



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Anàlisi estructural, funcional i de regulació de la lactaldehid 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

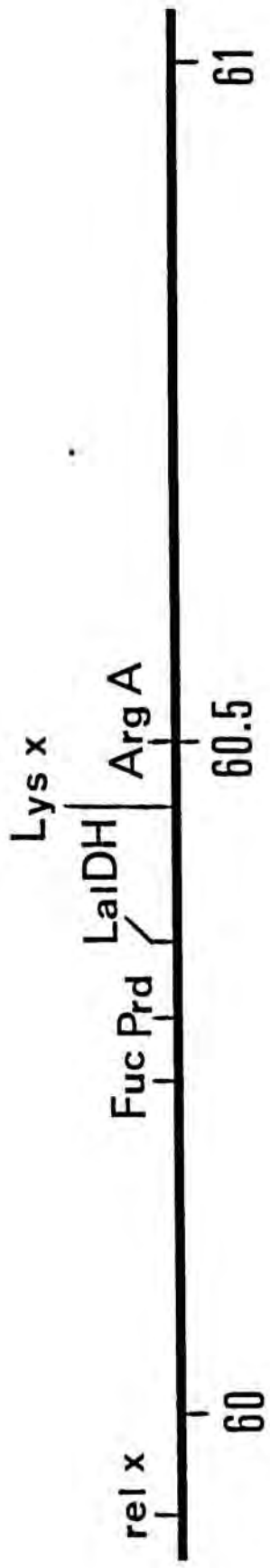
Barcelona, octubre de 1986

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700082930

FIGURA 35. LOCALITZACIÓ DE LA MUTACIÓ TERMOSENSIBLE QUE AFECTA LA SINTESI DE LACTALDEHID DES-HIDROGENASA EN LA SOCA JA-104.



MIN

TAULA 12.

ANÀLISI ENZIMÀTICA DE 6 TRANSDUCTANTS AMB EL FENOTIP FUC⁻ PRD⁺ LALDH^{ts} A)

ACTIVITAT ESPECÍFICA^{B)}
CREIXEMENT A 42°C

ACTIVITAT ESPECÍFICA^{B)}
CREIXEMENT A 30°C

SOCA	POR	LALDH	POR	LALDH
3	290	190	180	180
JA-104	240	150	190	0
-----	-----	-----	-----	-----
T1	220	120	190	0
T2	260	120	190	0
T4	300	140	140	0
T6	260	140	140	0
T7	250	160	200	0
T8	200	180	200	0

A) LALDH^{ts} = Temosensibilitat per a la utilització del propandiol per dèficit de lactaldehid deshidrogenasa.

B) Expressada com a mU/mg. POR = propandiol òxido-reductasa / LALDH = lactaldehid deshidrogenasa

sotmés a altres mecanismes de regulació del tipus post-transcripcional, que modularien la seva activitat una vegada sintetitzat segons les condicions del cultiu.

3.5.2.1. REGULACIÓ "IN VIVO".

Aquests estudis de regulació "in vivo" pretenien evidenciar si l'enzim lactaldehid deshidrogenasa present en les cèl.lules d'un cultiu inductor era afectat pel canvi a condicions d'oxigenació i font de carboni diferents.

Així, es feia créixer la soca l aeròbicament en ramnosa, fins a una densitat òptica del cultiu de 3 (mesurada a 420 nm). Les cèl.lules eren recollides per centrifugació i rentades amb solució salina o medi mineral basal en condicions estèrils. A continuació, eren transferides a medis de cultiu totalment diferents al de partida. Així, es van preparar cinc condicions diferents : 1) medi anaeròbic en ramnosa, 2) medi anaeròbic en ramnosa en absència de sulfat amònic en el medi mineral basal, 3) medi anaeròbic en fucosa, 4) medi anaeròbic sense cap font de carboni, i 5) medi aeròbic sense font de carboni.

Les cèl.lules induïdes i inoculades en aquests medis eren recollides per centrifugació a diferents temps (des de 30 minuts a 4 hores). S'obtenien els extractes cel.lulars on s'analitzaven dos paràmetres : l'activitat enzimàtica lactaldehid deshidrogenasa i la quantitat d'enzim present en aquests extractes per immunoelectroforesi (figura 36). S'observa, que la transferència a medis anaeròbics en ramnosa (36-A) i fucosa (36-B) no provocava una inactivació considerable de l'enzim, car

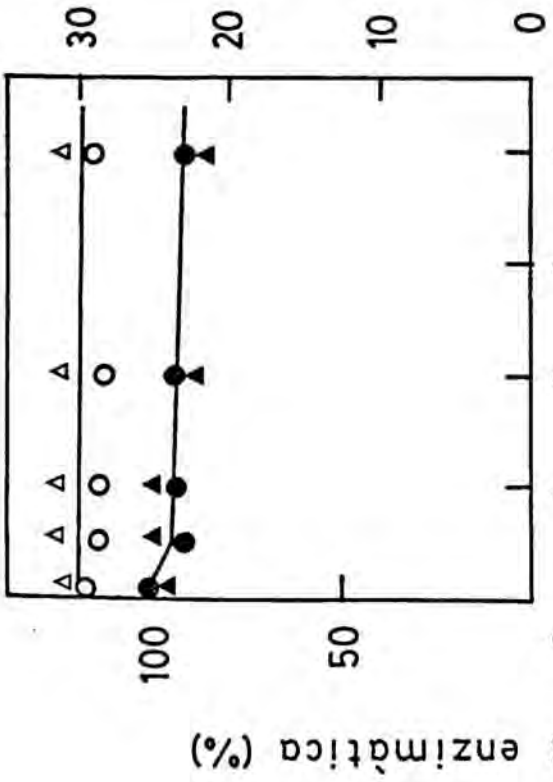
FIGURA 36. ESTUDI DE L'ADAPTACIÓ DE CÈL.LULES DE LA SOCA I INDUÏDES PEL CREIXEMENT AERÒBIC EN RAMNOSA EN LA TRANSFERÈNCIA ALS SEGÜENTS MEDIS :

- A) Anaeròbic en ramnosa (o/●)
- B) Anaeròbic en fucosa
- A) Anaeròbic en ramnosa en absència de sulfat amònic (Δ/▲)
- C) Anaeròbic sense font de carboni
- D) Aeròbic sense font de carboni.

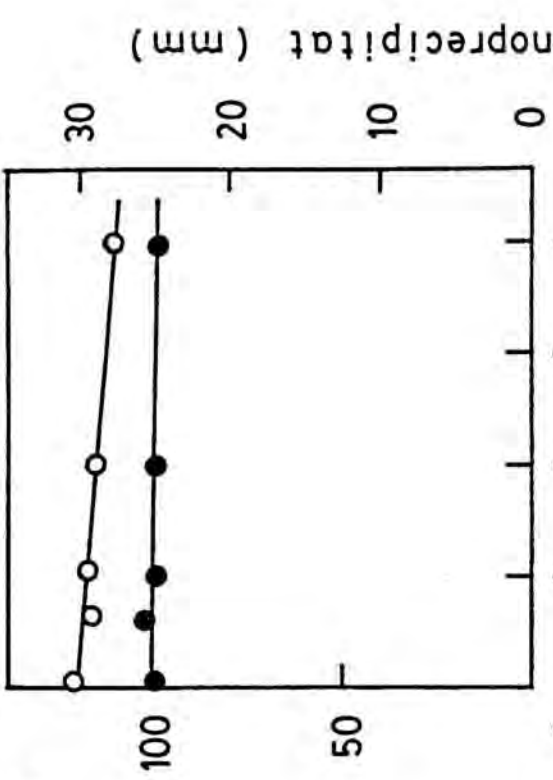
En tots els cassos, en ordenades es representa l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa després de la transferència de medi (símbols plens), expressada com a percentatge respecte l'activitat del cultiu aeròbic en ramnosa de partida, així com l'alçada dels arcs de precipitació (en mm) obtinguts en les immunoelectroforesis (en símbols buits) davant de preparacions de globulines anti-lactaldehyd deshidrogenasa.

En abscisses es representa el temps (en hores) d'adaptació al nou medi.

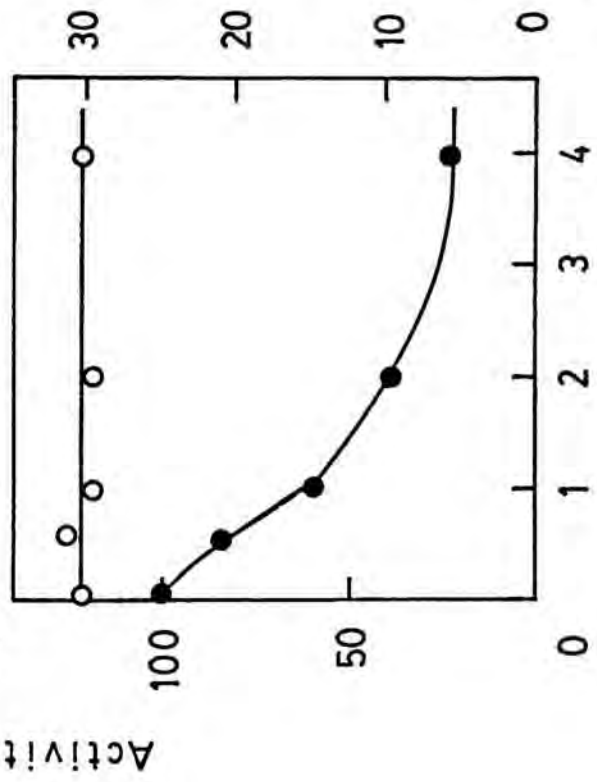
A



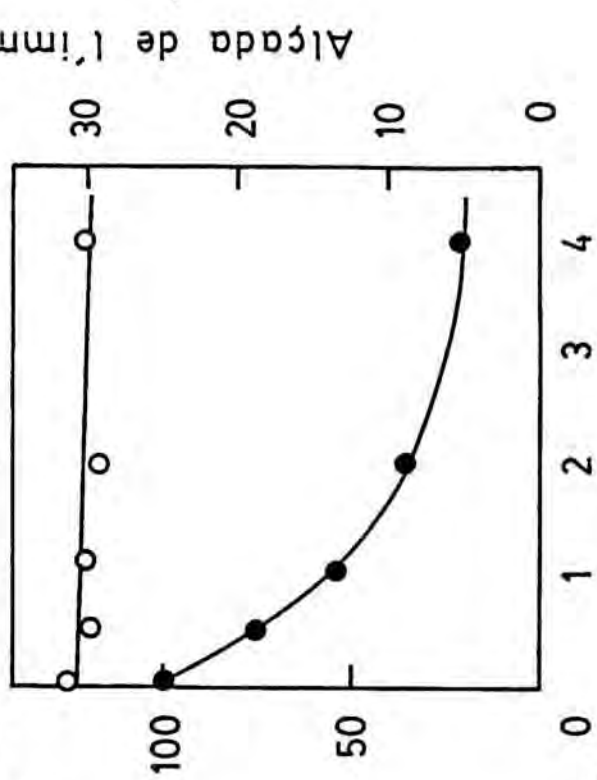
B



C



D



Temps (hores)

a les 4 hores, l'activitat era encara superior al 80%. Tampoc es detectava una devallada en l'alçada de l'immunoprecipitat, tot indicant que l'enzim no era degradat (figures 36-A i 36-B).

El mateix resultat s'obtingué en la transferència a un medi anaeròbic en ramnosa on la síntesi de proteïnes estava aturada per manca d'una font de nitrogen i sofre (figura 36-A).

L'adaptació de les cèl.lules induïdes a un medi anaeròbic sense cap font de carboni comportava la inactivació ràpida de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa, quina activitat, a les 4 hores, era només d'un 25% de l'activitat inicial del cultiu induït per ramnosa en condicions aeròbiques. L'alçada dels arcs de precipitació obtinguts en les immunoelectroforesis es mantenia constant, tot indicant que la inactivació detectada no era deguda a una degradació de la proteïna enzimàtica (figura 36-C).

Per a comprovar si aquesta inactivació era deguda exclusivament a l'absència de font de carboni en el medi de cultiu, la soca induïda pel creixement aeròbic en ramnosa fou transferida a un medi també aeròbic que consistia només, en les sals minerals basals. En aquestes condicions s'observà també una davallada en els nivells d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa del mateix ordre, paral·lela a una estabilitat total de l'enzim (figura 36-D).

El fet que l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa no fós degradat després de 4 hores d'adaptació a medis on no era necessari, indicava que el recanvi de l'enzim dins la cèl.lula era lent.

L'estabilitat "in vivo" de la lactaldehyd deshidrogenasa

fou estudiada per transferència de cèl.lules de la soca 1 induïdes pel creixement aeròbic en ramnosa a un medi de sals minerals sense font de carboni, en condicions aeròbiques, on eren incubades en agitació a 37°C durant 24 hores. A diferents temps, al·lotes del cultiu eren recollides per centrifugació i processades per a obtenir els extractes cel.lulars, on s'assajava l'activitat enzimàtica i la quantitat d'enzim lactaldehyd deshidrogenasa present (figura 37). A les 24 hores, l'activitat enzimàtica era només d'un 10% de la inicial. Malgrat tot, l'alçada de l'immunoprecipitat no havia sofert cap modificació. Aquest resultat indicava que l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa és molt estable "in vivo" com la majoria de proteïnes d'E.coli (58).

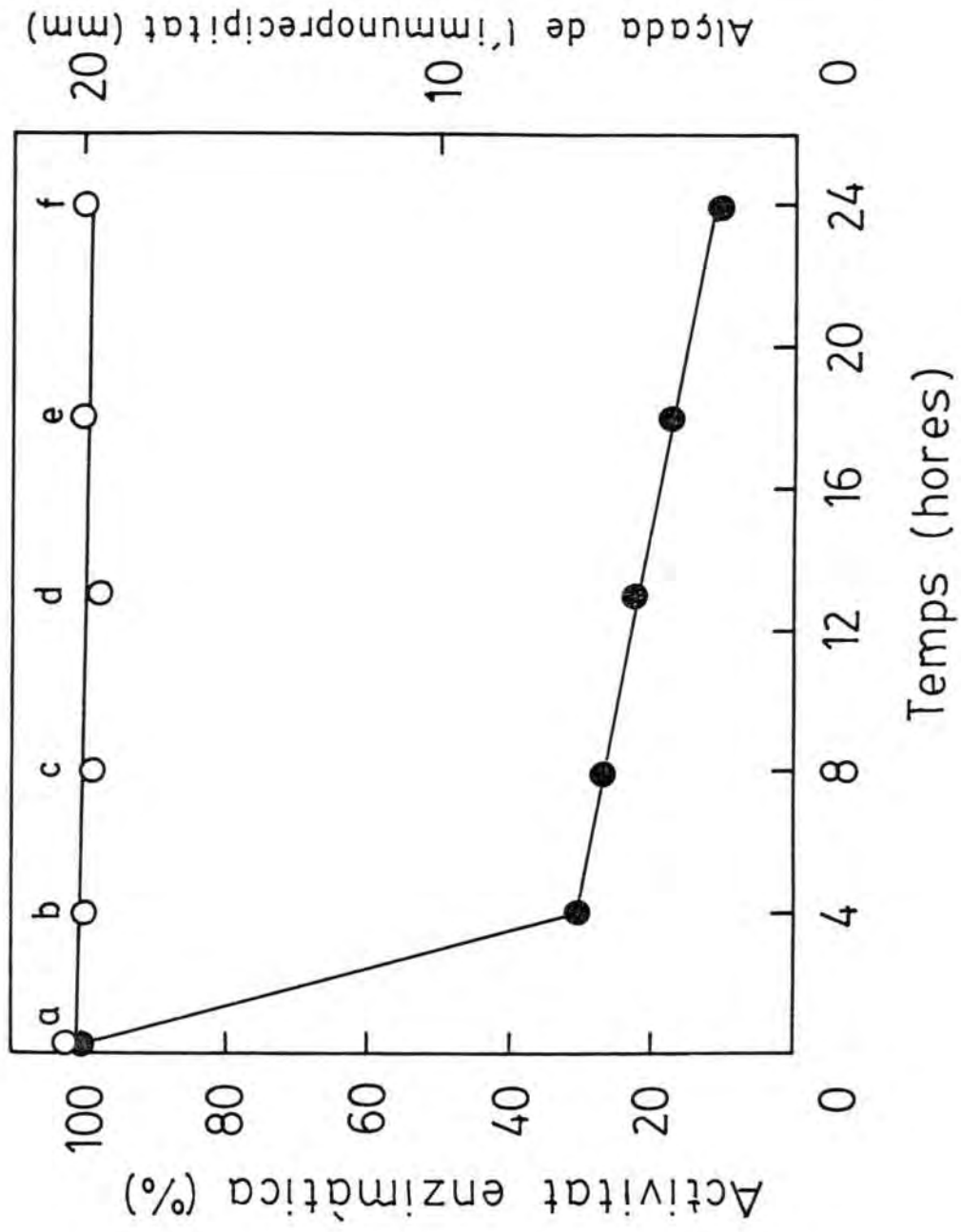
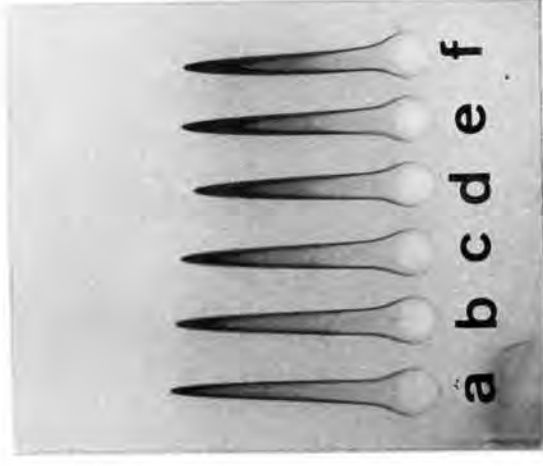
3.5.2.2. REGULACIÓ PER EFECTORS EN L'ENZIM PURIFICAT.

La lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli és inhibida per concentracions d'aldehyd superiors a la que presenta la V_{max} . El perfil d'inhibició per substrat varia segons l'aldehyd emprat. Així, la inhibició més marcada la provoca el L-lactaldehyd (apartat 3.3.2.7 i figura 24). Aquest fenomen d'inhibició per substrat és una característica comuna a la majoria d'aldehyd deshidrogenases descrites (40,46,67).

S'analitzà, també, l'efecte que els productes de la reacció enzimàtica produïen en l'activitat de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa purificat. Així, s'assajà l'activitat enzimàtica en presència de diferents concentracions de NADH i de glicolat en la mescla d'assaig, tot mantenint les concentracions

FIGURA 37. ESTABILITAT "IN VIVO" DE L'ENZIM LACTALDEHID DESHIDROGENASA EN CONDICIONS AERÒBIQUES I AMB CARENCIA DE NUTRIENTS.

- A) En ordenades es representa l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa després de la transferència de medi (●-●), que s'expressa com a percentatge respecte a l'activitat enzimàtica mesurada a l'extracte cel.lular del cultiu aeròbic en ramnosa que servia de partida. També es representa l'alçada dels arcs de precipitació obtinguts per immunoelectroforesi en front d'anticossos específics (o). Les lletres representades a la figura corresponen a les mostres que van ésser sotmeses a electroimmunodifusió, quin resultat s'observa a la fotografia adjunta.
- B) Electroimmunodifusió segons Laurell de la lactaldehyd deshidrogenasa present en els extractes cel.lulars de la soca 1 en els diferents temps d'adaptació al medi sense nutrients, que s'indiquen mitjançant lletres. Les mostres analitzades contenen 50 µg de proteïna. El gel contenia un 0,4% (v/v) de la preparació de globulines anti-lactaldehyd deshidrogenasa.

A**B**

Alçada de l'immunoprecipitat (3m)

de substrat (glicolaldehid) i cofactor (NAD^+) saturants, de 1 mM i 2,5 mM respectivament.

A la figura 38-A es representa el perfil d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa obtingut a l'assajar en presència de diferents concentracions de NADH que abarcaven des de 0,05 a 1 mM. El blanc s'ajustava per a cada determinació, segons la concentració de NADH analitzada, a fi d'evitar interferències. Com es pot veure, el NADH té un efecte inhibidor considerable de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa. Concentracions de NADH de l'ordre de 1 mM provocaven una inhibició total de l'activitat enzimàtica.

L'efecte produït pel glicolat es representa a la figura 38-B. Les concentracions d'aquest àcid necessàries per a produir una inactivació apreciable de l'enzim són massa elevades (superiors a 30 mM) per a ésser considerades importants en la modulació de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa en condicions fisiològiques.

Per contra, la inhibició provocada pel NADH podria tenir implicacions regulatòries "in vivo", ja que concentracions de NADH de l'ordre de 1 mM o inferiors caurien dins del rang fisiològic en condicions anaeròbiques (176,184).

FIGURA 38. A) EFECTE DEL NADH EN L'ACTIVITAT DE L'ENZIM LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

S'assajà l'activitat enzimàtica d'una preparació purificada sobre glicolaldehid 1 mM, en presència de diferents concentracions de NADH : 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 i 1 mM.

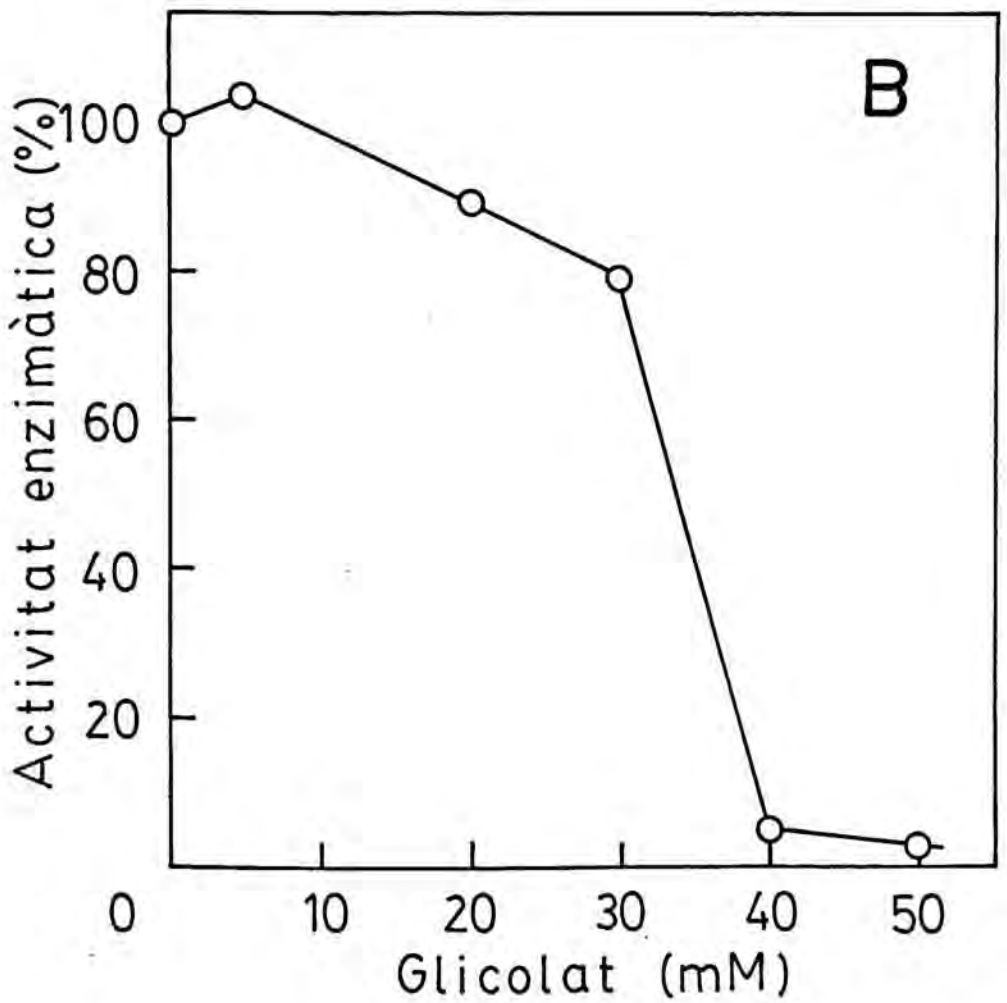
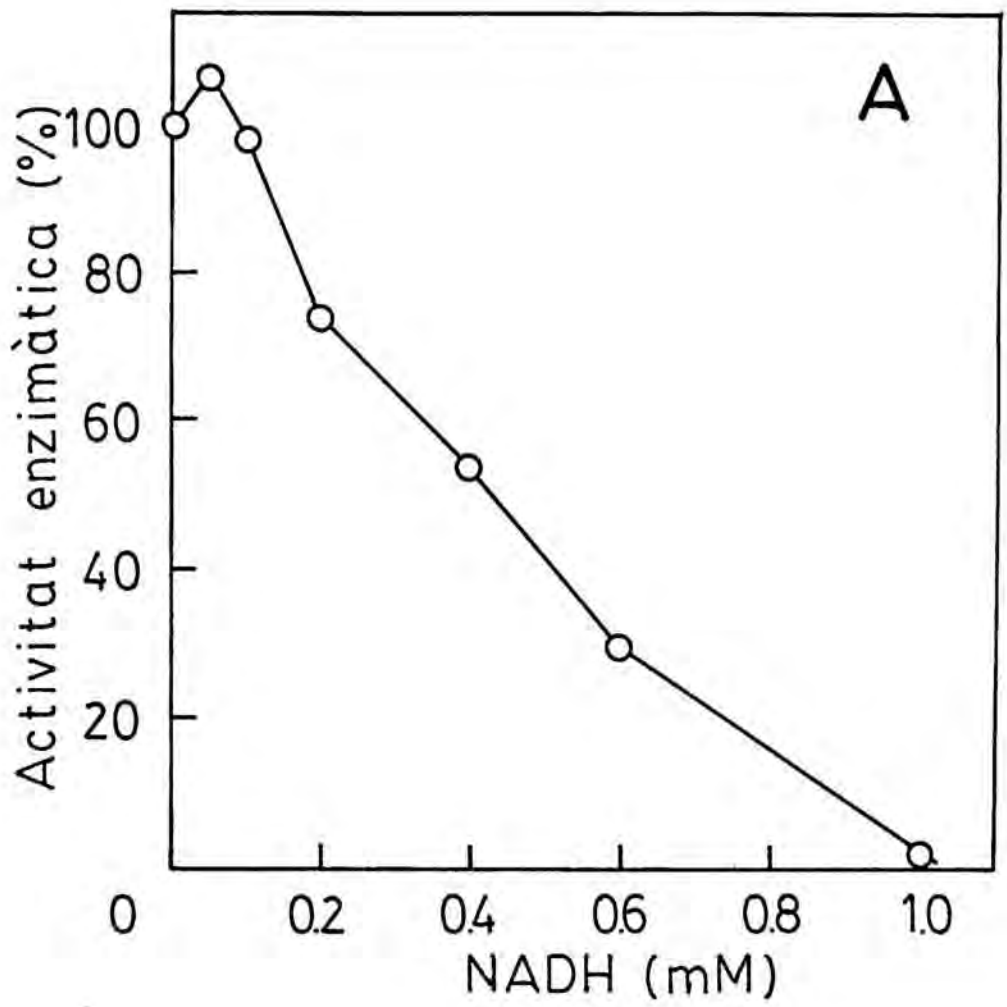
Es representa el percentatge d'activitat respecte al control (sense NADH) en front de les concentracions de NADH esmentades.

