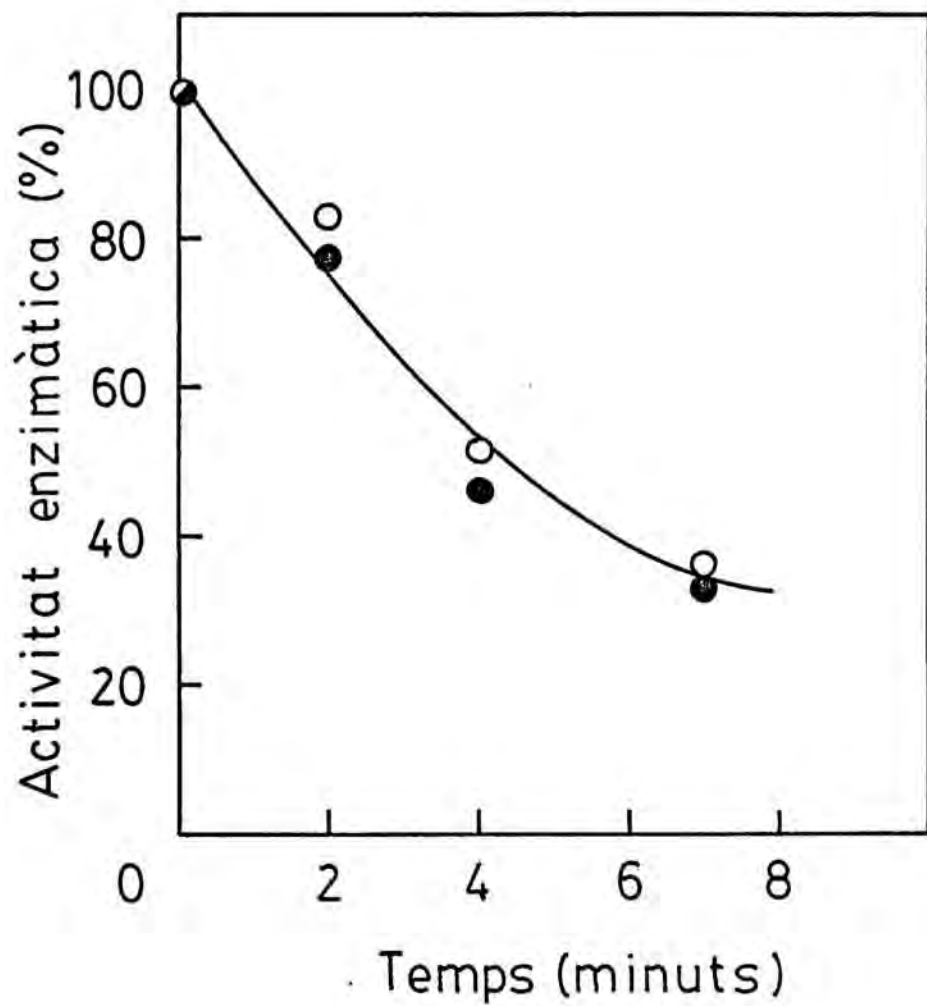
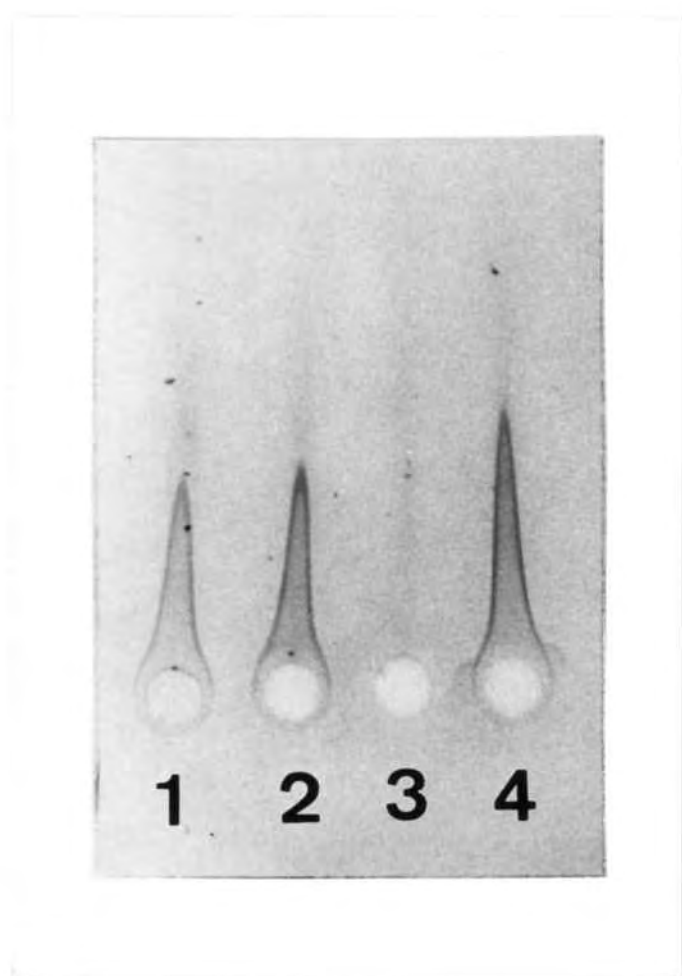


FIGURA 34. IMMUNOELECTROFORESI DELS EXTRACTES CEL.LULARS DE LES SOQUES 3 I JA-104.