B) EFECTE DE LA CONCENTRACIÓ DE GLICOLAT SOBRE L'ACTIVITAT DE L'ENZIM LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

S'assajà l'activitat enzimàtica d'una preparació purificada sobre glicolaldehid 1 mM, en presència de diferents concentracions de glicolat : 5, 20, 30, 40 i 50 mM.

Es representa el percentatge d'activitat respecte al control (sense glicolat) en front de les concentracions de glicolat esmentades.

En tots dos experiments (A i B), els valors són la mitjana de dues determinacions.



3.6. ACTIVITAT GLICOLALDEHID DESHIDROGENASA EN MUTANTS D' E. COLI ETILENGLICOL POSITIUS : SOCA JA-102.

Un dels aspectes que es va decidir d'abordar en aquest treball va ésser el d'identificar i caracteritzar l'activitat glicolaldehid deshidrogenasa de la soca JA-102.

En el nostre laboratori i amb anterioritat a aquest treball, s'obtingueren mutants capaços de créixer en etilenglicol com a única font de carboni i energia (16) (apartat 1.3.3). L'estudi de la via d'utilització de l'esmentat glicol demostrà que el primer pas, és a dir, l'oxidació de l'etilenglicol a glicolaldehid era catalitzat per la propandiol òxido-reductasa present ja a la soca progenitora. Quedava per identificar l'enzim responsable del següent pas, l'oxidació del glicolaldehid a glicolat. Donat que la selecció dels mutants amb aquesta nova capacitat metabòlica comportava un increment d'unes tres vegades en els nivells d'activitat glicolaldehid deshidrogenasa dels extractes de la soca JA-102, respecte de la soca 3, es va creure d'interès identificar si l'enzim responsable d'aquesta activitat en els nous mutants era un isoenzim diferent de la lactaldehid deshidrogenasa d'E. coli, o bé era el mateix enzim amb una síntesi incrementada, o ambdues possibilitats.

3.6.1. ACTIVITAT GLICOLALDEHID DESHIDROGENASA EN EXTRACTES CEL·LULARS DE LA SOCA JA-102

S'havia descrit que l'activitat glicolaldehid deshidrogenasa era constitutiva, i no induïble, en la soca JA-102,

car els nivells d'activitat enzimàtica eren idèntics en els creixements en hidrolitzat de caseïna i en etilenglicol, a diferència de la soca 3, on el propandiol indueix l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa respecte de l'hidrolitzat de caseïna (16).

Donat que en aquest treball es presenta l'hidrolitzat de caseïna com una font inductora de l'activitat de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa d' E.coli (degut al glutamat) es va determinar l'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa en els extractes cel.lulars de la soca JA-102 després del seu creixement en les següents condicions aeròbiques : glucosa, glicerol, hidrolitzat de caseïna i etilenglicol. Els valors obtinguts es van comparar amb els de la soca 3 en les mateixes condicions de creixement. A la taula 13 s'indiquen els ementats valors d'activitat enzimàtica.

S'observa clarament, que els nivells d'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa en els extractes de la soca JA-102 són més baixos en glucosa i glicerol que en els corresponents medis inductors. És per aquest motiu que no es pot considerar constitutiu l'enzim responsable d'aquesta activitat enzimàtica en la soca JA-102. Si bé cal remarcar que la inducció aconseguida per l'hidrolitzat de caseïna és idèntica a la de l'etilenglicol.

3.6.2. EVIDÈNCIES QUE L'ACTIVITAT GLICOLALDEHID DESHIDROGENASA ÉS FUNCIO DE L'ENZIM LACTALDEHID DESHIDROGENASA,

Al llarg de tot aquest bloc de resultats, s'aporten dades que reflecteixen la similitud estructural i cinètica entre

TAULA 13

ACTIVITAT GLICOLALDEHID DESHIDROGENASA EN EXTRACTES CEL·LULARS DE LES SOQUES 3 i JA-102

ACTIVITAT ENZIMÀTICA A)

Font de carboni B)	soca 3	soca JA-102
Glucosa	35	200
Glicerol	85	220
Hidrolitzat de caseïna	175	800
Propandiol	290	-
Etilenglicol	-	790

A) Activitat glicolaldehid deshidrogenasa mesurada com es descriu a 2.4.2.1 i expressada com a mU/mg.

B) tots els cultius eren aeròbics.

l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli (present a les soques 1 i 3) i l'enzim responsable de l'oxidaci6 del glicolaldehyd format en el metabolisme de l'etilenglicol en la soca JA-102.

Per a portar a terme aquest aspecte del treball, les activitats enzimàtiques es van mesurar segons es descriu a l'apartat 2.4.2. Així, l'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa era mesurada sobre glicolaldehyd 1 mM i a pH 9,5. L'activitat lactaldehyd deshidrogenasa era assajada segons que descriuen Sridhara i Wu (150), a pH 10,5 i en presència de glutathion 1 mM, amb una petita modificaci6 referent a la concentraci6 de lactaldehyd usada a l'assaig, que en el nostre cas era de 0,1 mM (la concentraci6 de lactaldehyd descrita per aquests autors era de 20 mM).

Aquest assaig va ésser modificat posteriorment en el nostre laboratori, al comprovar que el pH òptim de l'enzim era de 9,5 en amortidor glicina-NaOH i que la presència de glutathion no millorava l'activitat enzimàtica.

3.6.2.1. INDUCCIÓ PARALLELA D'AMB DUES ACTIVITATS.

Un dels primers estudis realitzats a fi d'esbrinar l'origen de l'enzim responsable de l'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa en la soca JA-102, va ésser comprovar si les condicions de creixement descrites com a inductores de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa en la soca 1 i en la soca 3, ho eren també de l'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa.

Així, es va fer créixer les soques 1, 3 i JA-102 en hidro-

litzat de caseïna i en els corresponents medis inductors : fucosa per a la soca 1, L-1,2-propandiol per a la soca 3, i etilenglicol per a la soca JA-102. Tots els creixements eren aeròbics. En els extractes cel·lulars obtinguts s'assajà l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa (segons la modificació descrita del mètode de Sridhara i Wu) i l'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa (taula 14). S'observa que la inducció de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa pel creixement aeròbic en fucosa era concomitant amb la inducció de l'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa en la soca 1. Aquesta inducció conjunta s'observava també en la soca 3 quan creixia en 1,2-propandiol. En la soca JA-102, que sintetitza alts nivells d'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa quan creix en hidrolitzat de caseïna i etilenglicol, es detectetava també una activitat lactaldehyd deshidrogenasa que responia d'idèntica manera.

La relació entre ambdues activitats es mantenia constant en cada extracte analitzat, tant en la soca tipus salvatge, com en les soques mutants, indepenenment de les condicions de creixement.

3.6.2.2. ABSENCIA D'ACTIVITAT GLICOLALDEHID DESHIDROGENASA

EN MUTANTS DEFICIENTS DE LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

Al llarg d'aquest treball, s'han descrit dos mutants d' E. coli derivats de la soca 3 : la soca 40 (150) i la soca termosensible JA-104, deficients en l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa, per tant, incapaços d'utilitzar el propandiol com a única font de carboni i energia.

TAULA 14

ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES LACTALDEHID DESHIDROGENASA I GLICOLALDEHID DESHIDROGENASA EN DIVERSES
SOQUES D'E. COLI I CONDICIONS INDUCTORES.

SOCA	FONT DE CARBONI	LACTALDEHID a)		GLICOLALDEHID a)	
		DESHIDROGENASA		DESHIDROGENASA	L/G
1	CAA c)	117	220	0,53	
1	Fucosa	171	300	0,57	
3	CAA	90	170	0,53	
3	1,2-propandiol	168	285	0,59	
JA-102	CAA	448	800	0,56	
JA-102	Etilenglicol	435	790	0,55	

a) Les activitats enzimàtiques s'expressen com a mU/mg.

b) L/G = relació activitat lactaldehid deshidrogenasa / glicolaldehid deshidrogenasa.

c) CAA = hidrolitzat de caseïna.

Es va fer créixer aquests mutants en hidrolitzat de caseïna. La soca 40 i la soca 3 s'incubaren a 37°C; la soca JA-102 a 30°C i 42°C. En els extractes cel·lulars s'assajaren totes dues activitats, lactaldehid i glicolaldehid deshidrogenasa. Els resultats es presenten a la taula 15, on s'observa que els mutants deficientes en l'enzim lactaldehid deshidrogenasa no presenten tampoc activitat glicolaldehid deshidrogenasa. La soca JA-104 presenta ambdues activitats a la temperatura permisiva.

3.6.2.3. MOBILITAT ELECTROFORÈTICA DE TOTS DOS ENZIMS.

L'electroforesi en gels de poliacrilamida al 7,5% en condicions no desnaturalitzants d'extractes cel·lulars de la soca 1 feta créixer en fucosa, de la soca 3 feta créixer en 1,2-propandiol i de la soca JA-102 cultivada en etilenglicol, mostrà en tots els cassos una única banda amb idèntica mobilitat electroforètica, quan es revelà per activitat glicolaldehid deshidrogenasa i per activitat lactaldehid deshidrogenasa (figura 39). La barreja d'extractes de la soca 1 i de la soca JA-102 aplicada a una electroforesi en les mateixes condicions, també donava una única banda a l'ésser revelada per ambdues activitats (resultats no mostrats). La identificació de l'activitat aldehid deshidrogenasa amb aquesta única banda de la figura 39 era confirmada pel fet que extractes cel·lulars de la soca 40, sotmesos a aquest tipus d'electroforesi, no donaven cap banda d'activitat enzimàtica del tipus aldehid deshidrogenasa (figura 39).

TAULA 15

ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES EN MUTANTS DEFICIENTS EN LACTALDEHID DESHIDROGENASA

Activitat enzimàtica	Soca 40		Soca 3		Soca JA-104	
	37°C	(mU/mg)	37°C	(mU/mg)	30°C	42°C
a) LACTALDEHID DESHIDROGENASA	< 5	(mU/mg)	90	(mU/mg)	80	< 5
b) GLICOLALDEHID DESHIDROGENASA	< 5	(mU/mg)	170	(mU/mg)	140	< 5
c) PROPANDIOL ÒXIDO-REDUCTASA	-	(mU/mg)	270	(mU/mg)	240	210

Les soques havien crescut aeròbicament en hidrolitzat de caseïna.

a) Determinada sobre glicolaldehid 1 mM i NAD⁺ 2,5 mM, a pH 9,5

b) Mesurada segons una modificació del mètode descrit per Sridhara i Wu (apartat 2.4.2)

c) Mesurada com s'indica a 2.4.2.3.

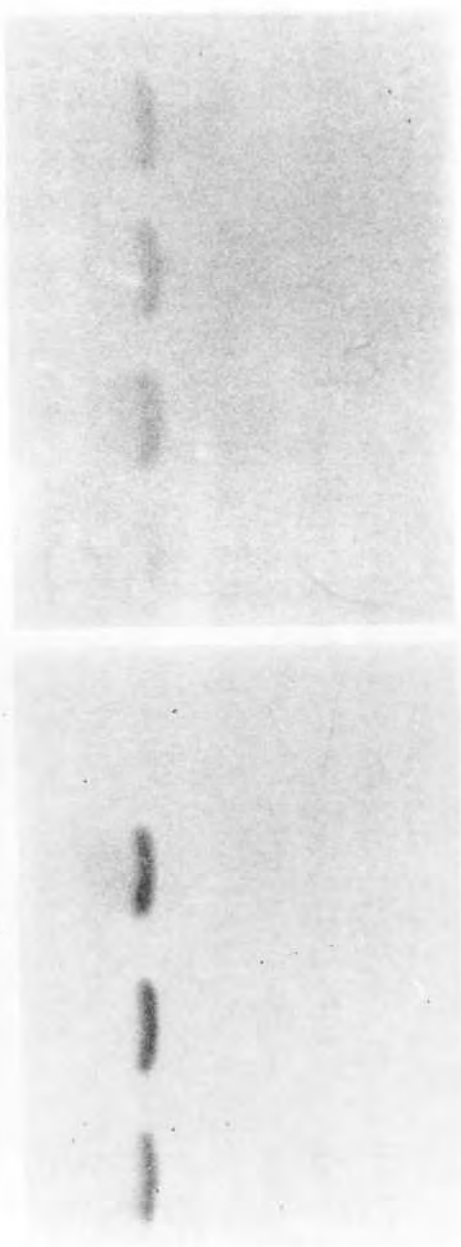
FIGURA 39. ELECTROFORESI EN GELS DE POLIACRILAMIDA D'EXTRACTES CEL·LULARS DE LES SOQUES 1, 3, JA-102 i 40.

Extractes cel·lulars (300 µg de proteïna) de la soca 1 feta créixer en fucosa (1 i 8), de la soca 3 feta créixer en 1,2-propandiol (2 i 7), de la soca JA-102 feta créixer en etilenglicol (3 i 6), i de la soca 40 feta créixer en hidrolitzat de caseïna (4 i 5) van ésser aplicats a una electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions no desnaturalitzants. El gel va ésser tallat en dos fragments entre els carrils 4 i 5.

- A) Revelat per activitat glicolaldehid deshidrogenasa.
- B) Revelat per activitat lactaldehid deshidrogenasa.

A

B



1 2 3 4 5 6 7 8

Endemés, els enzims purificats, tant a partir de la soca JA-102, com de la soca 3 i de la soca 1, donaven, en gels de poliacrilamida-SDS, una única banda amb Blau Brillant de Coomassie d'idèntica mobilitat electroforètica (figura 13). Així mateix, l'electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions no dissociants de 70 µg de la preparació enzimàtica purificada de la soca JA-102 donava una única banda coincident a l'ésser revelada tant per activitat lactaldehyd deshidrogenasa, com per activitat glicolaldehyd deshidrogenasa.

3.6.2.4. CO-ELUCIÓ DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA DE LA SOCA 1 I LA GLICOLALDEHID DESHIDROGENASA DE LA SOCA JA-102 EN UNA CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHADEX.

Es van mesclar extractes crus de la soca 1 feta créixer en fucosa aeròbicament, i de la soca JA-102 crescuda en hidrolitzat de caseïna (en la proporció d'activitats equivalents). La mescla en un volum total de 2 ml va ésser aplicada a una columna de DEAE-sephadex (130 x 25 mm) equilibrada amb solució amortidora de pH Tris-HCl 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 175 mM ajustada a pH 7,3. Aquest amortidor també va ésser emprat en l'obtenció dels extractes cel.lulars. Després de rentar la columna amb la mateixa solució fins a que ja no eluia proteïna, es va aplicar un gradient lineal de NaCl entre 175 - 500 mM en 400 ml (flux $12,25 \text{ ml} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$).

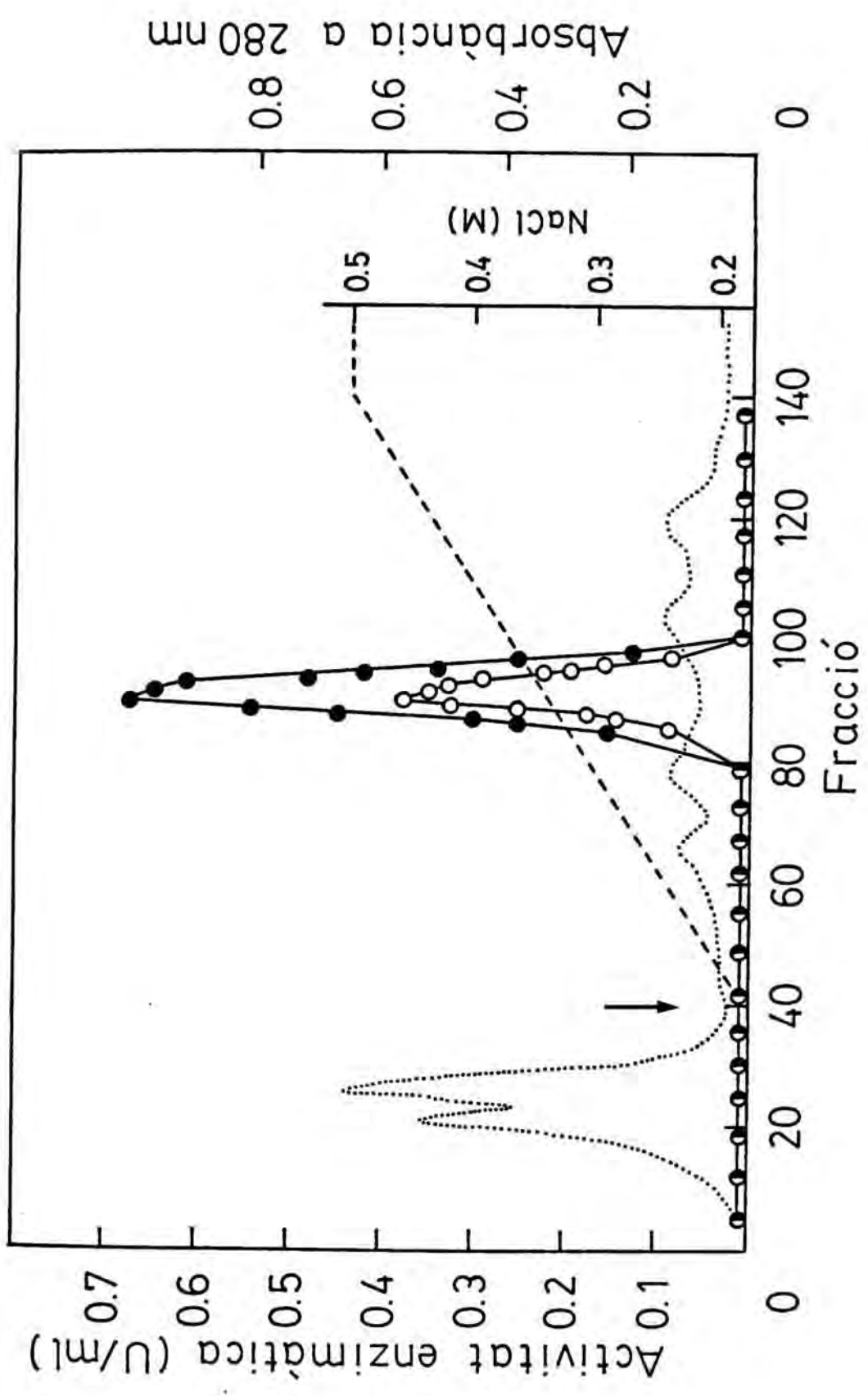
En les fraccions col.lectades s'assajava l'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa i la lactaldehyd deshidrogenasa, tal

FIGURA 40. CROMATOGRAFIA DE BSCANVI ANIONIC EN
DEAE-SEPHADEX D'EXTRACTES CEL.LULARS DE
LES SOQUES 1 I JA-102

La cromatografia es desenvolupà segons
es descriu a 3.6.2.4.

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

L'elució dels enzims amb activitat gli-
colaldehyd deshidrogenasa (●-●) i lactalde-
hid deshidrogenasa (o-o) s'aconseguí amb un
gradient lineal de NaCl entre 175 i 500 mM,
en 400 ml (---)



com es descriu al començar l'apartat 3.6.2. S'obtenia un únic pic d'activitat glicolaldehid deshidrogenasa i un únic pic de l'altre activitat. Tots dos pics eren coincidents en aquestes condicions, tot indicant l'idèntic comportament cromatogràfic dels enzims presents en les dues soques (figura 40).

3.6.2.5. CO-PURIFICACIÓ D'AMBDUES ACTIVITATS.

Un altre criteri d'identitat fou la co-purificació de les activitats glicolaldehid i lactaldehid deshidrogenases seguint el procés descrit per a la lactaldehid deshidrogenasa a l'apartat 2.5. Així, l'enzim responsable de l'activitat glicolaldehid deshidrogenasa de la soca JA-102 va ésser purificat a través del mètode esmentat. Durant tot el procés, en les fraccions col·lectades s'assajaven les dues activitats, les quals co-purificaven, mantenint-se la relació entre elles constant fins al final (L/G a la taula 16). A més cap altre activitat aldehid deshidrogenasa va ésser detectada a l'assajar totes les fraccions de cada pas.

El seguiment del procés de purificació per ambdues activitats també fou emprat en la purificació de la lactaldehid deshidrogenasa de la soca 3, Observant-se la co-purificació descrita anteriorment, la qual quedava reflectida en els valors de la relació L/G (taula 16).

TAULA 16

PURIFICACIÓ DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA DE LA SOCA 3 I DE L'ENZIM AMB ACTIVITAT GLICOL-
ALDEHID DESHIDROGENASA DE LA SOCA JA-102.

	SOCA 3				SOCA JA-102					
	LALDH ^{a)} (U/mg)	Rdt (%)	GLADH ^{a)} (U/mg)	Rdt (%)	L/G ^{b)}	LALDH ^{a)} (U/mg)	Rdt (%)	GLADH ^{a)} (U/mg)	Rdt (%)	L/G
Extracte cru	0,07	100	0,12	100	0,58	0,21	100	0,35	100	0,60
Sulfat amònic	0,20	89	0,34	93	0,58	0,56	73	0,94	71	0,59
DEAE-sephadex	0,60	59	0,96	58	0,62	2,42	52	3,97	50	0,60
Agarosa-NAD	3,20	38	4,95	36	0,64	9,00	24	16,07	25	0,56
Gel-filtració	6,40	24	10,50	20	0,60	17,00	12	30,50	12	0,55
Hidroxiapatita	8,50	20	14,00	17	0,59	22,70	10	41,00	10	0,57

a) LALDH = lactaldehyd deshidrogenasa / GLADH = glicolaldehyd deshidrogenasa

b) L/G = relació entre l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa / activitat glicolaldehyd deshidrogenasa.

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.

L'enzim amb activitat glicolaldehid purificat a partir de la soca JA-102 presentava un pes molecular de 220.000 daltons, estimat per gel-filtració. Aquest valor era coincident amb el presentat a l'apartat 3.3.1.1 per a l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa de les soques 1 i 3.

Així mateix, el pes molecular de la subunitat de l'enzim de la soca JA-102 es pot estimar en 55.000 daltons, ja que la banda obtinguda al revelar amb Blau Brillant de Coomassie una electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS de 25 µg d'enzim purificat, presentava idèntica mobilitat electroforètica, i per tant igual grandària que la subunitat de l'enzim de la soca 1 i de la soca 3. (figura 13).

El punt isoelèctric de l'enzim de la soca JA-102 era també de 4,6, determinat per electroenfoc en gels de poliacrilamida al 5%, en un sistema d'amfòlits i condicions elèctriques idèntic al descrit a l'apartat 3.3.1.3.

La composició d'aminoàcids, obtinguda paral·lelament a la dels enzims de la soca 1 i de la soca 3, no mostrà diferències apreciables entre els enzims de les tres soques (taula 17).

El comportament espectrefotomètric de l'enzim de la soca JA-102 era idèntic al de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa i descrit a 3.3.1.5, pel que fa a la relació $A_{280} : A_{260}$ en funció del contingut en NAD^+ de l'enzim. D'aquest estudi es despren també, que l'enzim responsable de l'activitat glicolaldehid deshidrogenasa en la soca JA-102 és capaç d'incorporar 4 mols de NAD^+ per cada mol de proteïna enzimàtica (3.3.1.5.)

TAULA 17

COMPOSICIÓ D'AMINOÀCIDS DE L'ENZIM LACTALDEHID DESHIDROGENASA
DE DIVERSES SOQUES D'E. COLI

AMINOÀCID	mol d'aminoàcid / mol de proteïna		
	SOCA 1	SOCA 3	SOCA JA-102
Aspartic	155,7	154,9	157,5
Treonina a)	90,0	88,0	84,0
Serina a)	62,0	65,1	66,0
Glutàmic	224,0	229,0	225,0
Prolina	75,6	75,5	70,5
Glicina	172,0	176,0	160,0
Alanina	206,0	204,0	204,0
Valina b)	130,3	128,5	129,3
Metionina	7,9	8,0	15,0
Isoleucina b)	116,2	116,6	112,7
Leucina	121,2	117,2	116,0
Tirosina a)	42,0	40,2	48,0
Fenilalnina	59,6	58,4	59,0
Histidina	28,8	29,5	29,5
Lisina	84,8	82,4	80,0
Arginina	96,8	96,8	96,8

a) Dades obtingudes extrapolant a temps zero.

b) Valor màxim

La resta de dades és la mitjana dels tres valors obtinguts als diferents temps d'hidròlisi (24, 48 i 72 hores) amb HCl 6 N a 110°C.

3.6.2.7. MAPES PEPTÍDICS DELS ENZIMS PURIFICATS A PARTIR DE LES SOQUES 3 I JA-102.

Per tal d'establir possibles diferències estructurals entre l'enzim de la soca JA-102 i el de la soca 3, no evidenciades pels paràmetres estudiats fins el moment, es pensà en comparar el patró obtingut per digestió proteolítica limitada dels enzims a estudi, amb dues proteases diferents, l' α - quimotripsina i la proteasa V8 de S.aureus .

Els enzims purificats a partir de les dues soques van ésser dansilats (veure 2.7) i re-purificats per electroforesi en presència de SDS (apartat 2.8.6). Les bandes corresponents a l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa de la soca 3 i a l'enzim de la soca JA-102, van ésser tallades del gel i electroeluides en un sac de diàlisi. El contingut dels sacs fou precipitat amb acetona i resuspès de manera adient per a ésser sotmès a digestió proteolítica per a l'obtenció dels mapes peptídics monodimensionals (veure 2.9).

El patró peptídic obtingut per a ambdós enzims fou idèntic, tant per la digestió amb α - quimotripsina, com per la proteasa V8 de S.aureus (figura 41), tot indicant una similitud estructural entre aquests enzims.

3.6.2.8. IDENTITAT IMMUNOLÒGICA.

La identitat immunològica entre l'enzim amb activitat glicolaldehyd deshidrogenasa de la soca JA-102 i la lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli es posà de manifest mitjançant la

FIGURA 41. MAPES PEPTÍDICS DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA DE LA SOCA 3 I DE L'ENZIM AMB ACTIVITAT GLICOLALDEHID DESHIDROGENASA DE LA SOCA JA-102.

Els enzims purificats, tractats amb clorur de dansil, van ésser re-purificats electroforeticament en presència de SDS i electroeluints, a d'obtenir el seu patró peptídic per digestió proteolítica limitada. Els pèptids resultants van ésser separats per electroforesi en gradients lineals de poliacrilamida (15-20%).

Cadascuna de les mostres analitzades contenia 25 µg de proteïna pura.

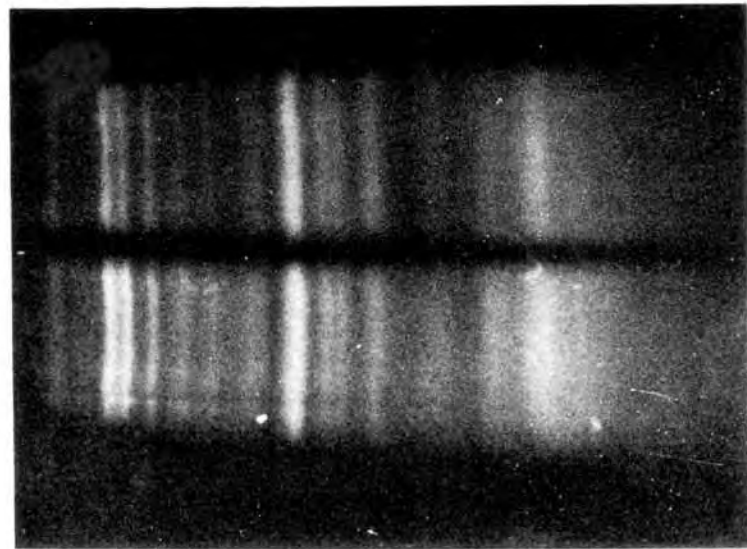
A) Digestió amb α -quimotripsina

B) Digestió amb proteasa V8 de S.aureus.

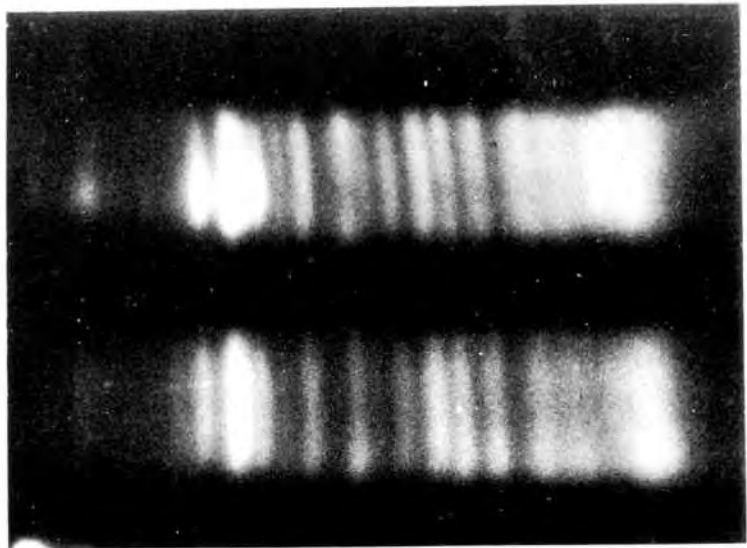
1 i 3 : pèptids obtinguts de la lactaldehyd deshidrogenasa de la soca 3.

2 i 4 : pèptids de l'enzim amb activitat glicolaldehyd deshidrogenasa de la soca JA-102

A



B



1

2

3

4

tècnica de doble difusió (veure 3.4.) emprant com a font enzimàtica, tant preparacions purificades, com extractes cel.lulars de creixements en etilenglicol (figura 25 B i C). Aquesta identitat és un criteri més de la similitud estructural de tots dos enzims.

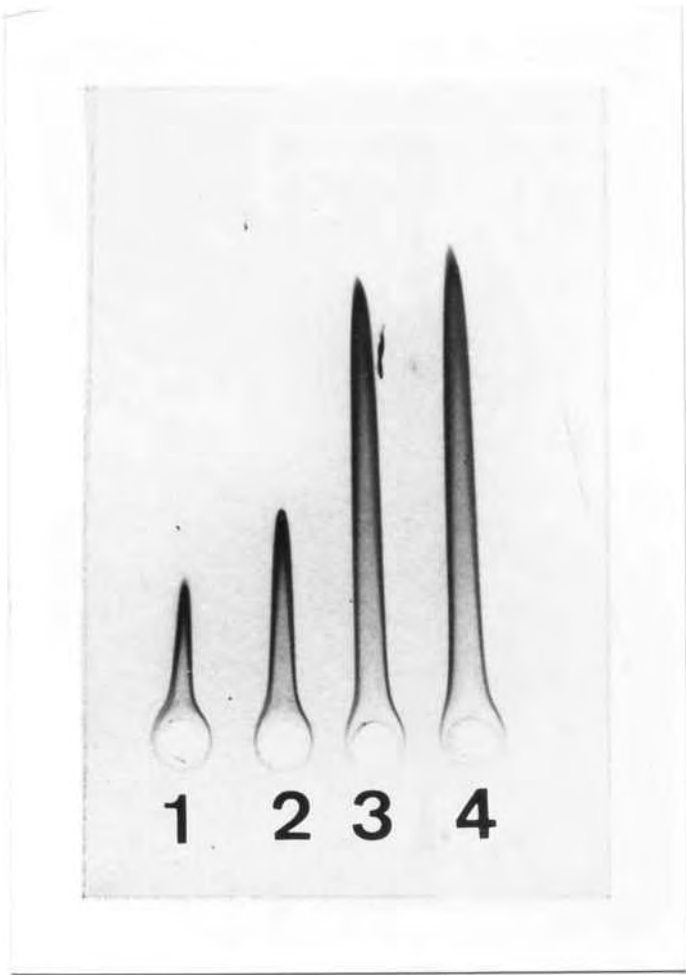
Donada aquesta identitat immunològica, les preparacions d'anticossos anti-lactaldehid deshidrogenasa van ésser utilitzades per a quantificar l'enzim present als extractes cel.lulars de la soca JA-102 feta créixer aeròbicament en glucosa, glicerol, hidrolitzat de caseïna i etilenglicol. La relació entre l'activitat específica (valors presentats a la taula 13) i l'alçada dels arcs de precipitació obtinguts en la immunoelectroforesi respectiva, donava un valor constant aproximat entre 11 i 12 (igual que la relació determinada per a la soca 1 i la soca 3).

A la figura 42 es quantifica per immunoelectroforesi l'enzim produït per les soques 3 i JA-102 en els creixements aeròbics en hidrolitzat de caseïna i el glicol que actua com a font de carboni en cada cas, 1,2-propandiol per a la soca 3, i etilenglicol per a la soca JA-102. Com es pot veure, l'increment d'unes tres vegades en els nivells d'activitat enzimàtica de la soca JA-102 es correspon amb un augment proporcional dels arcs d'immunoprecipitació, tot indicant que l'increment d'activitat enzimàtica es conseqüència d'una síntesi incrementada de lactaldehid deshidrogenasa.

FIGURA 42. QUANTIFICACIÓ PER IMMUNOELECTROFORESI DE L'ENZIM LACTALDEHID DESHIDROGENASA PRODUÏT PER LA SOCA JA-102 RESPECTE EL DE LA SOCA 3 EN MEDIS INDUCTORS.

Les plaques d'agarosa contenien 0,4% de la fracció globulines anti-lactaldehid deshidrogenasa.

- 1) 50 µg d'extracte cel.lular de la soca 3 feta créixer en hidrolitzat de caseïna
- 2) 50 µg d'extracte cel.lular de la soca 3 feta créixer en 1,2-propandiol.
- 3) 20 µg d'extracte cel.lular de la soca JA-102 feta créixer en hidrolitzat de caseïna.
- 4) 20 µg d'extracte cel.lular de la soca JA-102 feta créixer en hidrolitzat de caseïna.



1

2

3

4

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.

L'enzim amb activitat glicolaldehid deshidrogenasa de la soca JA-102 purificat va ésser sotmés a un estudi cinètic i les seves característiques comparades amb les de la lactaldehid deshidrogenasa d'E.coli.

La preparació enzimàtica purificada de la soca JA-102 mostrava també un pH òptim d'activitat de 9,5 en solució amortidora de pH glicina-NaOH (100 mM).

L'energia d'activació per a l'oxidació del glicolaldehid, determinada gràficament a partir de la representació d'Arrhenius, era de 8,4 Kcal/mol, i de 8,66 per a l'oxidació del lactaldehid. Aquests valors indicaven que no hi havia diferències amb la lactaldehid deshidrogenasa de la soca 3 (veure 3.3.2.2), al menys pel que fa a aquest paràmetre.

Un altre criteri d'identitat entre aquests enzims fou aportat per l'estudi del seu comportament en front d'un tractament tèrmic. Així, l'enzim purificat de la soca JA-102 mostrava el mateix perfil d'inactivació a 55°C que l'enzim de la soca 3 o que el de la soca tipus salvatge. Per a què l'estudi fós comparable, la concentració de proteïna de la preparació enzimàtica de la soca JA-102 va ésser també ajustada a 0,4 mg/ml (veure 3.3.2.3). En aquestes condicions, als 5 minuts d'incubació a 55°C, l'activitat enzimàtica era només d'un 50% de l'activitat inicial.

L'enzim purificat a partir de la soca JA-102, a l'igual que la lactaldehyd deshidrogenasa present a E.coli tipus salvatge i a la soca 3, és capaç d'oxidar irreversiblement diversos aldehids, tots ells amb la característica comuna d'ésser α -hidroxialdehids. S'han provat com a substrats de la reacció catalitzada per l'enzim de la soca JA-102, el glicolaldehid, el L-gliceraldehyd i el L-lactaldehyd, pels qui s'ha determinat les seves constants cinètiques, K_m i V_{max} (taula 18). L'enzim era també inactiu sobre acetaldehyd i propionaldehyd.

Els valors de K_m presentats a la taula 18 són del mateix ordre que els descrits pels enzims de la soca 1 i de la soca 3, tot indicant que l'enzim de la soca JA-102 no es pot considerar un isoenzim cinèticament diferent de la lactaldehyd deshidrogenasa d' E.coli.

TAULA 18

CONSTANTS CINÈTIQUES PER A L'ENZIM PURIFICAT DE LA SOCA JA-102

	Km (M)	Vmax (U/mg)	r
Glicolaldehid	$3,35 \cdot 10^{-4}$	19,6	0,996
L-gliceraldehid	$1,30 \cdot 10^{-4}$	11,1	0,986
L-lactaldehid	$2,20 \cdot 10^{-5}$	-	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:

Glicolaldehid (0,05-1 mM)

L-gliceraldehid (0,025-0,5 mM)

L-lactaldehid (0,015-0,1 mM)

3.7. EVIDÈNCIES GENÈTIQUES DE LA IDENTITAT DE L'ACTIVITAT ALDEHID DESHIDROGENASA INDUÏDA PEL METABOLIME DEL GLUTAMAT I LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

S'ha indicat anteriorment que els elevats nivells d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa trobats en els extractes cel.lulars de la soca 1 feta créixer aeròbicament en hidrolitzat de caseïna eren conseqüència del metabolisme del glutamat (apartat 3.1).

Els estudis d'inducció per aminoàcids es realitzaren en la soca 1 i els resultats obtinguts, en quant a la relació entre l'activitat específica lactaldehyd deshidrogenasa i l'alçada de l'arc de precipitació format en la immunoelectroforeesi, indicaven que molt probablement, l'activitat induïda pel metabolisme del glutamat era funció de la lactaldehyd deshidrogenasa, objecte d'aquest treball. La identitat immunològica dels enzims induïts pel creixement en presència de glutamat i de ramnosa s'ha descrit prèviament a l'apartat 3.5.1.2.

Per a confirmar genèticament aquesta identitat, s'analitzà la inducció per glutamat en mutants deficients de lactaldehyd deshidrogenasa, en concret de la soca 40.

Es va fer créixer la soca 40 i la seva progenitora (amb nivells normals d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa), la soca 3, aeròbicament en glicerol fins a una absorbància de 3, mesurada a 420 nm. En aquest punt, a una alíquota de cada cultiu s'addicionà glutamat 12 mM, i es deixà incubant a 37°C, en agitació, durant 5 hores, conjuntament amb els matrassos control als quals no s'afegí l'esmentat aminoàcid.

Passat aquest temps, les cèl.lules es recollien per centrifugació i s'obtenien els extractes cel.lulars corresponents, on s'assajava l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa. Els resultats es mostren a la taula 19, on s'observa que la soca 3 responia de la mateixa manera que la soca 1 a la inducció provocada pel glutamat, mentre que en els extractes cel.lulars de la soca 40 no es detectava activitat lactaldehyd deshidrogenasa després d'afegir aquest aminoàcid, tot indicant que la inducció de l'activitat enzimàtica observada en presència de glutamat afecta directament a l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa i no a una altra proteïna enzimàtica amb activitat del tipus aldehyd deshidrogenasa. Aquest resultat concordava amb l'absència d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa en els extractes cel.lulars de la soca 40 feta créixer en hidrolitzat de caseïna.

TAULA 19

ESTUDI DE LA INDUCCIÓ DE L'ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDRO-
GENASA PER GLUTAMAT EN LA SOCA 40.

Soca	Font de carboni	Addició de ^{A)}	Activitat ^{B)} enzimàtica
3	Glicerol	-	80
3	"	Glutamat	200
40	"	-	N.D
40	"	Glutamat	N.D.

A) L'addició de glutamat es feia quan el cultiu en glicerol havia arribat a una absorbància de 3.

B) Expressada com a mU/mg

N.D = no detectable.

3.8. ALTRES ACTIVITATS ALDEHID DESHIDROGENASA EN E.COLI : COMPARACIÓ AMB LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

Donat que a la bibliografia hi ha reportats diversos enzims d'E.coli amb activitat aldehid deshidrogenasa, es va creure d'interès fer un estudi comparatiu d'alguns aspectes descrits per a aquests enzims i les característiques obtingudes per a la lactaldehid deshidrogenasa presentada en aquest treball, per tal d'establir possibles identitats o diferències entre ells.

3.8.1. ALDEHID DESHIDROGENASA L·LIGADA A COENZIM A.

Les primeres proves realitzades per a la comparació de l'activitat lactaldehid deshidrogenasa amb aquest enzim foren la mesura de l'activitat aldehid deshidrogenasa lligada a CoA tal com descriuen Rudolph i col (137), tant en extractes cel·lulars de la soca 1 com en preparacions de lactaldehid deshidrogenasa purificades. (apartat 2.4.2.2).

En les nostres condicions d'obtenció d'extractes cel·lulars i en solució amortidora de pH de fosfat sòdic 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3 no es detectava activitat aldehid deshidrogenasa lligada a CoA en els extractes cel·lulars de la soca 1 feta créixer en hidrolitzat de caseïna. Per tant, es preparà un extracte cel·lular de la soca 1 emprant el medi de cultiu i tampons descrits per aquests autors (137). Els creixements cel·lulars es feien en glucosa al 0,4% + peptona 0,1%, i la solució amortidora de pH utilit-

zada era fosfat potàssic 10 mM, pH 8,1.

En aquestes condicions es detectà una activitat aldehid deshidrogenasa lligada a CoA de l'ordre de 167 mU/mg. L'activitat lactaldehid deshidrogenasa del mateix extracte era de 21 mU/mg.

L'enzim lactaldehid deshidrogenasa purificat tal com es descriu a 2.5 no presentava activitat lligada a CoA sobre acetaldehid.

3.8.2. GLICERALDEHID-FOSFAT-DESHIDROGENASA.

Donat que la preparació enzimàtica de lactaldehid deshidrogenasa purificada i caracteritzada en aquest treball presentava activitat sobre gliceraldehid, es va creure interessant comparar els nostres resultats amb dades existents a la literatura sobre la gliceraldehid-fosfat-deshidrogenasa, enzim que participa en la glicòlisi.

Tal com es comentarà a l'apartat 4.4, les característiques estructurals d'aquest enzim glicolític són diferents a les presentades per la lactaldehid deshidrogenasa.

A més, es tenen evidències genètiques que rebutjen la identitat de tots dos enzims. Així, està descrit que els mutants d'E.coli deficients en l'activitat gliceraldehid-3-fosfat-deshidrogenasa no són capaços de créixer en medis com glucosa, glicerol o succinat (75,76). Tanmateix, els mutants d'E.coli carents d'activitat lactaldehid deshidrogenasa, com és el cas de la soca 40, poden suportar creixement en aquests medis, tot indicant que la lactaldehid deshidrogenasa no és un enzim glicolític.

3.8.3. GLICOALDEHID DESHIDROGENASA D' E. COLI B INVOLUCRADA EN LA BIOSÍNTESI DE LA VITAMINA B₆.

L'estudi de la participació del glicolaldehid en la biosíntesi de la vitamina B₆ ha estat portat a terme per diversos grups d'investigació des de diferents punts de vista (77, 112, 144, 147, 171). En aquest context es reportà una activitat glicolaldehid deshidrogenasa que era assajada en presència de NADP⁺ i glutatión en el sentit d'oxidació del glicolaldehid a glicolat. L'enzim catalitza una reacció reversible, de manera que és capaç de reduir el glicolat a glicolaldehid en presència de NADPH₂ (147).

La lactaldehid deshidrogenasa objecte d'aquest treball, catalitza una reacció irreversible (veure 3.3.2.6). Malgrat aquesta característica diferencial, i donat que l'enzim purificat presenta activitat sobre glicolaldehid a la vegada que pot usar NADP⁺ com a cofactor, es va creure d'interès analitzar la possible relació entre la lactaldehid deshidrogenasa i algun dels tres isoenzims de la glicolaldehid deshidrogenasa descrits en E. coli B per Morita i col, diferenciables en quant a característiques, equilibri de reacció i localització subcel.lular (112).

Així, una preparació purificada de lactaldehid deshidrogenasa va ésser assajada per activitat glicolaldehid deshidrogenasa segons que descriuen Shimizu i Dempsey (144). La mescla d'assaig consistia en solució amortidora de pH de fosfat potàssic 20 mM pH 7,0, glicolaldehid 3,57 mM, NADP⁺ 0,3 mM, glutatión 0,36 mM i cianur potàssic 29 mM. La reacció era inicia-

da per l'addició de la font enzimàtica. Es mesurava l'increment d'absorbància a 340 nm degut a la formació de NADPH_2 a 37°C. Paral·lelament, en aquesta mateixa preparació enzimàtica s'assaja l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa lligada a NAD^+ (emprant glicolaldehid 1 mM com a substrat) i l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa lligada a NADP^+ (16). En aquest últim cas, l'assaig es feia en presència de solució amortidora glicina-NaOH 100 mM pH 9,5, glicolaldehid 1,5 mM, NADP^+ 1 mM i clorur potàssic 100 mM.

Els resultats expressats en U/ml foren :

	Activitat LALDH (NAD^+)	Activitat LALDH (NADP^+)	Activitat GLADH (144)
25°C	1,75	0,28	-
37°C	2,00	-	0,12

Els resultats indiquen que la preparació purificada de lactaldehyd deshidrogenasa presenta un nivell d'activitat glicolaldehid deshidrogenasa segons que descriuen Shimizu i Dempsey molt baix, i aproximadament del mateix ordre que l'activitat obtinguda en presència de NADP^+ emprant l'assaig descrit per a la lactaldehyd deshidrogenasa. Aquests valors són aproximadament, entre 10 i 20 vegades inferiors als obtinguts en presència de NAD^+ com a cofactor.

3.9. ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDROGENASA EN ALTRES ENTERO- BACTERIACEAE : KLEBSIELLA PNEUMONIAE I SALMONELLA TYPHIMURIUM .

Donat que Klebsiella pneumoniae i Salmonella typhimurium són capaces de matabolitzar aeròbicament L-fucosa i L-ramnosa, mitjançant sistemes similars als descrits en E.coli, on una aldolasa específica trenca la molècula de fuculosa-1-fosfat o la de ramnulosa-1-fosfat en L-lactaldehid i fosfat de dihidroxiacetona, semblà interessant l'estudi de la presència d'un enzim amb activitat lactaldehid deshidrogenasa, tot comparant-lo amb l'enzim d'E.coli.

3.9.1. ESTUDI EN KLEBSIELLA PNEUMONIAE ATCC Nº 13882 .

K.pneumoniae creix aeròbicament en ramnosa amb un temps de duplicació aproximat de 140 minuts (131). Els extractes crus d'aquesta soca feta créixer en aquestes condicions van ésser estudiats en quant a la presència d'una activitat lactaldehid deshidrogenasa i característiques immunològiques de l'enzim responsable d'aquesta activitat enzimàtica.

3.9.1.1. ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDROGENASA EN EL CREIXE- MENT AERÒBIC EN RAMNOSA.

Es va assajar l'activitat lactaldehid deshidrogenasa segons es descriu a l'apartat 2.4.2.1, en els extractes cel·lulars de K.pneumoniae feta créixer aeròbicament en ramnosa.

L'activitat trobada era molt més baixa que l'obtinguda en E.coli en les mateixes condicions d'assaig, probablement per què aquestes condicions no eren les més adients per a l'enzim de K.pneumoniae

Després de provar diverses concentracions de substrat (glicolaldehid i lactaldehid) i de cofactor (NAD^+ i NADP^+), les condicions òptimes d'assaig es van establir de la següent manera : solució amortidora glicina-NaOH 100 mM pH 9,5 glicolaldehid 2 mM / lactaldehid 0,25 mM, NAD^+ 1,25 mM.

En aquestes condicions l'activitat trobada pel creixement en ramnosa era de 90 mU/mg en front de 320 mU/mg en E.coli.

3.9.1.2. ESTUDI DE LA IDENTITAT IMMUNOLÒGICA DE L'ENZIM DE K.PNEUMONIAE AMB L'ENZIM D'E.COLI

La semblança estructural entre l'enzim de K.pneumoniae i E.coli s'aborda enfrontant extractes cel.lulars d'ambdues soques fetes créixer aeròbicament en ramnosa, a anticossos anti-lactaldehid deshidrogenasa d'E.coli en plaques de doble difusió. A la figura 43-A poden observarse les línies de precipitació obtingudes quan 10 μl de la fracció de γ -globulines (40 mg/ml) col.locades en el pouet central reaccionen amb la lactaldehid deshidrogenasa present en els extractes cel.lulars. Els esperons que apareixen indiquen clarament una identitat immunològica parcial, això és, ambdues proteïnes comparteixen alguns determinants antigènics que són reconeguts en l'enzim de K.pneumoniae pels anticossos

anti-lactaldehid deshidrogenasa d'E.coli.