El gel contenia 0,4% (v/v) de la fracció globulines anti-lactaldehid deshidrogenasa.

En cada pouet s'aplicà 50 µg d'extracte cel.lular dels cultius aeròbics en hidrolitzat de caseïna de :

- 1) soca JA-104 a 30°C
- 2) soca 3 a 30°C
- 3) soca JA-104 a 42°C
- 4) soca 3 a 42°C.



- Localització de la mutació termosensible.

Donat que en E.coli, el fenotip Prd (utilització de propandiol) està localitzat a prop del sistema de la fucosa, i que l'adquisició d'aquesta nova capacitat metabòlica per mutació, comporta la pèrdua de la capacitat d'utilitzar fucosa com a font de carboni i energia (68), s'analitzà la proximitat d'aquesta mutació termosensible que afectava a la síntesi de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa amb el locus fuc, mitjançant una transducció generalitzada amb el fag P1. Com a soca donadora s'utilitzà la soca JA-104 i com a soca receptora, la soca 1.

Cal esmentar que es plantejaren problemes d'infecció de la soca JA-104 (d'aspecte mucós) amb el bacteriòfag P1, que es solventaren afegint el CaCl_2 a la concentració de 10 mM (l'habitual era de 5 mM) (veure 2.2.2).

Els transductants foren seleccionats per la seva capacitat de créixer en propandiol a 30°C. S'analitzà el fenotip de 175 transductants, seleccionats d'aquesta manera, en quant a la seva capacitat d'utilitzar fucosa i la de créixer en propandiol a 42°C (taula 11). De les 175 soques estudiades, 110 (63%) havien perdut la capacitat d'utilitzar fucosa i a la vegada havien adquirit la mutació termosensible. El percentatge de co-transducció de tots dos fenotips : Prd^+ i termosensibilitat per a la síntesi de lactaldehyd deshidrogenasa fou del 78%. Per últim, la freqüència de co-transducció entre els caracters Prd^+ i Fuc^- fou del 83%.

Aquestes dades reflecteixen una proximitat marcada entre el locus fuc i la termosensibilitat de la lactaldehyd deshidro-

TAULA 11.

LOCALITZACIÓ DE LA MUTACIÓ TERMOSENSIBLE DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA DE LA SOCA JA-104,
PER TRANSDUCCIÓ AMB EL FAG P1.

SOQUES UTILITZADES	FENOTIP SELECCIONAT	FENOTIP TRANSDUCTANTS ^{A)}	% TRANSDUCTANTS
<u>DONADORA:</u> soca JA-104 Fuc ⁻ , Prd ⁺ , LALDH ^{ts} _{B)}	Prd ⁺ a 30°C	Fuc LALDH	
		D D	63
<u>RECEPTORA:</u> soca 1 Fuc ⁺ , Prd ⁻ , LALDH ^{tr} _{C)}		D R	20
		R D	15
		R R	2

A) D fa referència a les característiques de la soca donadora
R fa referència a les característiques de la soca receptora.

B) LALDH^{ts} = mutació termosensible que afecta a la síntesi de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa.

C) LALDH^{tr} = fenotip de la síntesi de lactaldehyd deshidrogenasa tipus salvatge.

genasa. Els percentatges de co-transducció obtinguts estarien d'acord amb una distribució dels marcadors, tal com es presenta a la figura 35.

Sis dels transductants, que presentaven el fenotip de la soca donadora (la soca JA-104) foren analitzats enzimàticament (taula 12). Tots ells mostraven nivells normals de propandiol òxido-reductasa en els extractes cel.lulars obtinguts a partir de creixements aeròbics en hidrolitzat de caseïna, tant a 30°C com a 42°C. Per una altra banda, no es detectava activitat lactaldehyd deshidrogenasa si els cultius havien estat incubats a 42°C, mentre que els nivells eren normals en els creixements realitzats a 30°C. Tots eren, per tant, termosensibles per a la síntesi de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa a l'igual que la soca donadora JA-104.

3.5.1.5.3. Mutant de síntesi incrementada de lactaldehyd deshidrogenasa : la soca JA-102.

La caracterització d'aquesta soca es detallarà a l'apartat 3.6.

3.5.2. REGULACIÓ POST-TRANSCRIPCIONAL.

Com ja s'ha esmentat amb anterioritat, la lactaldehyd deshidrogenasa és un enzim eminentment aeròbic. La seva síntesi està aturada en condicions anaeròbiques, seguint un model de regulació transcripcional.

Es va creure interessant analitzar si l'enzim estava també