L'electroimmunodifusió segons Laurell de quantitats creixents d'extracte cel.lular de K.pneumoniae feta créixer aeròbicament en ramnosa, presentava la formació d'un arc de precipitació proporcional a la quantitat d'extracte aplicat als pouets. Donat que la identitat immunològica entre l'enzim de les dues soques és, només, parcial, l'alçada de l'arc de precipitació format per la lactaldehid deshidrogenasa present en els extractes crus de K.pneumoniae no es pot prendre com a una mesura comparable amb la quantificació de l'enzim d' E.coli, doncs l'antígen heteròleg dona un arc de precipitació més alt que el corresponent a la mateixa quantitat d'antígen homòleg (enzim d' E.coli), i també més feble (figura 43-B)

L'evidència de que la reacció immunològica observada en la immunodifusió radial i en l'electroimmunodifusió segons Laurell era deguda al reconeixement de l'enzim amb activitat lactaldehid deshidrogenasa present en els extractes de K.pneumoniae pels anticossos anti-lactaldehid deshidrogenasa d' E.coli, s'obtingué per una immunotitulació en medi líquid (apartat 2.6.4).

Alfquotes d'un extracte cel.lular de K.pneumoniae, amb una activitat lactaldehid deshidrogenasa de 90 mU/mg, s'incubaren amb quantitats creixents de la fracció γ -globulines anti-lactaldehid deshidrogenasa d'E.coli durant 30 minuts a 30°C. Després de centrifugar les barrejades, es va mesurar l'activitat enzimàtica en els sobrenadants. Paral·lelament, es va fer un experiment control, incubant els extractes amb globulines d'animals no immunitzats.

FIGURA 43. IDENTITAT IMMUNOLÒGICA PARCIAL ENTRE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA DE K.PNEUMONIAE I LA D'E.COLI.

A) IMMUNODIFUSIÓ RADIAL:

El pouet central contenia 10 μ l de la fracció γ -globulines anti-lactaldehid deshidrogenasa d'E.coli (40 mg/ml).

1 a 4 : diferents quantitats d'extracte cel.lular de K.pneumoniae feta créixer aeròbicament en ramnosa. Per ordre 88 μ g, 132 μ g, 176 μ g i 220 μ g de proteïna.

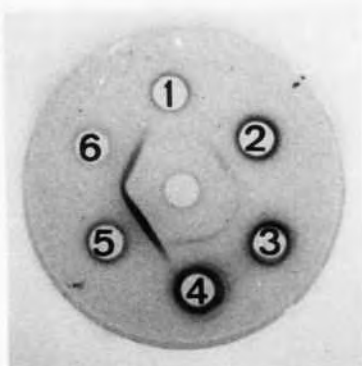
5 i 6 : extracte cel.lular d'E.coli (soca 1) feta créixer aeròbicament en ramnosa : 200 μ g i 100 μ g repectivament.

B) ELECTROIMMUNODIFUSIÓ SEGONS LAURELL DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA PRESENT EN ELS EXTRACTES DE K.PNEUMONIAE COMPARATIVAMENT AMB E.COLI

1 a 5 : 10 μ l d'extracte cel.lular de K.pneumoniae feta créixer aeròbicament en ramnosa, contenint per ordre 16, 32, 48, 64 i 80 μ g de proteïna total.

6 : 50 μ g d'extracte cel.lular d'E.coli (soca 1) feta créixer aeròbicament en ramnosa.

A



B

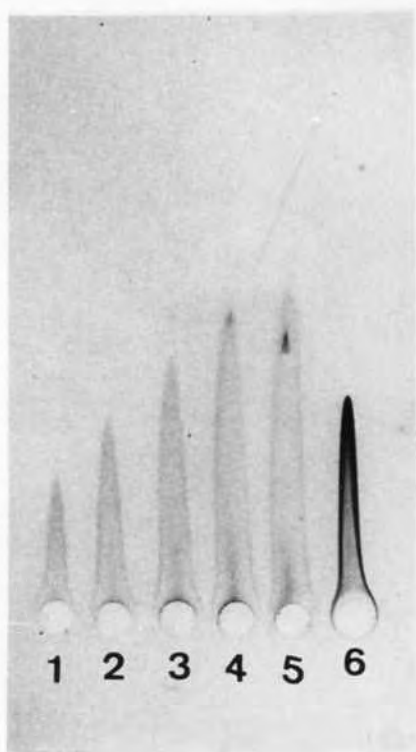
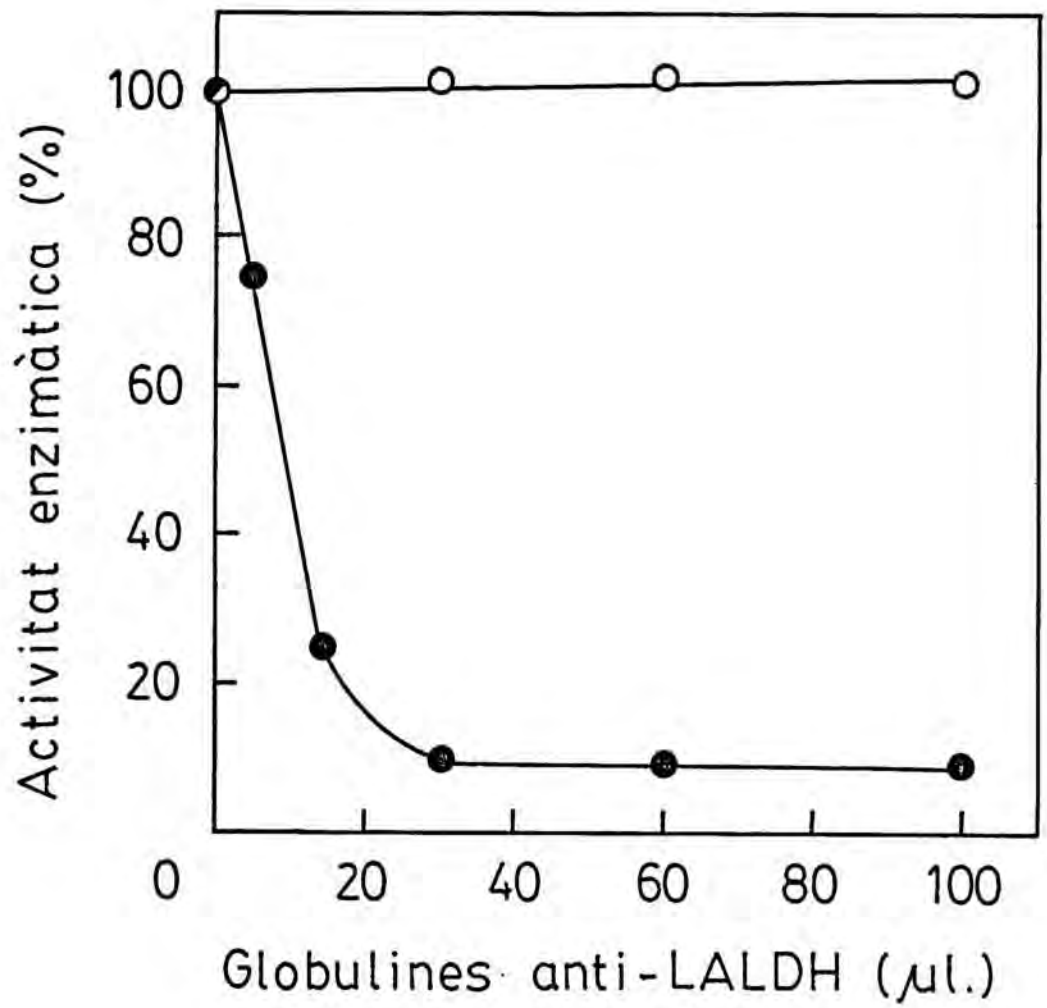


FIGURA 44. IMMUNOPRECIPITACIÓ DE L'ENZIM LACTALDEHID DES-
HIDROGENASA DE K.PNEUMONIAE PELS ANTICOSSOS
ANTI-LACTALDEHID DESHIDROGENASA D'E.COLI.

Es van incubar alíquotes de 150 μ l d'extrac-
te cel.lular de K.pneumoniae crescuda aeròbica-
ment en ramnosa (90 mU/mg) amb quantitats crei-
xents de la fracció de globulines anti-lactal-
dehid deshidrogenasa d'E.coli (●-●) o de sèrum
d'animals no immunizats (o-o), a 30°C durant 30
minuts. Després de centrifugar les barrejes, es
determinà l'activitat lactaldehid deshidrogenasa
segons 3.8.1.1 en els sobrenadants.
L'activitat enzimàtica s'expressa com a percentat-
ge respecte l'activitat inicial.



A la figura 44 es mostra com la preparació d'anticossos anti-lactaldehid deshidrogenasa d'E.coli és capaç d'inactivar a l'enzim present als extractes de K.pneumoniae i com a partir d'una determinada concentració, l'activitat lactaldehid deshidrogenasa bloquejada pels anticossos era superior al 90%.

L'activitat enzimàtica es mantenia totalment en el sobrenadant en les incubacions amb sèrum no immune.

3.9.2. ESTUDI EN SALMONELLA TYPHIMURIUM ATCC N^o e23564.

S.typhimurium creix aeròbicament en ramnosa amb un temps de duplicació aproximat de 85 minuts (131) i amb un rendiment final de la biomassa del cultiu que és la meitat de l'obtingut per E.coli creixent en les mateixes condicions. Així, quan E.coli tipus salvatge creix aeròbicament en ramnosa, la densitat òptica al final del cultiu és de 4, mesurada a 420 nm. Tanmateix, S.typhimurium en idèntiques condicions de creixement arriba, només, a una absorbància de 2 a la mateixa longitud d'ona.

3.9.2.1. ABSENCIA D'ENZIM AMB ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDROGENASA A S.TYPHIMURIUM.

En els extractes cel·lulars de S.typhimurium feta créixer en ramnosa en condicions aeròbiques, s'assajà l'activitat lactaldehid deshidrogenasa segons es descriu a 2.4.2.1. Donat que no es detectà gens d'activitat, es va intentar trobar les condicions òptimes per a l'assaig de l'enzim de S.typhimurium.

Malgrat haver provat diferents concentracions de substrat, tipus de solucions amortidores, pHs i tipus i concentracions de cofactors, el resultat fou sempre el mateix, no es detectava activitat lactaldehyd deshidrogenasa (ni sobre lactaldehyd, ni sobre glicolaldehyd) en els extractes cel.lulars de S.typhimurium.

L'absència d'enzim amb aquesta activitat enzimàtica en els extractes d'aquest microorganisme es confirmà, també, immunològicament, emprant preparacions d'anticossos anti-lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli. No es detectà cap tipus de reacció immunològica, ni en plaques de doble difusió, ni en immunoelectroforesi, malgrat haver provat diferents concentracions i relacions antígen-anticòs. Es podia concloure que no hi havia cap enzim, en els extractes cel.lulars de S.typhimurium, que fós reconegut, ni tant sols parcialment, pels anticossos anti-lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli.

Aquests resultats concordaven amb el rendiment meitat ($A_{420} = 2$) d'un cultiu de S.typhimurium quan creix aeròbicament en ramnosa. El lactaldehyd format per acció de l'aldolasa, no podia ésser metabolitzat a través de la seva oxidació a lactat, per tant, el cultiu creixia, només, mercès al fosfat de dihidroxiacetona, aprofitant així, tan sols, la meitat dels àtoms de carboni de la molècula original, la ramnosa.

4. DISCUSSIÓ

4.1. ANÀLISI ESTRUCTURAL I FUNCIONAL DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

Un dels aspectes bàsics per a la realització del present treball era disposar d'una preparació enzimàtica purificada a homogeneïtat, que fós útil en els estudis de caracterització cinètica i molecular, així com en els estudis comparatius entre els enzims lactaldehyd deshidrogenasa produïts per diverses soques d'E.coli en diferents estadis d'evolució experimental. També era necessària per a l'obtenció d'anticossos anti-lactaldehyd deshidrogenasa específics.

En aquest sentit, una part del treball va anar encaminada a millorar el mètode de purificació de la lactaldehyd deshidrogenasa posat a punt amb anterioritat, en el nostre laboratori (20), el qual rendia preparacions no del tot homogènies, atès que les electroforesis en gels de poliacrilamida en presència de SDS donaven, per tinció amb Blau Brillant de Coomassie, dues bandes proteïques (veure 3.2.).

Es va pensar en la possibilitat de que la banda minoritària fós un producte de proteòlisi de l'enzim natiu, hipòtesi que no sembla massa probable, donat que no és eliminada en processos de purificació realitzats en presència de diferents inhibidors de proteases, com són la leupeptina, banzamidina i PMSF.

En relació amb aquesta preparació enzimàtica, cal esmentar que si bé no era homogènia, molt probablement, la proteïna contaminant no interferiria en la majoria dels estudis cinètics realitzats amb la lactaldehyd deshidrogenasa, ja que quan a-

questa preparació era sotmesa a electroforesi en gels de poli-acrilamida en condicions no desnaturalitzants i revelada per activitat, només apareixia una banda. Però per a la caracterització molecular, sobretot en la determinació de la composició d'aminoàcids, així com per a l'obtenció d'anticossos anti-lactaldehid deshidrogenasa, es requeria una preparació enzimàtica d'un elevat grau de puresa.

Així, anteriors intents d'obtenció d'anticossos específics, emprant la mostra de lactaldehid deshidrogenasa purificada fins a la gel-filtració (veure 2.5) van resultar negatius. S'obtenien preparacions d'anticossos que reconeixien a més d'una proteïna d'E.coli i per tant, no eren útils com a eines de treball en els estudis de síntesi i regulació de l'enzim en diverses soques mutants.

Amb la finalitat d'aconseguir una preparació enzimàtica homogènia, es van provar diverses tècniques com a últim pas del procés de purificació, basades en diferents propietats (veure 3.2). La precipitació per afinitat amb Bis-NAD, usada amb èxit per a diferents deshidrogenases oligomèriques (53,99) no va rendir el resultat esperat : no s'aconseguí precipitar la lactaldehid deshidrogenasa en cap de les condicions provades. Aquest fet, descrit també per l'alcohol deshidrogenasa hepàtica, és degut probablement a que la majoria de complexes d'afinitat es formen, només, amb dues molècules d'enzim. La formació d'aquests complexes està relacionada amb al topografia de l'enzim i els centres pel NAD^+ (53). L'isoelectroenfoc preparatiu en gels de sephadex tampoc fou útil en la separació d'ambdues proteïnes.

L'homogeneïtat de la preparació enzimàtica s'aconsegüí mitjançant una cromatografia en hidroxiapatita (veure 3.2). La separació entre la proteïna contaminant i la lactaldehid deshidrogenasa va ésser conseqüència de l'elució diferencial d'aquesta columna. Així, mentre la lactaldehid deshidrogenasa eluia a una concentració de fosfat entre 30 i 40 mM, l'altre proteïna ho feia a concentracions superiors a 50-60 mM. L'elució de les proteïnes retingudes per una matriu d'hidroxiapatita amb el mateix eluent depèn bàsicament de l'estructura i del punt isoelèctric, o nombre de grups positius i negatius de la seva molècula (60,61,62).

Donat que s'assolia el mateix grau de puresa quan aquesta cromatografia s'acoblava com a últim pas darrera la cromatografia de gel-filtració, com si s'usava després de la cromatografia d'afinitat en agarosa-NAD , s'escollí aquesta segona opció, eliminant així, un pas per columna, que era relativament llarg i comportava una gran dilució de la preparació enzimàtica.

El factor de purificació, emprant aquest nou mètode, és de 120 vegades i el rendiment aproximat d'un 17%.

Cal esmentar, que aquest mètode de purificació ha estat usat per a purificar l'enzim lactaldehid deshidrogenasa de diverses soques d'E.coli, a partir de creixements aeròbics en hidrolitzat de caseïna. S'ha escollit aquest medi de cultiu per varies raons : a) E.coli presenta un temps de generació molt curt, b) els nivells d'activitat lactaldehid deshidrogenasa són alts, i c) és asequible economicament (és més barat que els altres medis inductors com són fucosa i ramnosa).

Les preparacions enzimàtiques purificades segons el nou mètode són homogènies des de diferents punts de vista, tal com es descriu a l'apartat 3.2.1. No es detecten proteïnes contaminants al tenyir amb Blau Brillant de Coomassie o nitrat de plata, l'electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS corresponent a 25 µg i 1 µg d'enzim purificat respectivament (figura 10). El mateix resultat s'obtenia per isoelectroenfoc analític. El revelat per activitat enzimàtica, tant d'electroforesi en condicions no desnaturalitzants (70 µg), com de l'enfoc analític (15 µg) donava una única banda, descartant la presència de proteïnes contaminants amb activitat creuada envers el lactaldehyd o el glicolaldehyd.

La puresa d'aquestes preparacions semblava, per tant, acceptable per tal de dur a terme la caracterització de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa.

L'únic problema que quedava per resoldre era l'emmagatzematge de l'enzim purificat amb activitat suficient per a poder caracteritzar-lo cinèticament. Ja s'ha esmentat a l'apartat 3.2.2 que la preparació purificada fins a la gel-filtració perdia el 90% de la seva activitat en 48 hores congelada a -40°C. Aquest aspecte d'instabilitat enzimàtica, freqüent en els enzims del tipus aldehyd deshidrogenasa, es solventà per l'addició, a la preparació purificada, de glicerol 20% i DTT 1mM , i guardant-la en petites alíquotes a -20°C (67,79)

La preparació enzimàtica de lactaldehyd deshidrogenasa purificada a homogeneïtat, a partir de la soca 3, fou emprada com a antígen en l'obtenció dels anticossos específics.

S'escollí l'enzim de la soca 3, ja que l'adquisició de la capacitat d'utilitzar 1,2-propandiol com a única font de carboni i energia no comportava cap canvi en els nivells i tipus d'inducció de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa (32). La mutació que portà a la soca 3 a créixer en 1,2-propandiol no havia afectat la lactaldehyd deshidrogenasa de la soca salvatge. I endemés, l'obtenció de la soca JA-102 (mutant etilenglicol positiu) es va fer a partir del mutant propandiol positiu corresponent, un derivat glicolat positiu de la soca 3.

Donat que la soca 3 era el pas intermedi en l'evolució experimental d'utilització de glicols per E.coli, es va creure convenient usar l'enzim d'aquesta soca com a material de partida per a l'obtenció dels anticossos anti-lactaldehyd deshidrogenasa, que ens permetrien quantificar l'enzim produït per les diferents soques d'E.coli en diverses condicions de creixement.

Per a l'obtenció d'anticossos específics es seguí la pauta detallada a 2.6.1, consistent en tres administracions espaiades, de petites quantitats d'antígen (de l'ordre de micrograms). L'antisèrum obtingut donava en plaques d'Ouchterlony, una reacció d'immunoprecipitació molt marcada i ràpida (24 hores) quan s'enfrentava a l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa purificat que havia estat usat com a antígen en la inoculació a conills.

La preparació d'anticossos que s'ha utilitzat en diferents aspectes d'aquest treball, era la fracció γ -globulines, purificada per precipitació amb sulfat amònic a partir de l'antisèrum específic (veure 2.6.2).

Aquesta preparació resultà molt adient com a eina de treball en els estudis de producció i quantificació de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa sintetitzat en diferents soques d'E.coli, fetes créixer en diversos medis i condicions de cultiu , per determinades raons : 1) Era molt específica, atès que en les tècniques de doble difusió i immunoelectroforesi segons Laurell, apareixia només un arc de precipitació (que en tots dos cassos, era visible sense necessitat de tinció) quan s'analitzaven extractes cel.lulars d'E.coli, tot indicant l'absència de reaccions creuades amb altres proteïnes presents; 2) Reconeixia per igual a l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa produït per soques d'E.coli en diferents estadis d'evolució : la soca tipus salvatge o soca 1, la soca capaç de créixer en 1,2-propandiol o soca 3 i el mutant etilenglicol positiu, la soca JA-102 (figures 25 A i B), i 3) La proporcionalitat entre la quantitat d'antígen sembrat i l'alçada del corresponent arc de precipitació en la immunoelectroforesi (figura 26) permet utilitzar aquesta tècnica per a quantificar els nivells de lactaldehyd deshidrogenasa presents en els extractes cel.lulars d'E.coli.

Aquestes preparacions d'anticossos han estat molt útils en els estudis de regulació realitzats sobre l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa. Així, en els estudis d'inducció en diferents fonts de carboni i disponibilitat d'oxigen ens han permetes identificar que el mecanisme bàsic de regulació es a nivell transcripcional, en funció de la presència d'inductor i d'oxigen.

En els estudis de regulació "in vivo", han permès descartar la possibilitat d'una modulació de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa a través d'un recanvi ràpid de l'enzim, donada l'elevada estabilitat envers la degradació d'aquesta proteïna enzimàtica.

Les preparacions d'anticossos també han estat útils en l'estudi de mutants deficients en lactaldehyd deshidrogenasa, fins i tot, han permès identificar, en determinats casos, si la mutació produïda era del tipus regulatori o estructural.

La caracterització, tant cinètica com molecular de la lactaldehyd deshidrogenasa que es presenta en aquest treball, ha estat portada a terme amb preparacions purificades a homogeneïtat, a partir d'extractes cel·lulars de les soques 1 i 3. Els enzims produïts per ambdues soques són indistingibles en quant els paràmetres cinètics i moleculars analitzats. És per aquest motiu, que a vegades, en el text corresponent a la purificació i caracterització d'aquest enzim, es fa referència a la lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli, sense especificar a quina soca pertany; llevat del cas de la soca JA-102, que ha estat objecte d'un estudi més detallat, donat que la selecció pel caracter etilenglicol positiu comportava un increment en els nivells d'una activitat glicolaldehyd deshidrogenasa (veure 3.6).

A partir dels resultats obtinguts, es pot deduir que la lactaldehyd deshidrogenasa és una proteïna oligomèrica, amb un pes molecular aproximat de 220.000 daltons (estimat per gel-filtració), composta per quatre subunitats aparentment

idèntiques, per les quals s'ha determinat un pes molecular de 55.000 daltons (calculat per electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS (figures 11 i 12). Si bé entre les aldehyd deshidrogenases descrites, hi ha una gran diversitat de pesos moleculars i estructures oligomèriques, determinats enzims que pertanyen a aquest grup presenten també un pes molecular aproximat de 200.000 a 220.000 daltons, i una estructura tetramèrica formada per subunitats de 55.000 daltons. És el cas de l'aldehyd deshidrogenasa de fetge de cavall (47), els isoenzims de l'aldehyd deshidrogenasa de Pseudomonas aeruginosa (67), l'enzim de llevat (152) i certs isoenzims d'aldehyd deshidrogenasa de fetge humà (79).

De l'anàlisi de la composició d'aminoàcids es despren que l'enzim presenta un baix contingut en els aminoàcids que contenen sofre (cisteïna i metionina), així com en triptòfan. La presència de pocs residus de cisteïna i triptòfan es comú a la majoria d'aldehyd deshidrogenases descrites, la de llevat (152), la de fetge humà (54,79), la de fetge de cavall (47), així com la gliceraldehyd-3-fosfat deshidrogenasa d'E.coli (36).

Malgrat tot, el contingut en cisteïna presentat en aquest treball per a la lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli és molt baix (de l'ordre de 6 mols de cisteïna per mol de proteïna enzimàtica). Els valors de cisteïna i triptòfan de la lactaldehyd deshidrogenasa haurien d'ésser considerats orientatius, donat que són els aminoàcids que més dificultats presenten a l'hora de realitzar determinacions quantitatives i a la vegada són els menys freqüents dins el grup d'enzims aldehyd deshidrogenases. Hi ha mètodes espectrofotomètrics per a la

determinació de cisteïna i triptòfan (10,48,63), però donada la gran quantitat de mostra que requerien alguns d'ells, no han estat utilitzats per a lactaldehyd deshidrogenasa. Encara que no ha estat possible la determinació de tots dos aminoàcids mitjançant mètodes que, prèviament a la hidròlisi, transformen a la proteïna per oxidació amb performic, o bé per carboximetilació, i que sembla són els més usats per a la quantificació d'ambdós aminoàcids, aquesta és una fita proposada a realitzar en un futur. Així, i amb l'orientació del Servei d'Anàlisi de la Universitat de Barcelona, s'escollí la hidròlisi amb triptamina i àcid p-toluensulfònic durant 24 hores a 110°C com a tractament idòni de la preparació enzimàtica per a l'estimació del contingut en cisteïna i triptòfan.

Un valor semblant al de metionina, de l'ordre de 8 mols / mol proteïna, està descrit també pels isoenzims d'aldehyd deshidrogenasa hepàtica, tant d'home com de cavall.

Els valors presentats com a glutàmic i aspàrtic inclouen els de glutamina i asparragina, respectivament.

Cal remarcar que la lactaldehyd deshidrogenasa és rica en els aminoàcids alanina, valina isoleucina i glicina, que a la vegada, són els més freqüents dins l'estructura de les aldehyd deshidrogenases.

L'enzim purificat presenta un espectre d'absorció ultravioleta típic de proteïnes, amb un únic pic a 278 nm. La relació 280/260 de 1,54 indica la presència de petites quantitats de NAD^+ lligat a l'enzim, que s'eliminen per tractament de la preparació enzimàtica amb una resina de carbó activat, tipus

NORIT A, presentant aleshores una relació 280/260 de l'ordre de 1,82. Quan l'enzim incorpora NAD^+ a la seva molècula, l'espectre d'absorció mostra una àmplia banda, aproximadament a 360 nm, la relació 280/260 baixa a 1,11 i el pic màxim d'absorció és de 272 nm (figura 15).

Si bé no s'ha mesurat les constants d'unió de la proteïna enzimàtica amb el NAD^+ , ni s'ha fet un estudi fluorimètric complet sobre el contingut en NAD^+ de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa purificat, per la mesura de l'increment d'absorbència a 360 nm de la preparació enzimàtica, després de l'addició de quantitats creixents de NAD^+ , sembla que aquest enzim és capaç d'incorporar 4 mols de NAD^+ per molècula protèica (figura 16).

Un aspecte fonamental que calia resoldre prèviament a la caracterització cinètica de la lactaldehyd deshidrogenasa era el de la síntesi de l'isòmer L- del lactaldehyd, car no era possible obtenir-lo a partir de cap firma comercial. Els mètodes escollits per a la síntesi i purificació d'aquest substrat han donat un resultat molt satisfactori, ja que el reactiu obtingut finalment, ha resultat ésser d'un grau de puresa altament acceptable segons es pot deduir dels resultats corresponents a la caracterització cinètica, no detectant-se en cap cas, la presència d'impureses que actuessin inhibint l'enzim.

Com es despren dels resultats presentats a l'apartat 3.3. 2.7, la lactaldehyd deshidrogenasa es capaç d'actuar sobre diversos aldehids, estructuralment relacionats, amb la carac-

terística comuna d'ésser α -hidroxiladehids. També presenta activitat, encara que amb menys afinitat, sobre els α -cetoaldehids (figura 23). Sembla que la presència d'un grup hidroxil, o cetònic, en el carboni adjacent al grup aldehid principal, que serà oxidat, és necessària per a l'activitat enzimàtica. Així, l'enzim és capaç d'oxidar el L-lactaldehid, el L-gliceraldehid i el glicolaldehid, mentre que no actua sobre acetaldehid ni propionaldehid. D'entre els α -cetoaldehids, només s'ha assajat el metilglixal, que és oxidat per la lactaldehid deshidrogenasa amb una velocitat de reacció i afinitat més baixes.

L'estereoespecificitat de l'enzim sobre els isòmers de la forma L- havia estat observada amb anterioritat al nostre laboratori (19) i confirmada en l'elaboració del present treball amb l'enzim purificat.

Els valors de K_m pels diferents aldehids que actuen com a substrats de la reacció enzimàtica indiquen que la lactaldehid deshidrogenasa presenta una afinitat més gran pel L-lactaldehid, quin valor de K_m és un ordre de magnitud inferior que els trobats pel L-gliceraldehid i glicolaldehid, si bé, és el α -hidroxialdehid que presenta una V_{max} més baixa.

L'eficiència catalítica de l'enzim, definida pel quocient V_{max} (U/mg) / K_m (mM) (86,124) calculada pels tres α -hidroxialdehids esmentats, és d'aproximadament 200 pel L-lactaldehid, de 85 pel L-gliceraldehid i de 50 pel glicolaldehid. Comparant aquests resultats, es pot deduir que el millor substrat de la lactaldehid deshidrogenasa és el L-lactaldehid. Des d'aquest punt de vista, el metilglixal és el pitjor substrat.

Pel que fa al cofactor, l'enzim utilitza bàsicament el NAD^+ , ja que l'activitat mesurada en presència de NADP^+ és només un 10% de l'obtinguda amb NAD^+ . Els valors de K_m i V_{max} pel cofactor s'han calculat en presència de concentracions saturants de L-lactaldehid i de glicolaldehid (taula 8). Els valors trobats emprant el L-lactaldehid com a substrat són més baixos que els obtinguts en presència de glicolaldehid, encara que la relació entre tots dos paràmetres és constant en cada cas.

El pH òptim de la reacció d'oxidació dels aldehids catalitzada per la lactaldehid deshidrogenasa presenta un màxim de 9,5 en solució amortidora glicina-NaOH 100 mM (figura 17). Segons que s'ha comprovat, en les condicions d'assaig de l'esmentat enzym, la interferència deguda a la formació de complexes entre el NAD^+ i els aldehids, a pH alcalí, és despreciable. Aquests complexes absorbeixen a 340 nm de manera proporcional a la quantitat d'aldehid present a la mescla d'assaig. Els autors que descriuen aquesta interferència i canvien l'amortidor de l'assaig per altres menys alcalins, determinen l'activitat enzimàtica corresponent, en presència de quantitats d'aldehid superiors a 10 mM (40), mentre que a l'assaig de la lactaldehid deshidrogenasa, les concentracions d'aldehid emprades són molt més baixes, i en tot cas inferiors a 1 mM. Un altre factor important a tenir en compte és el temps, donat que la formació dels esmentats complexes és molt lenta (40), l'increment d'absorbència a 340 nm en 1 minut, degut a la unió aldehid- NAD^+ , és despreciable.

La reacció catalitzada per la lactaldehid deshidrogenasa és experimentalment irreversible. Aquesta característica és una

constant en les reaccions catalitzades per les aldehid deshidrogenases de la classe I segons Jakoby (83), en les que el aigua participa en la reacció, de manera que l'aldehid és transformat quantitativament a l'àcid corresponent. El càlcul de la l'energia lliure necessària per a revertir la reacció, determinada a partir dels valors calculats per a l'energia lliure de formació dels reactants, és molt elevada (de l'ordre de -12,5 Kcal a 25°C i pH 7,0) (83). Mentre que en les reaccions en les que intervé el CoA (enzims de la classe II), o les que usen P_i com a co-substrat, com la β -semialdehid aspàrtic deshidrogenasa de llevat, presenten valors d'energia lliure molt més baixos, podent ésser revertides.

S'ha determinat també el valor de l'energia d'activació corresponent a l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa, emprant dos aldehids diferents com a substrat, el L-lactaldehyd i el glicolaldehid (veure 3.3.2.2)

Aquest paràmetre, conjuntament amb el de la inactivació tèrmica (quin resultat es detalla a l'apartat 3.3.2.3) són més importants en estudis comparatius entre enzims diferents o isoenzims. Des d'aquest punt de vista, els enzims lactaldehyd deshidrogenasa purificats a partir de la soca 1 i de la soca 3, han presentat idèntic comportament. La comparació amb l'enzim amb activitat glicolaldehid deshidrogenasa de la soca JA-102 serà analitzada més endavant (apartat 4.3).

L'estudi de l'efecte dels ions divalents sobre l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa (veure 3.3.2.4) indica que l'enzim és inhibit fortament pels ions Zn^{2+} i Cu^{2+} (figures

20 i 21), fins i tot, quan aquests estan presents a concentracions de l'ordre de micromolar a la mescla d'assaig. Mentre que els cations Ca^{2+} , Mn^{2+} i Mg^{2+} tenen un efecte inhibitor molt menys marcat. Cal esmentar que aquestes dades han estat obtingudes sense incubació prèvia de l'enzim amb els cations. Són els valors determinats a l'assajar l'activitat enzimàtica en presència d'aquests.

L'efecte del temps d'incubació amb cations s'ha fet només pel Zn^{2+} i Cu^{2+} a la concentració de $75 \mu\text{M}$, dins el contexte d'un estudi encaminat a analitzar l'efecte protector de l'EDTA (figura 21). L'EDTA actua protegint la inactivació per part d'aquests cations quan està present a la mescla d'incubació abans de l'addició dels cations. Per contra, no és capaç de restaurar l'activitat de l'enzim quan aquest ha estat prèviament inactivat per acció dels esmentats ions. És per això, que l'EDTA ha estat emprat amb èxit, a la concentració de 1 mM , com agent protector en el procés de purificació de la lactaldehydeshidrogenasa.

La implicació dels grups $-\text{SH}$ en el mecanisme d'oxidació d'aldehyds catalitzat per la lactaldehydeshidrogenasa s'ha evidenciat amb l'us del p-hidroximercuribenzoat. Aquest compost provoca una forta inhibició de l'enzim lactaldehydeshidrogenasa quan s'addiciona a la mescla d'assaig (figura 22). El DTT, a la concentració de $1,6 \text{ mM}$, és capaç de revertir parcialment la inactivació provocada pel p-hidroximercuribenzoat, recuperant-se un 35% de l'activitat inicial. Aquest comportament envers compostos que reaccionen amb grups $-\text{SH}$ lliures és comú

al grup d'aldehid deshidrogenases. És per això, que aquests enzims són altament inestables en els processos de purificació, perdent ràpidament l'activitat per oxidació o modificació dels grups sulfhidril necessaris per a l'acció catalítica. La protecció d'aquests grups s'aconsegueix per l'addició de compostos reductors del tipus 2-mercaptoetanol o DTT, a les solucions amortidores emprades en els processos de purificació.

Com ja s'ha indicat a l'apartat 1.2.3.1, la lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli va ésser parcialment purificada i caracteritzada a partir de la soca 3 (150). Si s'analitzen les propietats descrites pels autors corresponents i que han estat resumides a l'apartat 1.2.3.1, en relació amb les obtingudes amb l'enzim purificat i que formen part dels resultats presentats en aquest treball (veure 3.3), s'observen algunes diferències atribuïbles, potser, a les tècniques emprades en cada cas.

A nivell molecular, el pes molecular de l'enzim natiu, estimat per Sridhara i Wu en 100.000 daltons, és clarament diferent del presentat en aquest treball (220.000 daltons). La determinació d'aquest paràmetre es va fer per ultracentrifugació en gradients de sacarosa i gel filtració respectivament. Fins a la realització del present treball, no hi havia dades referents a l'estructura de l'enzim, llevat del pes molecular, ja esmentat.

Quant a la caracterització cinètica, hi ha clares diferències que poden ésser el resultat de la utilització de condicions d'assaig diferents.

Així, el pH òptim descrit per aquests autors no concorda amb el trobat per nosaltres, si bé en aquest sentit pot influir el fet que els amortidors usats en la determinació de l'activitat són diferents.

Sridhara i Wu presenten a l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa com a específic pel L-lactaldehyd, però tanmateix admeten que és un fet poc freqüent dins el grup compost per les aldehyd deshidrogenases, ja que la majoria presenten una àmplia especificitat de substrat, quan menys actuen sobre més d'un aldehyd. A les nostres mans, la lactaldehyd deshidrogenasa presenta activitat sobre diversos aldehyds (α -hidroxi- i α -cetoaldehyds) si bé el L-lactaldehyd és el millor substrat.

La raó d'aquesta discrepància quant a l'especificitat de substrat, molt probablement, radica en la concentració d'aldehyd emprada a l'assaig enzimàtic, que era de 20 mM en el cas descrit per aquests autors. Com pot apreciar-se, és una concentració molt elevada en relació amb la utilitzada en el nostre laboratori. Això es degut, amb quasi tota seguretat, a que el grau de puresa de les preparacions de L-lactaldehyd obtingudes en els dos laboratoris són diferents, ja que el pas de purificació per cromatografia en paper (veure 2.11.2) no està descrit per aquests autors. La concentració òptima de L-lactaldehyd purificat i desdimeritzat per a la determinació de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa segons es descriu a 2.4.2.1 és de 0,1 mM (molt més baixa que la descrita de 20 mM). Aquests resultats indicarien que el L-lactaldehyd sintetitzat contindria una impuresa que afectaria considerablement a l'ac-

tivitat lactaldehyd deshidrogenasa, obligant a incrementar molt la concentració d'aldehyd a l'assaig, i fins i tot així, l'activitat específica, en l'extracte cel.lular, és molt baixa, segons que comenten els esmentats autors.

La desdimerització del L-lactaldehyd també sembla necessària, ja que aquest fenomen descrit pels α -hidroxialdehyds en solució, disminueix el nombre de grups aldehyd disponibles per a la reacció enzimàtica (103).

Així doncs, a la concentració de 20 mM, el L-gliceraldehyd assajat per aquests autors no era substrat de la reacció enzimàtica. L'activitat trobada era només d'un 3% de la presentada amb L-lactaldehyd 20 mM com a substrat. A aquesta concentració l'efecte d'inhibició per substrat presentat a l'apartat 3.3.2.6 és molt marcat en el cas del gliceraldehyd. Aquests autors no van assajar concentracions inferiors a 20 mM. Tampoc van provar el glicolaldehyd com a substrat, a cap concentració.

Pel que fa a cofactors, Sridhara i Wu descriuen que al lactaldehyd deshidrogenasa, per ells purificada, no és capaç d'usar NADP^+ com a cofactor, si bé nosaltres hem mesurat una activitat lligada a NADP^+ amb l'enzim purificat, de l'ordre de 10 vegades inferior a la determinada en presència de NAD^+ .

Les K_m obtingudes pel NAD^+ en tots dos laboratoris són semblants, de l'ordre de $1 \cdot 10^{-4}$ M. Les K_m pel lactaldehyd són molt diferents, així aquests autors presenten un valor de $1 \cdot 10^{-2}$ M, davant del $3 \cdot 10^{-5}$ M obtingut en el present treball.

Encara que la lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli ja havia estat parcialment purificada i caracteritzada, els resultats

eren incomplets i no massa clars en determinats aspectes, pel que creiem que el conjunt del present treball es positiu i aporta dades noves referents a l'estructura de l'enzim, així com de les seves característiques cinètiques.

4.2. LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA D'E. COLI : POSSIBLE ENZIM MULTIFUNCIONAL.

Els resultats obtinguts al llarg d'aquest treball demostren la participació de la lactaldehyd deshidrogenasa en diferents metabolismes que inclouen sucres (fucosa, ramnosa, i potser D-arabinosa), glicols (propandiòl, etilenglicol) i aminoàcids (glutamat).

Ara bé, el catabolisme de fucosa i ramnosa condueix a la formació d'un intermediari comú, el L-lactaldehyd, al temps que aquest substrat es produeix també, durant la utilització de 1,2-propandiòl. Així, la implicació de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa en aquests metabolismes és conseqüència de la seva actuació sobre el mateix aldehyd. Un cas quelcom diferent és el de l'etilenglicol. E. coli per a metabolitzar aquest glicol agafa prestats els enzims de la via d'utilització del 1,2-propandiòl, oxidant el glicolaldehyd, format a partir de l'etilenglicol, a glicolat. Si bé no s'ha desenvolupat cap via pròpia per a la utilització de l'etilenglicol, és interessant remarcar l'adaptació aconseguida mitjançant la superproducció de la lactaldehyd deshidrogenasa i quina inducció és provocada, molt probablement pel propi glicolaldehyd.

La participació de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa en el metabolisme del glutamat és un fet evident, a la vegada que és difícil pensar que la formació de L-lactaldehyd té lloc durant el metabolisme d'aquest aminoàcid.

En aquests moments no podem donar cap explicació referent al per què de la inducció de la lactaldehyd deshidrogenasa com a conseqüència del metabolisme del glutamat. No sabem quin és l'intermediari que actuaria com a inductor de l'enzim, donada la complexitat bioquímica d'aquest aminoàcid. Ja s'ha esmentat a l'apartat 1.3.5 que moltes rutes degradatives d'aminoàcids convergeixen en la formació de glutamat (a través de α -cetoglutarat), així com el glutamat és utilitzat dins la cèl.lula per diverses rutes metabòliques per a aconseguir diferents funcions. El que si és evident, és que l'enzim induït pel metabolisme del glutamat és la pròpia lactaldehyd deshidrogenasa objecte d'aquest treball. Així ho confirmen les evidències genètiques obtingudes amb mutants deficients de lactaldehyd deshidrogenasa, on no s'observa inducció per glutamat, i les evidències immunològiques referents a la identitat entre l'enzim sintetitzat en presència d'hidrolitzat de caseïna i el produït en presència de ramnosa o fucosa.

L'existència d'enzims multifuncionals està ampliament descrita a la bibliografia, si bé la majoria presenten diferents formes isoenzimàtiques, és a dir, espècies que catalitzen la mateixa reacció, però són diferenciables en determinats aspectes estructurals i a vegades d'inducció.

Aquest és el cas d'enzims que presenten una àmplia especificitat de substrat i com a conseqüència participen en diversos metabolismes. Com a exemples d'aquest tipus d'enzims farem menció de les aldehyd deshidrogenases de mamífers, que han estat

objecte d'àmplis estudis donada la seva relació amb el metabolisme de l'etanol dins el contexte de l'alcoholisme. La presència d'isoenzims d'aldehid deshidrogenasa en diferents teixits, sobretot en fetge, s'ha evidenciat mitjançant estudis cinètics i estructurals. Els diferents isoenzims poden actuar sobre diversos aldehids, a més de l'acetaldehid, entre els que hi podem comptar el propanal, aldehids alifàtics de cadena llarga, aromàtics, malondialdehid, derivats de neurotransmissors, precursors d'àcids biliars i metabòlits de corticoesteroids. Si bé s'especula que els isoenzims de baixa Km per a l'acetaldehid estarien més relacionats amb el metabolisme de l'etanol, els d'alta Km podrien estar més implicats en el metabolisme del colesterol, corticoesteroids i d'amines biogènes com la dopamina i la serotorina. Fins i tot s'ha descrit la inducció de certs isoenzims d'aldehid deshidrogenasa hepàtica per fenobarbital .

Un altre exemple d'enzims inespecífics és el referent a l'alcohol deshidrogenasa, la qual pot oxidar diferents alcohols. L'existència dels quals a la vena porta, com a conseqüència de l'actuació bacteriana en el tracte intestinal, així com l'àmplia distribució de l'alcohol deshidrogenasa en la natura, fan pensar en que la funció fisiològica d'aquest enzim sigui la de metabolitzar aquests productes, actuant com a un sistema de desintoxicació (18). S'ha demostrat, també, l'existència d'isoenzims d'alcohol deshidrogenasa en diverses espècies, formats per la combinació de diferents tipus de subunitats (18).

Encara que la lactaldehyd deshidrogenasa presenta activitat sobre diversos aldehids, no s'ha identificat la presència de diferents formes isoenzimàtiques en cap dels metabolismes analitzats. Fins i tot, donada la baixa afinitat pel glicolaldehid, la capacitat de metabolitzar etilenglicol en la soca JA-102 s'ha aconseguit augmentant la producció de la mateixa forma enzimàtica de la soca progenitora.

Un altre tipus d'enzims multifuncionals són aquells en els quals convergeixen dues o més vies metabòliques diferents, quelcom semblant a les vies d'utilització de fucosa i ramnosa en el punt de formació del L-lactaldehyd.

S'han escollit dos enzims bacterians per a comentar : la D-glicerat quinasa d'E.coli (165) i la semialdehyd 2-cetoglutàric deshidrogenasa de Pseudomonas putida (93).

En E.coli, la D-glicerat quinasa té dues funcions dependent de la font de carboni usada pel creixement. Amb D-glicerat, l'enzim juga un paper important en el catabolisme, transformant el substrat en 3-fosfoglicerat, intermediari glicolític. Això és també aplicable pel creixement en D-glucarat, que és metabolitzat a piruvat i D-glicerat. L'enzim és induïble pel creixement en tots dos compostos. Ara bé, s'ha detectat una altra forma isoenzimàtica de la D-glicerat quinasa diferent, durant el creixement en glioxilat o glicolat quin catabolisme té lloc mitjançant les reaccions del cicle dels àcids dicarboxílics. Donat que els intermediaris d'aquest cicle són també precursors biosintètics, s'han d'anar reemplaçant a través de vies anapleròtiques. Una de les maneres és a través del

glioxilat, el qual pot donar precursors biosintètics a través de la via del D-glicerat. Aquesta ruta comporta la transformació del glioxilat en fosfoenolpiruvat en quatre etapes, una de les quals és la fosforilació del D-glicerat. Així, la D-glicerat quinasa té també un paper anapleròtic i és induïda pel creixement en glicolat, però no pel creixement en glicolat més casaminoàcids. D'aquesta manera, s'han identificat dues formes de D-glicerat quinasa en soques d'E.coli K-12, una anomenada glicerat quinasa I, que és l'enzim catabòlic induït pel creixement en D-glicerat i D-glucarat i quina inducció no està afectada per la presència de aminoàcids. La D-glicerat quinasa II, és l'isoenzim anapleròtic induït pel creixement en glicolat en absència de casaminoàcids.

Tot comparant aquest model amb la lactaldehid deshidrogenasa objecte d'aquest treball, cal esmentar que la inducció en presència de glutamat podria ésser deguda a alguna via anapleròtica o secundària del metabolisme d'aquest aminoàcid. Malgrat això, l'enzim induït pel glutamat és estructuralment i genèticament idèntic a la lactaldehid deshidrogenasa induïda pel creixement en fucosa, ramnosa, propandiol, així com en etilenglicol.

L'altre model d'enzim multifuncional, punt de convergència de dues vies metabòliques, escollit per a comentar en relació amb la lactaldehid deshidrogenasa és la semialdehid 2-cetogutàric deshidrogenasa de P.putida (apartat 1.2.1).

Aquest enzim catalitza l'oxidació del semialdehid 2-ceto-

glutàric a 2-cetoglutarat. Aquest pas és el punt on convergeixen dues vies catabòliques induïbles, la de la hidroxiprolina i la del D-glucarat (figura 1). Els enzims induïts per la hidroxiprolina i pel D-glucarat purificats a homogeneïtat mostren diferències estructurals (relacionades amb el perfil obtingut en la digestió amb tripsina), immunològiques i genètiques, encara que tots dos isoenzims són molt similars, donat que les anàlisis del pes molecular, tipus de subunitats , composició d'aminoàcids i propietats cinètiques els identificaven com a indistingibles (93).

L'estudi realitzat amb la lactaldehyd deshidrogenasa d' E.coli ha evidenciat que l'enzim induït pels diferents sucres (fucosa i ramnosa) així com per l'hidrolitzat de caseïna, i pels glicols és el mateix enzim. Un dels estudis més conclusius és el realitzat a nivell genètic, usant mutants deficients de lactaldehyd deshidrogenasa. La manca de síntesi enzimàtica en les soques 40, i JA-104 a 42°C s'observa tant durant el creixement en ramnosa, com en hidrolitzat de caseïna, així com en propandiol, medi en el qual no poden créixer donada l'esmentada deficiència enzimàtica.

En el mutant JA-102 (etilenglicol positiu) la mutació que ha conduït a la superproducció de lactaldehyd deshidrogenasa es manifesta tant en el creixement en etilenglicol com en hidrolitzat de caseïna.

Els estudis immunològics donen també suport a que totes les vies metabòliques que condueixen a l'actuació de la lactaldehyd deshidrogenasa sobre el L-lactaldehyd o sobre altres aldehids, utilitzen la mateixa forma enzimàtica de lactaldehyd

deshidrogenasa. Si bé, els enzims produïts per les diferents soques s'han purificat a partir de creixements en hidrolitzat de caseïna i així s'ha utilitzat com a antígen la proteïna de la soca 3, s'observa una identitat immunològica total amb l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa present en els extractes cel.lulars corresponents als creixements en ramnosa, propandiol i etilenglicol.

El fet que diferents vies metabòliques induïbles convergeixin en una etapa enzimàtica comuna obre possibles alternatives per a la regulació d'aquesta reacció en qüestió :

a) Una de les alternatives és la inducció separada de diferents enzims per a aquesta reacció comuna. Cada enzim estaria controlat en associació amb una de les vies. Aquest model és el que segueixen els enzims comentats en aquest apartat: les D-glicerat quinases d'E.coli i la semialdehyd 2-cetoglutaric deshidrogenasa de P.putida.

b) Una segona possibilitat és l'existència d'un únic enzim que catalitza la reacció comuna, el qual podria ésser induït pel pròpi substrat o per algun intermediari comú posterior. Sembla que en Pseudomonas sp, la β -cetoadipatenol hidrolasa, enzim comú on convergeixen les vies del catecol i del protocatecuato segueix aquest model, i és induït pel producte de la reacció, el cetoadipat (119). Cal esmentar que en aquest treball reportat per Orston no es presenten estudis comparatius amb els enzims purificats, ni amb mutants deficientes d'aquests metabolismes, per la qual cosa no es pot descartar la possibi-

litat de l'existència de dos gens estructurals, un associat a cada sistema i ambdós sota un mateix control.

c) Una tercera alternativa seria la inducció d'un únic gen comú a les diferents vies, però provocada per inductors separats, cadascun associat a una de les vies separades prèvies. Aquesta possibilitat, segons els nostres coneixements encara no ha estat reportada, si bé sembla que és el model seguit per la lactaldehyd deshidrogenasa.

Com ja s'ha esmentat en aquest apartat, els estudis genètics realitzats en mutants, així com els immunològics i de caracterització dels enzims produïts per diferents soques, donen suport a l'existència d'un únic enzim que respondria a la inducció provocada per diferents inductors, depenent de la via : el L-lactaldehyd en els metabolismes de fucosa, ramnosa i propandiol; i el glicolaldehyd en el metabolisme de l'etilenglicol. Molt probablement, l'inductor format durant el creixement en hidrolitzat de caseïna (o en presència de glutamat) és diferent dels dos aldehyds esmentats.

4.3. PARTICIPACIÓ DE L'ENZIM LACTALDEHID DESHIDROGENASA EN EL METABOLISME DE L'ETILENGLICOL EN MUTANTS D'E. COLI.

E. coli tipus salvatge és incapaç d'usar 1,2-propandiol i etilenglicol com a única font de carboni i energia, car no disposa de la maquinària enzimàtica necessària per a la seva completa metabolització.

Per mutagènesi de la soca tipus salvatge amb etilmetan-sulfonat s'aconsegüí obtenir mutants capaços d'utilitzar propandiol com a substrat de creixement, mentre que no fôu possible l'obtenció de mutants que degredessin l'etilenglicol (veure 1.3.3). En els mutants propandiol positius s'havia fet constitutiva la síntesi de l'enzim propandiol òxido-reductasa, en forma activa. Aquest enzim és induïble pel creixement anaeròbic en ramnosa. En fucosa, l'enzim és sintetitzat en forma inactiva en aeròbiosi, i és activat pel canvi a anerobiosi en el mateix medi.

Donat que la propandiol òxido-reductasa presenta una forta activitat envers l'etilenglicol, transformant-lo en glicolaldehid, es va creure convenient obtenir els mutants etilenglicol positius a partir d'una soca propandiol òxido-reductasa constitutiva, com és la soca 3.

El problema que presentava aquesta soca era l'incapacitat d'usar glicolat, quin metabolisme es creia necessari per a la metabolització de l'etilenglicol. Per tant, es partí de la soca G3 (Prd⁺ , Glicolat⁺) i per mutació espontània es seleccionà la soca JA-102 per la seva capacitat de créixer en medis que contenien etilenglicol com a única font de carboni

i energia.

La via de degradació d'aquest glicol és la que es detalla a l'apartat 1.3.3, on el glicolaldehid, format per acció de la propandiol òxido-reductasa sobre l'etilenglicol, és oxidat a glicolat, el qual ja pot ésser adientment transformat per E. coli a fi d'entrar en el metabolisme central.

És interessant de resaltar, que la via d'utilització de l'etilenglicol en E.coli concorda amb les vies descrites anteriorment per a altres soques bacterianes capaces de degradar aquest glicol, si bé aquesta via, en E.coli, ha estat construïda a través d'un procés d'evolució experimental (aplicant una forta pressió selectiva sobre aquest microorganisme en el laboratori) . Això indicaria, que l'evolució d'aquesta nova via metabòlica ha portat al mateix model que l'evolució natural ha produït de manera indepenent en altres microorganismes filogenèticament no relacionats. Aquest model és un dels exemples de com l'adquisició d'una nova capacitat metabòlica pot afavorir l'adquisició d'altres. Així, els mutants d'E.coli amb capacitat d'utilitzar propandiol veuen augmentat el seu potencial evolutiu envers la utilització d'altres compostos relacionats, com en aquest cas l'etilenglicol.

A la figura 6 es presenta el paral.lelisme existent entre les vies de degradació del propandiol i l'etilenglicol. Així, el primer pas d'ambdues vies està catalitzat per la mateixa propandiol òxido-reducataasa, formant-se els aldehids corresponents: el L-lactaldehid, en el cas del propandiol i el glicolaldehid en el de l'etilenglicol. A continuació, els aldehids són oxidats als àcids corresponents. L'enzim responsable d'aquesta

oxidació en el metabolisme del propandiol és la lactaldehyd deshidrogenasa. Ara bé, l'origen de l'enzim amb activitat glicolaldehyd deshidrogenasa de la via de l'etilenglicol era desconegut pels autors que identificaren aquesta via degradativa (16).

Hi havia dues possibilitats per a explicar l'aparició d'un enzim amb activitat glicolaldehyd deshidrogenasa : 1) L'expressió d'un nou gen per a aquest enzim que estigués reprimít i s'expressés en condicions desconegudes, o bé 2) un canvi en l'expressió del gen de la lactaldehyd deshidrogenasa induïble en la soca 1 i en la soca 3. (No es va detectar cap canvi a nivell de la lactaldehyd deshidrogenasa en la selecció de la soca 3 a partir de la soca 1).

Segons la primera hipòtesi, seria possible demostrar l'existència de dues activitats aldehyd deshidrogenasa en la soca JA-102 actuant sobre el glicolaldehyd, la nova i la corresponent a la lactaldehyd deshidrogenasa, ja que era poc probable que aquest darrer enzim desaparegués com a conseqüència de l'aparició de la glicolaldehyd deshidrogenasa. Els dos enzims serien, segurament, diferenciables estructuralment.

Pel que fa a la segona hipòtesi, ja Leblanc i Mortlock (101) van suggerir la possibilitat de que l'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa descrita en un mutant d'E.coli capaç de metabolitzar la D-arabínosa mitjançant la utilització dels enzims de la fucosa, fós deguda a l'acció de la lactaldehyd deshidrogenasa descrita per Sridhara i Wu. Aquesta hipòtesi no és tant descabellada, si tenim en compte que l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa, purificat de la soca 1 i de la soca 3,

presenta activitat sobre glicolaldehid.

D'aquesta manera s'ens plantejà la qüestió de si les activitats lactaldehid deshidrogenasa i glicolaldehid deshidrogenasa eren funció de la mateixa proteïna enzimàtica a E.coli. Si s'evidenciava aquesta hipòtesi, estariem davant d'un cas interessant d'evolució, ja que l'adquisició de la capacitat d'utilitzar etilenglicol suposaria la utilització dels enzims que intervenen en la via de degradació d'un altre glicol, el propandiol, al temps que és una inversió de la via de fermentació de la L-fucosa i L-ramnosa en la soca salvatge.

Si aquesta opció fos certa, els nivells d'activitat glicolaldehid deshidrogenasa de la soca progenitora (G3 ó 3) serien deguts a l'enzim lactaldehid deshidrogenasa. La selecció de la soca JA-102 comportava un increment d'aquesta activitat en unes tres vegades. Aquest augment en els nivells d'activitat glicolaldehid deshidrogenasa podia ésser degut a que la mutació produïda hagués afectat l'enzim responsable d'aquesta activitat : a) donant un enzim més actiu, b) augmentant la síntesi de l'enzim responsable, i c) totes dues coses alhora.

Per tal d'abordar aquesta problemàtica i a fi de poder establir l'origen de l'enzim amb activitat glicolaldehid deshidrogenasa dels mutants etilenglicol positius, s'analitzaren comparativament les activitats lactaldehid deshidrogenasa i glicolaldehid deshidrogenasa, així com els enzims produïts, en les diferents soques que participen en el model d'evolució experimental esmentat : la soca 1, la soca 3 (equiparable a la soca G3), i la soca JA-102. L'estudi comprenia aspectes fisiològics, genètics, estructurals i cenètics (apartat 3.6).

Els estudis d'inducció, portats a terme en aquestes soques, no van demostrar cap diferència entre ambdues activitats. Així, les fonts de carboni que comportaven una inducció en els nivells d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa (fucosa en la soca 1 i propandiòl en la soca 3) provocaven proporcionalment una inducció de l'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa. Aquest fet es donava també a l'inrevés, la soca JA-102 presentava els mateixos nivells d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa en els creixements en hidrolitzat de caseïna i en etilenglicol, i aquests eren tres vegades superiors als de la soca 1 i 3 (taula 14). La relació entre ambdues activitats, en cada soca i condició, era constant, tot indicant que totes dues eren funció d'un mateix enzim.

Les evidències genètiques de la identitat entre la lactaldehyd deshidrogenasa i la glicolaldehyd deshidrogenasa s'obtingueren mitjançant mutants que havien estat seleccionats per la seva incapacitat de créixer en propandiòl, per la manca d'activitat lactaldehyd deshidrogenasa : la soca 40 i la soca termosensible JA-104 (a 42°C). Així, la pèrdua de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa en la soca 40 era concomitant amb l'absència d'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa. L'adquisició de la termosensibilitat per la soca JA-104 afectava simultàniament a totes dues activitats (taula 15) . Això indicava que no hi havia cap altre enzim, en els extractes cel·lulars d'aquests mutants, amb capacitat d'oxidar el glicolaldehyd.

La detecció d'un únic enzim amb activitat glicolaldehyd deshidrogenasa en els extractes crus del mutant JA-102 s'obtin-

gué, també, per l'anàlisi electroforètica (veure 2.6.2.3) i per cromatografia de bescanvi aniònic (veure 3.6.2.4) dels esmentats extractes cel.lulars, a la vegada que van demostrar que aquest únic enzim era indistingible, al menys a través d'aquestes tècniques, de l'enzim present en els extractes cel.lulars de la soca 1 i de la soca 3.

Una altra evidència al respecte és l'aportada per la copurificació simultània d'ambdues activitats (lactaldehyd i glicolaldehyd deshidrogenasa) al llarg de tot el procés de purificació disenyat per a la lactaldehyd deshidrogenasa d'E. coli, tant partint de la soca 3, com de la soca JA-102, mantenint-se la relació entre totes dues activitats constant durant tot el procés (veure 3.6.2.5). La única banda coincident obtinguda en les electroforesis corresponents a cada purificació, tant al revelar per activitat glicolaldehyd deshidrogenasa com per lactaldehyd deshidrogenasa, dona suport a la identitat entre tots dos enzims, alhora que descarta la possibilitat de l'existència d'un segon possible enzim amb activitat aldehyd deshidrogenasa en les dues soques.

A més, no ha estat possible trobar diferències estructurals entre els enzims sintetitzats per les soques 1, 3 i JA-102, com es despren de la caracterització molecular realitzada en aquests enzims a nivell de pes molecular, nombre de subunitats, punt isoelèctric, composició d'aminoàcids, espectre d'absorció i contingut en NAD^+ , així com de l'anàlisi dels pèptids resultants de la digestió proteolítica limitada dels enzims de les soques 3 i JA-102 amb α -quimotripsina i proteasa V8 de S.aureus.

La similitud estructural dels enzims responsables de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa i glicolaldehyd deshidrogenasa ha estat confirmada també per tècniques immunològiques. Els enzims de les soques 1, 3 i JA-102 presenten identitat immunològica davant preparacions d'anticossos obtingudes a partir de la lactaldehyd deshidrogenasa de la soca 3.

Així mateix, l'estudi cinètic dels enzims purificats a partir de les tres soques : 1, 3 i JA-102, demostrà que són indistingibles des d'aquest punt de vista, ja que els tres enzims presenten el mateix pH òptim i especificitat de substrat sobre els α -hidroxiladehids i de cofactor. Les constants cinètiques K_m i V_{max} determinades pels tres enzims i pels aldehyds més actius (L-lactaldehyd, L-gliceraldehyd i glicolaldehyd), així com pel coenzim NAD^+ , presenten valors del mateix ordre, tot indicant que la mutació que ha afectat l'enzim responsable de l'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa en l'obtenció dels mutants etilenglicol positius, no ha modificat la reactivitat, ni l'eficiència catalítica del mateix.

Els paràmetres d'energia d'activació, així com el perfil d'inactivació tèrmica eren idèntics pels enzims purificats a partir de les tres soques.

Al llag d'aquest recull comparatiu s'aporten evidències suficients que l'enzim present en la soca JA-102 (etilenglicol positiva) amb activitat glicolaldehyd deshidrogenasa, en el contexte del metabolisme de l'etilenglicol en aquesta soca, és la pròpia lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli, present en la

soca tipus salvatge i en la soca 3 (propandiol positiva).

L'existència d'un segon enzim amb activitat sobre el glicolaldehid queda descartada, donat que no ha estat possible detectar-lo en cap de les tècniques emprades.

La selecció de mutants capaços d'utilitzar etilenglicol com a única font de carboni i energia no ha provocat l'aparició d'un isoenzim de lactaldehid deshidrogenasa més actiu. Segons que sembla, la mutació produïda, que es manifesta en un increment dels nivells d'activitat glicolaldehid deshidrogenasa de l'ordre d'unes tres vegades, provoca la síntesi incrementada de l'enzim responsable. Aquest fet queda confirmat per la quantificació immunològica de l'enzim present a la soca JA-102 respecte de la soca 3 (figura 42).

La mutació ha afectat possiblement a la zona promotora de l'expressió gènica, afavorint l'inici de la transcripció gènica. Com a conseqüència de l'increment en la velocitat de transcripció, es produeix una superproducció de l'enzim corresponent, de manera que pot usar substrats pels qui presenta menys afinitat (com seria el cas del glicolaldehid), transformant-lo a una velocitat suficient com perquè tingui lloc el metabolisme de l'etilenglicol.

Des d'un punt de vista evolutiu, l'eficiència catalítica o potencial cinètic (V_{max}/K_m) envers un determinat substrat es pot modificar millorant les constants cinètiques (augmentant la V_{max} , o disminuint el valor de la K_m), o bé, incrementant la concentració total d'enzim, ja que la V_{max} està relacionada amb aquest darrer paràmetre, a través de l'equació

següent : $V_{max} = K_{cat} \times (E)_t$, on K_{cat} és la constant catalítica (min^{-1}) o velocitat de recanvi de l'enzim, la qual representa el nombre màxim de molècules de substrat convertides en producte per molècula d'enzim i per unitat de temps (86). En la selecció de la soca JA-102, s'ha millorat l'eficiència catalítica de l'enzim lactaldehid deshidrogenasa sobre el glicolaldehid mitjançant un increment en la concentració total d'enzim, mantenint les constants cinètiques K_m i V_{max} inalterades.

Estan descrits exemples d'aquest tipus de mutacions que afecten el promotor de gens estructurals, provocant una superproducció d'enzim (17,129). Certes mutacions en la regió del promotor poden conferir resistència a la repressió catabòlica (148). Quelcom semblant succeeix amb la mutació que ha portat a la soca JA-102 a créixer en etilenglicol, car es perd la repressió catabòlica provocada per la glucosa. A més, la inducció assolida en els creixements en fonts de carboni inductores -hidrolitzat de caseïna i etilenglicol- és del mateix ordre, a diferència del que es dona a la soca tipus salvatge.

4.4. L'ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDROGENASA NO ÉS FUNCIO D'ALTRES ENZIMS DEL TIPUS ALDEHID DESHIDROGENASA DESCRITS A E.COLI.

Donat que la lactaldehys deshidrogenasa purificada presenta activitat sobre diversos aldehids, entre els quals s'inclouen el gliceraldehyd i el glicolaldehid, a la vegada que no només és específica del metabolisme de la fucosa i del propandiol, es pensà en la possibilitat que l'activitat dita lactaldehyd deshidrogenasa fós una funció d'algun dels altres enzims del tipus aldehid deshidrogenasa profundament caracteritzats i presents a E.coli. Per tal d'esbrinar si aquesta possibilitat era o no certa, s'analitzà comparativament la lactaldehyd deshidrogenasa descrita per nosaltres amb els altres enzims ja esmentats i amb una funció concreta, com són l'aldehyd deshidrogenasa lligada a CoA, la gliceraldehyd-3-fosfat deshidrogenasa i la glicolaldehid deshidrogenasa involucrada en la biosíntesi de la vitamina B₆.

De l'estudi comparatiu realitzat es pot concloure que la lactaldehyd deshidrogenasa és una entitat pròpia, perfectament diferenciable dels enzims esmentats, estructuralment i funcionalment.

Així, la manca d'activitat aldehid deshidrogenasa lligada a CoA en les preparacions purificades de lactaldehyd deshidrogenasa i els diferents nivells d'ambdues activitats obtingudes en els extractes cel·lulars de la soca i feta créixer en glucosa més peptona (veure 3.8.1.) donen suport a l'existència conjunta d'al menys dos enzims amb activitat aldehid deshidro-

genasa en E.coli, un amb activitat oxidativa sobre α -hidroxi i α -cetoaldehids, mentre que l'altre catalitza la formació del derivat lligat a CoA corresponent a l'acetaldehid, el propionaldehid i el butiraldehid. A més tots dos enzims difereixen quant a la reacció que catalitzen, el pH òptim d'activitat, necessitat de DTT o 2-mercaptoetanol a la mescla d'assaig i incubació prèvia amb NAD^+ , així com en l'especificitat de substrat (veure 1.2.3), corroborant els resultats referents a les activitats abans esmentades.

Un altre enzim d'E.coli, possible candidat responsable de l'activitat lactaldehid deshidrogenasa, era la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa. Aquest enzim catalitza una de les etapes de la glicòlisi, la formació de 1,3-difosfoglicerat a partir de gliceraldehid-3-fosfat, si bé, en absència de fosfat oxida aquest aldehid a 3-fosfoglicerat, actuant així com una aldehid deshidrogenasa normal.

Es tenen evidències indirectes de que tots dos enzims són diferents, a través de les característiques moleculars reportades per D'Alessio i Josse per a la gliceraldehid fosfat deshidrogenasa (36). Així, aquests autors presenten l'enzim natiu amb un pes molecular de 144.000 daltons i una estructura tetramèrica formada per subunitats idèntiques de 36.000 daltons cadascuna. Com es pot veure, aquests valors són diferents dels obtinguts per a la lactaldehid deshidrogenasa i presentats a 3.3.1. Quant a la composició d'aminoàcids, s'aprecien notables diferències en el contingut de lisina, aspàrtic (inclou també

asparragina) i metionina d'ambdós enzims, els quals estan presents a més baixa proporció a la lactaldehyd deshidrogenasa.

Per una altra part, els estudis genètics apunten també a l'existència per separat de tots dos enzims. Així, la capacitat de mutants deficients de lactaldehyd deshidrogenasa (soca 40) de créixer en medis com glucosa, glicerol o succinat descarta la possibilitat de que aquest enzim participi en la glicòlisi, donat que els mutants deficients en gliceraldehyd-3-fosfat deshidrogenasa no suporten creixement en aquests medis (76). A més, la posició dels gens estructurals de tots dos enzims dins el cromosoma d'E.coli sembla ésser diferent. Hillman, mitjançant la utilització d'un mutant termosensible de gliceraldehyd-3-fosfat deshidrogenasa, el localitzà en el minut 34. Estudis realitzats al nostre laboratori amb un mutant termosensible de lactaldehyd deshidrogenasa (soca JA-104) localitzen, probablement el gen regulador, prop del sistema fuc (minut 59,5). Estudis encara preliminars sobre la posició del gen estructural de la lactaldehyd deshidrogenasa indicarien la seva localització al voltant del minut zero (Comunicació personal del Prof.E.C.C.Lin).

L'elevada activitat de la lactaldehyd deshidrogenasa sobre el glicolaldehyd va fer pensar en la possibilitat que aquesta activitat enzimàtica fós funció de l'enzim glicolaldehyd deshidrogenasa depenent de NADP^+ implicat en la biosíntesi de la vitamina B_6 en E.coli B (veure 1.2.3.2.). L'enzim catalitza una reacció reversible de manera que és capaç de reduir el gli-

colat a glicolaldehid en presència de NADPH_2 , i així, actua com a font de glicolaldehid en la biosíntesi de l'esmentada vitamina. Aquesta reversibilitat és una característica diferencial important amb la lactaldehid deshidrogenasa objecte d'aquest treball.

Ara bé, en un dels treballs (112) es descriu la presència de tres isoenzims de la glicolaldehid deshidrogenasa d'E. coli B, amb característiques, equilibri de reacció i localització subcel.lular diferents, anomenats A, B i C (taula 20).

Els autors postulen que l'isoenzim A no estaria involucrat en la biosíntesi de la vitamina B_6 , car mutants deficients en els isoenzims B i C, però amb nivells normals d'isoenzim A presenten requeriments alternatius de vitamina B_6 i glicolaldehid.

Per les característiques resenyades a la taula 20, es pot assegurar que la lactaldehid deshidrogenasa no s'identifica amb cap dels isoenzims B i C. En tot cas, presenta una certa semblança amb l'isoenzim A.

Així, la lactaldehid deshidrogenasa pot usar NADP^+ com a cofactor. L'activitat lligada a NADP^+ és estimulada per potassi i és de l'ordre d'unes 10 vegades inferior a l'activitat en presència de NAD^+ . La mesura de l'activitat glicolaldehid deshidrogenasa depenent de NADP^+ , utilitzant tant l'assaig descrit per a l'enzim involucrat en la biosíntesi de l'esmentada vitamina (147) com l'assaig descrit per Boronat i col per a la lactaldehid deshidrogenasa (16), en una mostra purificada de lactaldehid deshidrogenasa, va donar nivells del mateix ordre,

i a la vegada inferiors als valors d'activitat depenent de NAD^+ (veure 3.8.3).

Com ja s'ha descrit a l'apartat 3.3.2, la lactaldehyd deshidrogenasa és inhibida per ions divalents i presenta activitat sobre diversos aldehids, fets, també descrits per a l'isoenzim A, mentre que els isoenzims B i C són específics i no inhibits per metalls.

Quant a la localització subcel.lular, cal esmentar que la presència de lactaldehyd deshidrogenasa a l'espai periplasmàtic no queda descartada, ja que tal com s'obtenen els extractes cel.lulars (apartat 2.3), en el sobrenadant recollit romanen tant els components citoplasmàtics, com els del periplama.

Per altra banda, la lactaldehyd deshidrogenasa catalitza una reacció irreversible (al menys no ha estat possible mesurar la reducció enzimàtica de l'àcid al corresponent aldehid), característica comuna a la major part d'aldehyd deshidrogenases descrites a la literatura. Malgrat tot, els isoenzims de la glicolaldehyd deshidrogenasa d'E.coli que intervenen en la biosíntesi de la vitamina B₆ catalitzen reaccions reversibles, fins i tot, els isoenzims B i C presenten una constant d'equilibri, que indica que la reacció està desplaçada cap a la formació de glicolaldehyd. Mentre que l'isoenzim A catalitza preferentment la reacció d'oxidació.

D'aquest recull comparatiu entre ambdós enzims (l'isoenzim A de la glicolaldehyd deshidrogenasa descrit per Morita i col, i la lactaldehyd deshidrogenasa) no es pot excloure la possibilitat que es tracti del mateix enzim, encara que estudiats

en un contexte diferent, i en condicions de mesura que potser no serien les òptimes per a l'isoenzim A, que en un principi es considerà associat a la biosíntesi de la vitamina B₆ (com els isoenzims B i C) i assajat, per tant, de la mateixa manera. Malgrat tot això, no es pot considerar una afirmació, sino més bé una hipòtesi a la que manquen, encara, dades més concretes abans d'ésser confirmada.

Per altra banda, l'isoenzim A descrit per Morita i col, podria ésser una aldehyd deshidrogenasa inespecífica que actuaria com a mecanisme de desintoxicació, evitant l'entrada d'aldehyds dins la cèl.lula bacteriana. Dins aquesta hipòtesi, l'isoenzim A de la glicolaldehyd deshidrogenasa seria un enzim diferent a la lactaldehyd deshidrogenasa, la qual tindria un paper en el metabolisme cel.lular de sucres, glicols i aminoàcids. Ara bé, no s'ha detectat cap activitat sobre el glicolaldehyd, a més de l'obtinguda per la lactaldehyd deshidrogenasa, al revelar per activitat aldehyd deshidrogenasa els extractes cel.lulars de diversos mutants d'E.coli sotmesos a separació electroforètica en condicions no desnaturalitzants. A la vegada que, al llarg de tot el procés de purificació de la lactaldehyd deshidrogenasa, no s'han obtingut diferents pics d'activitat, en cap de les etapes seguides. Això posaria en dubta la segona hipòtesi.

TAULA 20

RESUM DE LES CARACTERISTIQUES DELS ISOENZIMS DE LA GLICOLALDEHID DESHIDROGENASA D'E. COLI B

Isoenzim	Localització	Especificitat de substrat	Inhibició per metalls	Constant d'equilibri	Efecte de la piridoxina
A	Periplasma	Amplia	Forta	$3,3 \cdot 10^{-3}$	Nul
B	Citoplàsm	Específic	NO	502	Activació
C	Citoplasma	Específic	NO	480	Inhibició

Taula reproduïda del treball original de Morita i col (112).

4.5. REGULACIÓ DE LA LACTALDEHID DESHIDROGENASA.

La lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli havia estat descrita en el metabolisme aeròbic de la L-fucosa i del propanediol (150), considerant-la com a un enzim molt específic pel L-lactaldehyd, intermediari format a partir d'ambdues fonts de carboni i que a la vegada és substrat de l'enzim.

Els autors corresponents descrivien que l'enzim era induït pel metabolisme aeròbic de la L-fucosa en la soca 1, i pel metabolisme del propandiol en la soca 3, respecte a uns nivells basals d'activitat obtinguts en els creixements en hidrolitzat de caseïna.

A l'abordar l'estudi de la fisiologia i regulació de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa, ens varem plantejar d'analitzar l'activitat enzimàtica de la soca tipus salvatge en diferents medis i condicions d'oxigenació. Les fonts de carboni escollides per a aquest estudi van ésser : glucosa, glicerol, succinat, hidrolitzat de caseïna, ramnosa i fucosa. Dels resultats obtinguts (apartat 3.1) es pot concloure que l'enzim és semi-constitutiu en condicions aeròbiques, presentant nivells basals d'activitat en medis no inductors com són el glicerol i succinat. És induït pel creixement aeròbic en fucosa i ramnosa (el metabolisme de tots dos sucres coincideix en la formació del L-lactaldehyd), i sorprenentment, és també induït pel creixement aeròbic en hidrolitzat de caseïna. Per tant, els valors d'activitat obtinguts en aquest medi, considerats basals pel grup d'investigació d' E.C.C.

Lin , no es poden pendre com a tals. La relació d'inducció respecte els medis basals és de 3,5 per la fucosa i ramnosa, mentre que és de 2,5 pel hidrolitzat de caseïna.

La mateixa inducció assolida per un preparat sintètic que contenia els 20 aminoàcids, respecte l'hidrolitzat de caseïna, confirmava que la inducció era deguda al metabolisme d'algun aminoàcid, i no, conseqüència de la presència de determinades impureses (tipus sucres) que podien ésser en el preparat comercial.

Els estudis d'inducció, quin protocol s'explica a l'apartat 3.1, van demostrar que el glutamat era el responsable de la inducció observada en el creixement en hidrolitzat de caseïna. El grau d'inducció aconseguit pel glutamat és lleugerament inferior al detectat per a la glutamina, després de 5 hores de l'addició d'aquests aminoàcids a un cultiu en fase estacionària en glicerol (taula 4). Aquest fet es podria relacionar, potser, amb la facilitat d'entrada de cadascun dels aminoàcids dins la cèl.lula bacteriana. Cal remarcar també, que els controls en glicerol d'aquests experiments d'inducció presentaven nivells d'activitat enzimàtica lleugerament inferiors als descrits normalment (que són aproximadament entre 90-100 mU/mg), degut a que les cèl.lules no es recollien en fase exponencial, sino unes quantes hores després d'arribar a la fase estacionària.

L'estudi d'inducció de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa al llarg d'un creixement aeròbic en ramnosa demostrà que la inducció té lloc en plena fase exponencial. A una absorbància de 0,3, mesurada a 420 nm, el cultiu de la soca 1

presentava els nivells basals d'activitat (aproximadament 100 mU/mg), que incrementaven ràpidament fins a assolir el nivell màxim d'inducció a una absorbància de 1, mantenint-se constant fins a arribar al final del cultiu (absorbància de 4) (figura 28).

La quantificació immunològica de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa, sintetitzat per la soca 1 en les diferents condicions de creixement esmentades, indicava que la inducció de l'enzim en els medis inductors era deguda a un increment en la seva síntesi (veure 3.5.1.2). D'aquesta manera l'enzim sintetitzat en els medis basals i l'enzim induït són bioquímicament idèntics, ja que es formen per la transcripció del mateix gen estructural. Aquest model d'inducció és freqüent en els sistemes bacterians, i la síntesi de l'enzim té lloc, normalment, a partir d'aminoàcids (síntesi "de novo") i no a partir de pèptids inactius o proteïnes precursors formades abans de l'addició de l'inductor al cultiu (178).

S'observa, també, el fenomen de repressió catabòlica per glucosa. El creixement d'E.coli en un medi que contenia glucosa comportava una devallada en els nivells d'activitat de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa, alhora que una menor taxa de síntesi. Si bé, els valors d'activitat enzimàtica corresponents als creixements aeròbics en glicerol eren més elevats que en glucosa (no hi havia, per tant, un efecte de repressió catabòlica), l'addició de glicerol a un cultiu inductor de la lactaldehyd deshidrogenasa, provocava una aturada de la inducció enzimàtica, i els nivells d'activitat trobats en els

extractes cel·lulars corresponents eren de l'ordre dels obtinguts en glicerol (taula 10). De la mateixa manera, la presència conjunta de glicerol i una font de carboni inductor (hidrolitzat de caseïna o ramnosa) en el medi de cultiu rendia extractes amb nivells d'activitat basals, indicant que el glicerol evita la inducció de la lactaldehyd deshidrogenasa. És per aquest motiu, que els estudis d'inducció realitzats amb aminoàcids, o amb ramnosa, es feien addicionant l'inductor a cultius en glicerol en fase estacionària (a una absorbància de 3), on el glicerol s'havia ja practicament consumit.

Està descrit que l'addició d'un inductor a un cultiu en fase estacionària, provoca el mateix grau d'inducció que en fase exponencial de creixement. La única diferència és el temps necessari per a assolir la inducció. En els cultius en fase exponencial, la resposta és immediata, mentre que els que estan en fase estacionària, presenten un retard que pot oscil·lar entre 2-4 hores, depenent de l'inductor i del sistema (178). Es per aquest motiu, que l'anàlisi de la inducció aconseguida pels aminoàcids es feia a les 5 hores després de l'addició.

Quant a la soca 3, la inducció de la lactaldehyd deshidrogenasa respòn al mateix model d'increment de síntesi enzimàtica durant el creixement en els mateixos medis inductors descrits per a la soca 1, llevat de la fucosa, car la soca 3 no pot créixer en aquesta font de carboni. La selecció del fenotip Prd⁺ comporta la pèrdua de la capacitat d'utilitzar fu-

cosa (32), però sembla que aquesta selecció no afecta en absolut a l'expressió de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa (69), hipòtesi que ha quedat confirmada al llarg d'aquest treball, mercès als resultats obtinguts en els estudis d'inducció i caracterització de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa produït per les soques 1 i 3.

La lactaldehyd deshidrogenasa és un enzim exclusivament aeròbic. No és sintetitzat durant els creixements anaeròbics en presència de fonts de carboni inductores en condicions aeròbiques (figura 29). En presència de fucosa i ramnosa, en anaeròbiosi, es detecten uns nivells d'activitat molt baixos, de l'ordre dels obtinguts en condicions de repressió catabòlica, o potser quelcom inferiors (taula 3).

Pel que sembla, l'expressió del gen de la lactaldehyd deshidrogenasa està sota el control d'un mecanisme que implica la participació d'un inductor, de manera que en presència d'aquest s'incrementa la transcripció gènica. Per contre, la transcripció està disminuïda en absència d'inductor, i en presència de glucosa. Hi ha dos tipus de control de l'expressió gènica : el control de tipus positiu i el control negatiu. En tot cas, és necessària la presència d'un inductor, que en el cas del control negatiu s'uniria a la proteïna repressora, la qual perderia afinitat per a la zona operadora, afavorint així, la transcripció del gen. En el cas d'un control positiu, l'inductor afavoriria la síntesi d'una proteïna activadora, la qual facilitaria la transcripció. Com es comentarà més endavant, és probable, que el control que afecta l'expressió del

gen de la lactaldehyd deshidrogenasa sigui del tipus positiu. Els resultats que ens han portat a formular aquesta hipòtesi són els obtinguts amb el mutant termosensible, la soca JA-104.

En el cas de la lactaldehyd deshidrogenasa, s'havia ja indicat la possibilitat que l'inductor de la seva expressió fós el propi lactaldehyd (69,104), donat que l'enzim és induït pel metabolisme de la fucosa i la ramnosa, així com per propandiol, i tots ells comporten la formació de l'esmentat aldehyd. Ara bé, resultats presentats en aquest treball indiquen que l'enzim és també induït pel metabolisme del glutamat, i a més, l'enzim purificat presenta activitat sobre altres aldehyds, motius pels quals no es descarta la possibilitat de que l'enzim sigui induït per altres aldehyds. I més, tenint en comte l'existència d'inductors "gratuïts" que comporten un increment en la producció enzimàtica sense ésser substrats de l'enzim en qüestió, com és el cas del tiometil- β -galactòsid per a la β -galactosidasa.

Els estudis d'inducció per aldehyds es van abordar en un principi amb l'ús del glicolaldehyd i metilglioal, que s'adicionaven al medi de cultiu en fase exponencial, a fi d'obtenir una resposta més ràpida. Malgrat haver provat diferents concentracions de tots dos aldehyds (entre 10 i 30 mM), així com diferents temps d'incubació en presència d'aquests, no s'observà inducció en cap cas. Potser aquests aldehyds no són inductors de l'expressió de la lactaldehyd deshidrogenasa, ja que l'enzim presenta una K_m molt alta pel metilglioal i l'oxidació del glicolaldehyd "in vivo" en el metabolisme de l'etilen-

glicol, requereix nivells d'activitat enzimàtica tres vegades superiors als presentats per la soca salvatge (veure més endavant). Una altra possibilitat és que donada l'elevada toxicitat d'aquests compostos, aquest mètode d'estudi no sigui l'adient. L'entrada dels aldehids dins la cèl.lula podria estar impedida. Està descrit que els bacteris no poden créixer utilitzant aldehids en medis de cultiu convencionals, líquids o sòlids (150). Endemés, els aldehids són molt reactius i s'oxiden fàcilment en presència d'oxigen. Després de 2 hores d'incubació amb metilglixal o glicolaldehid el cultiu esdevenia groc.

Aquest estudi directe d'inducció no es va fer usant L-lactaldehid, ja que es requeria una gran quantitat d'aldehid per a afegir a cultius de volum considerable. La síntesi d'aquest aldehid donava aproximadament uns 40 ml d'una solució 50 mM.

Per tant, es decidí d'abordar l'estudi del possible paper fisiològic del L-lactaldehid com a inductor de la lactaldehid deshidrogenasa de manera indirecte, formant el L-lactaldehid "in situ". En aquest sentit, fou útil la soca ET 6016. Aquest mutant d'E.coli metabolitza la ramnosa només fins a ramnulo-sa-1-fosfat, la qual no pot ésser transformada per l'aldolasa respectiva, s'acumula dins la cèl.lula i l'intoxica. Per tant, aquesta soca no produeix lactaldehid a partir de la ramnosa, però sí tots els metabòlits anteriors. De l'anàlisi comparativa de la inducció provocada per l'addició de ramnosa a cultius de la soca tipus salvatge i de la soca ET 6016, es deduí que

el L-lactaldehid és un inductor de la lactaldehyd deshidrogenasa en condicions aeròbiques. Cap dels metabòlits de la ramnosa, anteriors al lactaldehyd, va provocar inducció en la soca ET 6016, mentre que el nivell d'inducció assolit en la soca 1 era de 300 mU/mg (figura 30).

Pel que fa a l'estudi de l'inductor, quedava per resoldre una qüestió : quin paper juga l'anaeròbiosi en la inducció de la lactaldehyd deshidrogenasa ? Els metabolismes anaeròbics de fucosa i ramnosa en E.coli produeixen també L-lactaldehyd, però en aquestes condicions l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa no és sintetitzat. Els resultats obtinguts amb la soca propandiol òxido-reductasa negativa, la soca JA-105, indiquen que l'acumulació de L-lactaldehyd dins la cèl.lula, en condicions anaeròbiques no és capaç d'induir l'expressió de la lactaldehyd deshidrogenasa (figura 31). Si bé s'observa un increment d'unes quatre vegades en el nivell d'activitat enzimàtica (de 10 a 40 mU/mg), cal resaltar que aquests valors es troben un ordre de magnitud per sota als descrits en condicions aeròbiques.

Aquests estudis indiquen que el L-lactaldehyd és l'inductor de l'expressió del gen de la lactaldehyd deshidrogenasa, si bé la presència d'oxigen juga un paper important a l'hora d'aconseguir una inducció completa.

No es rebutja la possibilitat que d'altres aldehids puguin actuar també com a inductors.

Encara que s'ha intentat diverses vegades, i s'han provat diferents mutàgens, no ha estat possible aïllar mutants deficients en l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa a partir de la soca salvatge. Les raons poden estar basades en dos fets : 1) el fosfat de dihidroxiacetona format conjuntament amb el lactaldehyd a partir de ramnosa pot ésser metabolitzat normalment. Aleshores, el fenotip resultant no seria una incapacitat de créixer en ramnosa (o fucosa), sinò més bé, un creixement més lent i a meitat de rendiment; o bé 2) el L-lactaldehyd acumulat dins la cèl.lula podria tenir un efecte tòxic, impeding el creixement cel.lular, de manera semblant al que succeeix amb l'acumulació de sucres fosfat (125).

En tot cas, si ha estat possible l'obtenció de mutants deficients en lactaldehyd deshidrogenasa a partir de la soca 3. Aquesta soca és propandiol òxido-reductasa constitutiva i donat que aquest enzim és capaç de catabolitzar la reacció reversiblement, el L-lactaldehyd format a partir de la ramnosa pot ésser eliminat al medi en forma de propandiol, de manera semblant a la fermentació anaeròbica de la fucosa i ramnosa en la soca salvatge. Efectivament, això és el que succeeix en la soca 40 quan créix aeròbicament en ramnosa, aprofitant només la meitat dels àtoms de carboni, corresponents al fosfat de dihidroxiacetona, alhora que es detecta la presència de propandiol (a la concentració de 10 mM) en el medi de cultiu (veure 2.5.1.5.1).

La soca 40 fou obtinguda per Sridhara i Wu, a partir de la soca 3, i seleccionada per la seva incapacitat de créixer en propandiol, com a conseqüència d'una absència absoluta d'ac-

tivitat lactaldehyd deshidrogenasa. Aquests autors no van caracteritzar el tipus de mutació que s'havia produït. L'ús de les preparacions d'anticossos anti-lactaldehyd deshidrogenasa ens ha permès establir que la mutació produïda ha afectat la síntesi de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa (figura 32) a nivell de la zona operadora-promotora, o bé a nivell del gen regulador, de manera que la transcripció del gen estructural està bloquejada, fins i tot, en presència d'inductor.

Una altra de les fites proposades en la realització d'aquest treball, fou l'obtenció d'un mutant termosensible de la lactaldehyd deshidrogenasa. Els mutants termosensibles són molt útils en la localització i comparació de gens dins el cromosoma bacterià. Donada la participació de la lactaldehyd deshidrogenasa en diversos metabolismes, es va creure d'interès, determinar l'existència d'un o més gens estructurals d'aquest enzim, així com la seva localització mitjançant proves de transducció usant el mutant termosensible.

L'obtenció d'aquest mutant es va fer a partir de la soca 3, a través d'una estratègia bastant llarga, que implicava varies etapes, a fi d'aconseguir un mètode de selecció positiu del mutant termosensible per a la utilització del propan diol, amb els avantatges que això comporta.

La selecció positiva ha estat possible mercès a la introducció de la mutació ppc a la soca de partida. Aquesta mutació, afecta el gen de la fosfoenolpiruvat carboxilasa, de manera que el mutants corresponents s'intoxiquen en presència de fonts de carboni quin metabolisme condueix a la formació de piruvat,

a menys que es suplementin amb intermediaris del cicle de Krebs. La introducció d'aquesta mutació en la soca 3 es va fer per dues transduccions consecutives, aprofitant la proximitat dels gens argH i ppc. La selecció del mutant ppc (soca JA-103) es feu seguint el criteri d'intoxicació ja esmentat.

A partir del mutant JA-103, l'obtenció de la soca termosensible va ésser per mutació espontània i la selecció en plaques de propandiol + acetat a 42°C. En aquest medi, només creixien els mutants afectats en algun dels enzims de la via del propandiol, car no utilitzaven aquest compost. El creixement era degut a la metabolització de l'acetat. Les soques capaces d'utilitzar propandiol, s'intoxicaven donada la formació de piruvat en el decurs del metabolisme d'aquest glicol. Es seleccionà un clò, la soca JA-104 pel seu millor creixement en plaques de propandiol + aspartat a 30°C.

La caracterització enzimàtica d'aquest mutant evidencià que la termosensibilitat havia afectat l'enzim lactaldehydeshidrogenasa, mentre que l'altre enzim implicat en el metabolisme del propandiol, la propandiol òxido-reductasa, presentava nivells normals. A l'igual que la soca 40, el creixement de la soca JA-104 aeròbicament en ramnosa, a 42°C, té lloc només fins a la meitat de rendiment.

D'acord amb els resultats obtinguts de la inactivació tèrmica "in vitro", no sembla existir diferències estructurals entre els enzims lactaldehydeshidrogenasa de les soques 3 i JA-104 (figura 33), indicant que la mutació, que condueix a la termosensibilitat, no afecta l'estructura de l'enzim, el

que seria d'esperaren un mutant termosensible del gen estructural. L'absència d'immunoprecipitat en els extractes cel·lulars de la soca JA-104 feta créixer en hidrolitzat de caseïna a 42°C indica que a la temperatura restrictiva no es sintetitza enzim. La termosensibilitat ha afectat la síntesi de la lactaldehyd deshidrogenasa, molt probablement a nivell de gen regulador. Aquesta manca de producció enzimàtica a la temperatura restrictiva és diagnòstic d'un possible control positiu de l'expressió de la lactaldehyd deshidrogenasa. Així, la proteïna activadora, a 42°C no és funcional i per tant no hi ha transcripció gènica. Si el control fós negatiu, el repressor no s'uniria a l'operador a 42°C i com a conseqüència, la mutació termosensible comportaria la síntesi constitutiva de l'enzim a aquesta temperatura, a menys que la termosensibilitat hagués afectat la unió del repressor amb l'inductor. Encara que creiem que aquesta darrera hipòtesi és poc probable, donat que la mutació hauria afectat l'unió amb qualsevol dels inductors (lactaldehyd i l'inductor format en el metabolisme del glutamat).

En tot cas, la soca JA-104, no és un mutant termosensible del gen estructural. Nous intents d'obtenció de mutants amb aquestes característiques no van donar el resultat esperat : o bé la mutació afectava un altre gen, o bé eren mutants que havien perdut la mutació del gen ppc.

De tota manera, la soca JA-104 fou utilitzada per a localitzar la mutació termosensible a través d'una transducció amb el fag P1 sobre la soca 1. Els resultats obtinguts en aquesta transducció situen la mutació termosensible que afecta la lac-

taldehid deshidrogenasa propera al locus fuc (taula 11), ja que l'adquisició del caracter termosensible i la pèrdua de la capacitat d'utilitzar fucosa co-transdueixen en un 63%. Per una altra part, l'elevada freqüència de co-transducció entre els caracters Fuc^- i Prd (83%) situaria el locus de la mutació termosensible més pròxim al locus d'utilització del propandiol que de fucosa. La similitud dels percentatges de transductants amb el fenotip donador-receptor (DR a la taula 11) indica una equidistància entre els loci fuc i LALDH^{ts}, a la vegada que tots dos gens no es troben al mateix costat del marcador seleccionat (Prd). Estan situats un a cada costat. Si no fós així, el percentatge d'un dels fenotips (DR o RD) seria practicament nul. L'ordre $Fuc-Prd-LALDH^{ts}$ ve confirmat també, per què el percentatge de co-transducció $Prd-LALDH^{ts}$ és superior al de Fuc^-LALDH^{ts} (figura 35).

El grup d'investigació del Professor E.C.C. Lin treballant en l'organització i regulació de l'operó de la fucosa, disposen de dades, encara preliminars, que indicarien que el gen estructural de la lactaldehid deshidrogenasa estaria fora fins i tot lluny, del sistema fuc (comunicació personal). Si això és cert, la mutació termosensible de la soca JA-104 localitzada a prop o lligada a l'operó fuc i al locus d'utilització de propandiol (Prd), hauria afectat a l'únic gen regulador. L'existència d'un únic gen regulador ve donada per la manca de síntesi enzimàtica, observada en la soca JA-104 quan créix aeròbicament en ramnosa o en hidrolitzat de caseïna

tot indicant que aquests sistemes, el de la ramnosa i el del glutamat, no disposen de gens reguladors de la lactaldehyd deshidrogenasa associats a la seva estructura genètica.

Reconstruint aquestes hipòtesis, resultaria que el gen estructural de la lactaldehyd deshidrogenasa seria independent, i estaria deslligat dels sistemes genètics que codifiquen pels enzims de les vies metabòliques on participa la lactaldehyd deshidrogenasa. El gen regulador estaria pròxim al locus fuc i seria l'únic implicat en la regulació de l'expressió del gen de la lactaldehyd deshidrogenasa, independentment del metabolisme que aportés l'inductor.

És curiós el fet que tots els mutants que s'han analitzat al llarg d'aquest treball, són mutants de la lactaldehyd deshidrogenasa afectats en la seva síntesi, o bé per deficiència (com és el cas de la soca 40 i de la soca JA-104 a 42°C), o bé per superproducció (com la soca JA-102, la qual ja ha estat comentada a l'apartat 4.3).

Ja s'ha esmentat anteriorment que la regulació de la lactaldehyd deshidrogenasa a nivell transcripcional ve condicionada per la presència d'oxigen i d'inductor. A fi d'establir si aquest enzim estava sotmes, també, a un control de tipus post-transcripcional en funció de les condicions del medi, de manera que fós regulat per inactivació en aquelles condicions en les quals no fós necessària la seva participació en el metabolisme, es van dur a terme estudis realitzats a dos nivells: a) "in vivo", dins la cèl.lula, modificant les condicions de creixement; i b) "in vitro" utilitzant preparacions d'enzim pu-

rificat i analitzant l'efecte de possibles efectors.

Es creia en un principi que en els microorganismes, els mecanismes de regulació de les activitats enzimàtiques eren bàsicament de dos tipus : regulació de la síntesi enzimàtica i regulació per la unió no covalent d'efectors a l'enzim. Encara que, últimament s'ha descrit un altre tipus de control per inactivació selectiva, que comporta un canvi físic en l'estructura de l'enzim, o bé una modificació química que implica una unió covalent, o bé mecanismes encara desconeguts, de manera que en funció de les condicions externes, els microorganismes adapten l'activitat de determinats enzims segons les seves necessitats (160).

Estudis d'aquest tipus s'han fet en aquest treball a fi d'analitzar possibles modificacions en l'activitat o en l'estructura de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa pel canvi en la disponibilitat d'oxigen del cultiu (apartat 3.5.2.1). La transferència de cèl.lules de la soca 1, induïdes pel creixement aeròbic en ramnosa, a medis anaeròbics en presència d'una font de carboni (ramnosa o fucosa) no comportava cap inactivació de l'enzim, ni tampoc cap tipus de degradació (mesurada immunològicament). El mateix resultat s'obtingué en la transferència a medis anaeròbics en presència de ramnosa deficientes en l'aport de sofre i nitrògen necessaris per a la síntesi de proteïnes.

Si bé, la lactaldehyd deshidrogenasa és regulada a nivell transcripcional en funció de les condicions d'oxigenació del cultiu, l'anaeròbiosi no comporta cap inactivació selectiva

ni degradació de l'enzim ja sintetitzat, sempre i quan, el metabolisme cel.lular funcioni plenament. Des d'aquest punt de vista, en aquestes condicions, l'enzim no és regulat a nivell post-transcripcional per mecanismes d'inactivació selectiva (160) ni per recanvi ràpid.

Quan s'observa una inactivació ràpida de l'enzim és en les transferències de cèl.lules induïdes a medis privats de font de carboni, ja sigui aeròbicament o en anaeròbiosi, tot indicant que quan s'atura el metabolisme cel.lular, l'enzim és inactivat, si bé, el mecanisme implicat és desconegut. El que si és cert, és que la inactivació observada no és conseqüència d'una degradació enzimàtica, ja que la quantificació immunològica de l'enzim present en aquestes condicions reflecteix una estabilitat total. De la mateixa manera, la propanediol òxido-reductasa és inactivada, però no degradada, quan cèl.lules d'E.coli fetes créixer anaeròbicament en fucosa són transferides a medis privats de font de carboni, o bé quan s'atura el metabolisme mitjançant inhibidors metabòlics. Per contra, la transferència a medis aeròbics en presència de nutrients no comporta la inactivació d'aquest enzim (66).

Hi ha descrits diversos enzims de bacteris que són inactivats per la privació de fonts de carboni, com és el cas de l'aspartoquinasa de Bacillus licheniformis (160), encara que aquest mecanisme s'ha detectat en el contexte de formació d'endospores.

Tornant a la lactaldehid deshidrogenasa, cal esmentar que es desconeix quin és el mecanisme responsable de la inac-

tivació d'aquest enzim en condicions deficitàries de nutrients. El que si és evident, és que aquesta inactivació no està associada al canvi en les disponibilitats d'oxigen del cultiu, cosa que seria, potser, d'esperar en el control d'un enzim eminentment aeròbic.

Per a l'estudi de l'estabilitat de l'enzim lactaldehydeshidrogenasa s'escollí un medi aeròbic deficitari en nutrients ja que està descrit que aquestes condicions afavoreixen la degradació selectiva de proteïnes que són normalment estables (58) (com és el cas de la lactaldehydeshidrogenasa).

L'estudi es portà a terme fins a 24 hores, en absència de font de carboni. No es perllongà més el temps, donat que a partir de 24 hores, el 75% de les cèl.lules d'un cultiu d'E.coli privat de nutrients perden viabilitat (58). Els resultats indiquen que l'enzim no és degradat en absolut, ni en aquestes condicions extremes. Això succeeix a la majoria de proteïnes d'E.coli. Està descrit que el 70% d'aquestes no són degradades, fins i tot durant períodes llargs de carència de nutrients. Aquesta estabilitat de les proteïnes bacterianes és un fet totalment oposat al descrit per a les proteïnes d'eucariotes, les quals estan sotmeses a recanvis molt ràpids, éssent aquest un mecanisme de regulació de l'activitat enzimàtica (9,108).

Es podria pensar que la detecció immunològica emprada en aquest treball fós artefactual, de manera que encara que la proteïna fós degradada, alguns dels pèptids resultants podrien tenir els determinants antigènics i reaccionar, per tant, amb els anticossos. Però encara així, cada pèptid presentaria el

seu punt d'equivalència amb l'anticòs, de manera que molt probablement, en la immunoelectroforesi es detectarien diversos arcs de precipitació (cada un originat per un pèptid diferent), i quina composició es modificaria al llarg del temps (en 24 hores). Aquest no és el resultat obtingut (figura 37).

Per una altra part, sembla existir una estreta relació entre l'estabilitat d'una proteïna "in vivo" i l'estabilitat "in vitro" envers l'acció de proteases (9). En aquest sentit, cal esmentar que l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa és molt estable a la degradació per proteases, donat que en el procés de purificació no s'ha detectat mai l'aparició de productes de proteòlisi, fins i tot, sense pendre les mesures adients (presència d'inhibidors de proteases a les solucions amortidores).

L'altre tipus d'estudis portats a terme per a esbrinar l'existència de possibles mecanismes de modulació de l'activitat de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa un cop sintetitzat, es van realitzar "in vitro" emprant preparacions purificades, i analitzant l'efecte dels substrats i productes de la reacció catalitzada per l'enzim. Els resultats indiquen que el NAD^+ , cosubstrat de la reacció, no té cap efecte inhibitori sobre l'activitat, mentre que els substrats (L-lactaldehyd, L-glicer-aldehyd i glicolaldehyd) provoquen una inhibició a concentracions relativament baixes, sobretot, el L-lactaldehyd. Ja s'ha comentat al capítol referent a consideracions generals sobre les aldehyd deshidrogenases que l'esmentat efecte inhibitori és freqüent dins aquest grup d'enzims.

Quant els productes, l'efecte més interessant el presenta el cofactor reduït, el NADH. Concentracions de NADH de l'ordre de 0,4 mM, presents al sistema d'assaig, provoquen una inhibició enzimàtica del 50%, per a una quantitat d'enzim homogeni de 2 mM i en presència de concentracions saturants de NAD^+ (2,5 mM). La inhibició total per a aquestes condicions fixades s'aconseguia a una concentració de NADH de l'ordre de 1 mM. En tot cas "in vivo", si la concentració de NAD^+ esdevingués limitant, encara afavoriria l'efecte inhibitori del NADH, el qual tindria lloc, probablement, a concentracions més baixes de les presentades "in vitro".

En canvi, l'àcid producte de la reacció catalitzada usant glicolaldehid com a substrat, el glicolat, tenia un efecte inhibitori a concentracions superiors a 30 mM. Aquest efecte no es pot considerar fisiològic, donat l'elevat valor d'aquesta concentració i tenint en compte que el substrat, el glicolaldehid, s'utilitza a l'assaig a 1 mM.

El resultat referent als valors d'inhibició per NADH podria ésser indicatiu d'un possible efecte regulador per part d'aquest nucleòtid. Així, hi ha descrits diversos enzims regulables per nucleotids de l'adenina, els quals actuen com a efectors alostèrics. La fosfoenolpiruvat carboxiquinasa d'E. coli és inhibida alostèricament per NADH. Aquest efecte és important en la regulació d'aquest enzim donat que no és necessari en el creixement en glucosa i en aquestes condicions de cultiu, els nivells de NADH "in vivo" són superiors respecte d'altres cultius com per exemple el de succinat (181).

Un altre enzim regulat per nucleòtids a E.coli és la malat deshidrogenasa (140,141). Sanwal postula la necessitat de l'existència d'aquests controls d'activitats enzimàtiques en sistemes bacterians, donada l'absència de compartimentacions dins la cèl.lula bacteriana, a diferència del que es dona a cèl.lules eucariotes. Aquests mecanismes serien necessaris per a coordinar la direcció de metabòlits, especialment en punts en els que diversos enzims competeixen per un mateix substrat, per exemple l'oxalacetat (141).

Està descrit que el canvi de condicions aeròbiques a anaeròbiques en un cultiu d'E.coli comporta un increment ràpid en els nivells de NADH, que presenta un màxim als 50 minuts i després retorna paulatinament a nivells més baixos. El canvi més dràstic és el sofert pel NAD^+ , quins nivells anaeròbics són molt més baixos que els aeròbics (176).

Donat que el NADH té un efecte inhibidor "in vitro" a concentracions que es podrien considerar fisiològiques, (donat que "in vivo" les concentracions de cofactor i substrat no són sempre saturants), el canvi de condicions del cultiu d'aeròbiosi a anaeròbiosi podria implicar una inhibició de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa, el qual és eminentment aeròbic.

Cal esmentar que aquesta modulació per NADH, postulada pel canvi a condicions anaeròbiques, no ha estat detectada en els estudis "in vivo" realitzats a través de transferències de cèl.lules induïdes aeròbicament a diferents medis anaeròbics, atès que les concentracions de NAD^+ i NADH varien molt

ràpidament per manipulació de les cèl.lules, fins i tot, en els processos de centrifugació realitzats per tal de recollir les cèl.lules del cultiu i obtenir els corresponents extractes crus. En aquesta etapa es dona, a més, un efecte de dilució, al resuspendre les cèl.lules amb solució amortidora. Per tant, és molt difícil reproduir les condicions fisiològiques, que tenen lloc dins les cèl.lules, en un extracte cru.

Donat que el L-lactaldehid és el punt de partida d'una bifurcació metabòlica en el catabolisme de la fucosa i la ramnosa, segons les condicions d'oxigenació del cultiu, la diferent eficiència catalítica dels enzims que transformen el lactaldehid podria ésser un punt important en la regulació de l'esmentada bifurcació. Així, durant el metabolisme anaeròbic de la fucosa i la ramnosa s'indueix l'enzim propandiol òxido-reductasa que redueix el lactaldehid a propandiol, amb una eficiència catalítica ($V_{max} \text{ (U/mg)} / K_m \text{ (mM)}$) de 530 (dades obtingudes de Boronat, Tesi doctoral (12)). Mentre que l'eficiència catalítica per a aquest substrat, que presenta l'enzim aeròbic, la lactaldehid deshidrogenasa, és menor i de l'ordre de 190. D'aquesta manera, en un canvi a condicions anaeròbiques en fucosa, la propandiol òxido-reductasa activada d'immediat per un control post-transcripcional en aquestes condicions, canviaria el sentit de la via degradativa d'aquest sucre, reduint el L-lactaldehid a propandiol, encara que l'enzim lactaldehid deshidrogenasa hi estigui present, donat que el primer enzim és més eficient per a la transformació del L-lactal-

dehid.

En el cas de la ramnosa, el canvi a anaeròbiosi requereix un temps d'inducció d'unes 8 hores per a sintetitzar l'enzim propandiol òxido-reductasa. Durant aquest temps no es detecta creixement, tot indicant que el lactaldehid no és metabolitzat a través de la lactaldehid deshidrogenasa, que encara està present. Així, l'activitat de la lactaldehid deshidrogenasa estaria modulada per un mecanisme relacionat amb l'anaeròbiosi. En aquest sentit, l'efecte inhibitori del NADH podria jugar un paper important, així com la devaluació en els nivells de NAD^+ , que esdevindria un factor limitant de la reacció catalitzada per la lactaldehid deshidrogenasa.

No tan clara resulta l'adaptació a condicions aeròbiques d'un cultiu que ha estat prèviament en anaeròbiosi, ja que en aquest cas, només podríem comptar amb els canvis en les concentracions relatives de cofactor oxidat i reduït per a explicar la desviació de la via reductora a l'oxidativa en el metabolisme del L-lactaldehid. Això seria així, donat que la inducció de la lactaldehid deshidrogenasa en aeròbiosi no és concomitant amb una inactivació de la propandiol òxido-reductasa, enzim que com hem dit, és més eficient sobre el L-lactaldehid.

4.6. IMPLICACIONS DE LA PRESENCIA D'UN ENZIM AMB ACTIVITAT LACTALDEHID DESHIDROGENASA EN DIFERENTS ENTEROBACTERIACEAE EN RELACIÓ AMB EL METABOLISME DE RAMNOSA.

La implicació directa de la lactaldehyd deshidrogenasa en el metabolisme de la fucosa en E.coli fou descrita ja per Lin i col. Donat que la via catabòlica de la ramnosa, en aquest microorganisme, convergeix amb la de la fucosa en la formació de fosfat de dihidroxiacetona i L-lactaldehyd, era lògic pensar que la lactaldehyd deshidrogenasa intervin-dria, també, en el metabolisme de la ramnosa.

En aquest treball, l'anàlisi de l'activitat lactaldehyd deshidrogenasa en els extractes cel.lulars de la soca i feta créixer en tots dos sucres, així com la detecció immunològica de l'enzim sintetitzat en aquestes condicions de creixement confirmen la participació de la lactaldehyd deshidrogenasa en el metabolisme aeròbic d'ambdós sucres.

En algunes espècies de Klebsiella i de Salmonella, estan descrits els sistemes de la fucosa i de la ramnosa i, fins i tot, en K.aerogenes es coneixen els enzims de la via principal del metabolisme aeròbic de la fucosa (153), i en S.typhimurium els de la ramnosa (1). Aquests conjunts d'enzims comprenen, a l'igual que en E.coli, una isomerasa, una quinasa i una aldolasa, específiques per a cada sucre. Donat que no hi ha cap descripció del metabolisme posterior dels productes de la reacció catalitzada per l'aldolasa respecti-

va , ni en Klebsiella sp, ni en Salmonella sp, es cregué interessant veure si aquestes espècies també posseïen l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa, que possibilitaria l'oxidació de l'intermedi L-lactaldehyd, i en cas d'existir, estudiar la similitud immunològica amb l'enzim d'E.coli.

Amb aquesta finalitat es van fer créixer les soques de K.pneumoniae ATCC nº 13882 i S.typhimurium ATCC nº e23564 aeròbicament en ramnosa.

En el cas de K.pneumoniae, en els extractes cel.lulars es detectà una activitat lactaldehyd deshidrogenasa (mesurada tant sobre lactaldehyd com sobre glicolaldehyd), quins nivells eren més baixos que els trobats en la soca 1, potser per diferències cinètiques o de comportament dels enzims envers efectors. De fet, les concentracions òptimes de substrat i de cofactor eren diferents pels enzims d'ambdues espècies (veure 3.9). Potser no s'estava mesurant l'activitat enzimàtica de K.pneumoniae en les condicions òptimes de pH i activadors, però pel que fa a aquest treball, els valors presentats poden considerar-se representatius.

La presència d'una proteïna serològicament relacionada amb la lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli fou evidenciada mitjançant anticossos específics, obtinguts amb l'enzim d'E.coli, en plaques de doble difusió (mètode d'Ouchterlony). Els extractes cel.lulars de K.pneumoniae mostraven una proteïna amb identitat immunològica parcial amb la d'E.coli (apareixia l'esperó indicatiu d'aquest tipus de reacció immunològica), manifestant, per tant, diferències estructurals entre

aquests enzims. La immunoelectroforesi dels extractes crus de K.pneumoniae donava arcs de precipitació més febles i una mica més alts que els corresponents d'E.coli, a igualtat de proteïna aplicada, la qual cosa concorda amb les característiques de les reaccions immunològiques que tenen lloc amb antigens heteròlegs (98).

L'evidència que la proteïna present als extractes de K.pneumoniae detectada immunològicament era l'enzim amb activitat lactaldehyd deshidrogenasa s'obtingué per immunoprecipitació en medi líquid. L'activitat enzimàtica era precipitada amb els anticossos anti-lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli.

Així, a K.pneumoniae hi ha un enzim capaç d'oxidar el L-lactaldehyd format en el metabolisme de la ramnosa en condicions aeròbiques, a l'igual que a E.coli, si bé els enzims d'ambdues soques són estructuralment i cinèticament diferents.

Un cas totalment diferent és el de S.typhimurium. En els extractes cel·lulars d'aquesta soca, feta créixer aeròbicament en ramnosa, no es detectà cap activitat lactaldehyd deshidrogenasa, malgrat haver provat condicions d'assaig diferents, modificant el pH del medi, així com les concentracions de cofactor i substrat.

Paral·lelament, en la immunodifusió emprant anticossos anti-lactaldehyd deshidrogenasa d'E.coli no aparegué cap reacció d'immunoprecipitació, fins i tot, després de bastants dies, malgrat provar diferents concentracions d'extracte cru de S.typhimurium i tintar les plaques d'Ouchterlony amb Blau Brillant de

Coomassie.

Aquests resultats indicarien l'absència d'enzim lactaldehyd deshidrogenasa a S.typhimurium, al menys d'un enzim immunològicament semblant al d'E.coli. Donada la similitud entre ambdues espècies bacterianes, caldria esperar que sí S.typhimurium sintetitzés un enzim del tipus lactaldehyd deshidrogenasa, aquest presentaria possiblement identitat immunològica parcial amb l'enzim d'E.coli, com succeeix amb el de K.pneumoniae.

L'absència total d'activitat enzimàtica, tant sobre lactaldehyd, com sobre glicolaldehyd, en condicions d'assaig molt diferents, és un fet molt important a tenir en compte. Es difícil pensar que a S.typhimurium no hi ha cap enzim del tipus aldehyd deshidrogenasa, capaç d'oxidar una àmplia gamma d'aldehyds, quan aquests enzims estan àmpliament distribuïts a la natura i es postula que podrien ésser sistemes de desintoxicació cel.lular per a eliminar els aldehyds acumulats en aquests organismes (83).

Aquesta manca d'enzim amb activitat lactaldehyd deshidrogenasa té implicacions directes en el metabolisme aeròbic de la ramnosa en aquest microorganisme. El L-lactaldehyd format per acció de l'aldolasa no pot ésser oxidat a lactat, a diferència del que succeeix a E.coli i K.pneumoniae.

Es planteja la qüestió de sí el L-lactaldehyd s'acumula durant el metabolisme aeròbic de ramnosa a S.typhimurium, o bé hi ha algun altre mecanisme de transformació d'aquest aldehyd. En relació amb aquesta qüestió hi ha diverses dades in-

teressants d'esmentar :

1) Quan S.typhimurium creix aeròbicament en ramnosa, el rendiment final del cultiu és la meitat de l'assolit per E.coli, tot indicant que només es metabolitzen la meitat dels àtoms de carboni de la ramnosa.

2) En aquestes condicions de creixement, es detecta l'excreció de 1,2-propandiol al medi de cultiu (resultat obtingut per N.Obradors), de manera semblant al que succeeix en la fermentació de ramnosa en E.coli. Aquest resultat està molt lligat amb l'existència de propandiol òxido-reductasa en els extractes cel.lulars d'aquesta soca quan creix aeròbicament en ramnosa i també en fucosa (veure 1.4) (133). Si bé els autors descrivien que la propandiol òxido-reductasa present aeròbicament és inactiva i és activada pel canvi a condicions anaeròbiques, la seva presència en aeròbiosi està relacionada, molt probablement, amb l'excreció de propandiol al medi, actuant així com a un mecanisme de desintoxicació cel.lular, eliminant el L-lactaldehid. D'aquesta manera, S.typhimurium perd els àtoms de carboni provinents del lactaldehid, i utilitza només, els corresponents al fosfat de dihidroxiacetona, i per tant, el rendiment final del cultiu és la meitat de l'esperat.

Des d'un punt de vista evolutiu i dins el contexte del metabolisme de la ramnosa i la fucosa, la manca d'activitat lactaldehid deshidrogenasa comporta la inducció d'un enzim eminentment anaeròbic, la propandiol òxido-reductasa.

3) ha estat impossible, malgrat haver provat diferents

5. CONCLUSIONS

tipus de mutàgens, obtenir mutants a partir de S.typhimurium capaços de créixer en 1,2-propandiol com a única font de carboni i energia (seria el pas d'obtenció de la soca 3 a partir de la soca tipus salvatge d'E.coli) (resultat obtingut per J.Badia). En el seu moment, no hi havia explicació per a aquest resultat negatiu, si bé, ara es podria pensar que la manca d'un enzim amb activitat lactaldehyd deshidrogenasa és el punt clau d'aquesta incapacitat, ja que la propandiol òxido-reductasa present a S.typhimurium transformaria el 1,2-propandiol en L-lactaldehyd, el qual no podria ésser metabolitzat per oxidació a lactat.

Els estudis realitzats en aquest treball amb S.typhimurium s'han fet amb la soca de l'ATCC nº e23564. Es podria pensar que la manca d'activitat aldehyd deshidrogenasa fós un fet particular d'aquesta soca i no generalitzat dins l'espècie. Però els estudis d'excreció de 1,2-propandiol durant el creixement aeròbic en ramnosa, així com els intents d'obtenció de mutants propandiol positius, s'han fet en altres soques de Salmonella typhimurium, i els resultats obtinguts confirmen l'esmentada absència.

- * Es proposa un mètode de purificació de l'enzim lactaldehydeshidrogenasa d'E.coli que proporciona preparacions altament homogènies segons criteris electroforètics en presència de SDS i per electroenfoc.
- * La lactaldehydeshidrogenasa és un enzim oligomèric, de pes molecular 220.000 daltons, format per quatre subunitats aparentment idèntiques, de 55.000 daltons. Presenta un punt isoelèctric de 4,6 i és capaç d'incorporar 4 mols de NAD⁺ / mol de proteïna enzimàtica.
- * L'enzim catalitza una reacció irreversible, presentant un pH òptim d'activitat al voltant de 9,5, en solució amortidora de pH glicina-NaOH, i un valor d'energia d'activació per a l'oxidació del L-lactaldehyd de 8,65 Kcal/mol.
- * Els ions divalents Zn²⁺ i Cu²⁺ provoquen una forta inhibició de l'activitat lactaldehydeshidrogenasa, la qual és previnguda per la presència d'EDTA als amortidors.
- * La inhibició provocada pel p-hidroximercuribenzoat, típica d'aldehydeshidrogenases, és indicativa de la importància de determinats grups -SH per a l'activitat enzimàtica.
- * L'enzim lactaldehydeshidrogenasa és actiu sobre α -hidroxialdehyds : L-lactaldehyd (Km : $4,2 \cdot 10^{-5}$ M), L-gliceraldehyd

* ($K_m : 1,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) i glicolaldehid ($K_m : 3,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), i també sobre α -cetoaldehids, com el metilglixal ($K_m : 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$).

Utilitza com a cofactor preferentment el NAD^+ pel qui presenta els següents valors de $K_m : 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (assaigat sobre L-lactaldehid) i $2,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (sobre glicolaldehid), encara que pot usar NADP^+ però amb menor eficiència.

* El càlcul de l'eficiència catalítica o potencial cinètic (V_{\max}/K_m) de la lactaldehid deshidrogenasa envers aquests substrats indica que el L-lactaldehid és probablement el substrat fisiològic de l'enzim.

* La lactaldehid deshidrogenasa és un enzim de fase exponencial, aeròbic i semi-constitutiu. Presenta nivells basals d'activitat en medis com glicerol i succinat. És induït pel creixement en L-fucosa i L-ramnosa, quin metabolisme condueix a la formació de L-lactaldehid. També és induït pel creixement en presència de glutamat, i en soques mutants d'E.coli, pel creixement en glicols com el propanediol i etilenglicol.

* La regulació transcripcional ve determinada per la presència d'oxigen i d'inductor, que és el pròpi L-lactaldehid, si bé no es rebutja la possibilitat de l'existència d'altres inductors amb estructura d'aldehid.

- * L'enzim està subjecte a repressió catabòlica per glucosa, a la vegada que s'observa un lleuger efecte de repressió de la inducció per la presència de glicerol al medi de cultiu.

- * Atès que l'enzim purificat és inhibït totalment per concentracions de NADH de l'ordre de 1 mM, a nivell post-transcripcional, les concentracions d'aquest cofactor reduït podrien tenir importància en la modulació de l'activitat de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa en les adaptacions a condicions anaeròbiques.
El recanvi de l'enzim no és un mecanisme important en la seva regulació.

- * La regulació de la bifurcació metabòlica a nivell d'oxidació o reducció del L-lactaldehyd podria estar fonamentada en la presència o absència i en la diferent eficiència catalítica dels dos enzims que actuen sobre aquest aldehyd, la propandiol òxido-reductasa i la lactaldehyd deshidrogenasa, així com en el balanç entre el cofactor oxidat i reduït.

- * L'activitat glicolaldehyd deshidrogenasa implicada en el metabolisme de l'etilenglicol, en la soca JA-102, és funció de l'enzim lactaldehyd deshidrogenasa. Es tenen evidències genètiques, estructurals i funcionals al respecte.

*La superproducció de lactaldehyd deshidrogenasa en la soca JA-102, que es manifesta en presència d'inductors diferents, provinents dels metabolismes del glutamat i de l'etilenglicol, suggereix l'existència d'un únic gen estructural.

L'anàlisi de la mutació termosensible de la soca JA-104 ha permès identificar l'existència d'un únic gen regulador, a prop de locus fuc.

La manca absoluta de síntesi enzimàtica, quan la soca JA-104 creix a la temperatura restrictiva, és diagnostic d'un probable control positiu de l'expressió gènica.

*L'existència de diferents inductors per a la lactaldehyd deshidrogenasa, per una banda, així com la utilització de diversos aldehids com a substrat en el metabolisme de diferents fonts de carboni, per l'altra, porten a considerar-la com a un possible enzim multifuncional.

*Els estudis genètics, estructurals i immunològics de la lactaldehyd deshidrogenasa produïda per diverses soques d'E.coli demostren l'existència d'una única forma enzimàtica, la qual es utilitzada conjuntament en el metabolisme de la L-fucosa, L-ramnosa, L-1,2-propandiol, etilenglicol i glutamat.

Es descarta l'existència de formes isoenzimàtiques.

- * La lactaldehyd deshidrogenasa presentada en aquest treball és un enzim amb identitat pròpia, no identificable amb altres enzims que presenten activitat aldehyd deshidrogenasa descrits i caracteritzats d'E.coli.
- * S'ha detectat la presència d'un enzim amb activitat lactaldehyd deshidrogenasa a K.pneumoniae durant el creixement aeròbic en ramnosa, el qual presenta identitat immunològica parcial amb l'enzim d'E.coli.
- Per contra, S.typhimurium no disposa d'un enzim d'aquest tipus, fet que comporta que la ramnosa sigui, només, metabolitzada en part per aquest microorganisme.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1.- AL-ZARBAN, S., L.HEFFERMAN, J.NISHITANI, L.RANSONE i G. WILCOX. (1984). Positive control of the L-rhamnose genetic system in Salmonella typhimurium LT2. J.Bacteriol. 158:603-608.
- 2.- AMES, G.F. (1974). Resolution of bacterial proteins by polyacrilamide gel electrophoresis on slabs. J.Biol.Chem. 249:634-644.
- 3.- ANDREWS, P. (1964). Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel-filtration. Biochem.J. 91:222-233.
- 4.- ANDREWS, P. (1965). The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem.J. 96:595-606.
- 5.- ARGILÉS, J.M. (1986). Has acetone a role in the conversion of fat to carbohydrate in mammals?. TIBS. 11:61-63.
- 6.- BACHMANN, B.J. (1972). Pedigrees of some mutants strains of Escherichia coli K-12. Bacteriol.Rev. 36:525-557.
- 7.- BACHMANN , B.J. (1983). Linkage map of Escherichia coli K-12. Edition 7. Microbiol.Rev. 47:180-230.
- 8.- BADIA, J., J.ROS i J.AGUILAR. (1985). Fermentation mechanism of fucose and rhamnose in Salmonella typhimurium and Klebsiella pneumoniae. J.Bacteriol. 161:435-437.
- 9.- BALLARD, F.J. (1977). Intracellular protein degradation. A Essays in Biochemistry, vol. 13. Editat per P.N. CAMPBELL i W.N. ALDRIDGE, pag 1-37. Academic Press.
- 10.- BENCZE, W.L. i K.SCHMID. (1957). Determination of tyrosine and tryptophan in proteins. Anal.Chem. 29: 1193.

- 11.- BLACK, S. (1955). Potassium-activated yeast aldehyde dehydrogenase. A Methods i Enzymology, vol I, pag 508-511. Academic Press Inc, New York.
- 12.- BORONAT, A. (1980). Caracterització de l'enzim propanediol òxido-reductasa produït per soques d'Escherichia coli en diferents estadis d'evolució experimental. Tesi Doctoral. Dpt. Bioquímica, Fac. Farmàcia, Univ. Barcelona.
- 13.- BORONAT, A. i J.AGUILAR. (1977). Rhamnose induce propanediol oxido-reductase in E.coli : purification, properties and comparison with the fucose induced enzyme. J. Bacteriol. 140:320-326.
- 14.- BORONAT, A. i J.AGUILAR. (1981). Experimental evolution of propanediol oxido-reductase in E.coli : comparative analysis of the wild type and mutant enzymes . Biochem. Biophys. Acta. 672:98-107.
- 15.- BORONAT, A. i J.AGUILAR. (1981). Metabolism of L-fucose and L-rhamnose in E.coli: differences in induction of propanediol oxido-reductase. J.Bacteriol. 147:181-185.
- 16.- BORONAT, A., E.CABALLERO i J.AGUILAR. (1983). Experimental evolution of a metabolic pathway for ethylene glycol utilization in Escherichia coli. J.Bacteriol. 153:134-139.
- 17.- BRAMMAR, W.J., P.H.CLARKE i A.Y.SKINNER. (1967). Biochemical and genetic studies with regulator mutants of the Pseudomonas aeruginosa 8602 amidase system. J.Gen.Microbiol. 47:87-102.
- 18.- BRÄNDÉN, H., H.E.JÖRNVALL i B.FURUGREN. (1975). Alcohol dehydrogenases. A The Enzymes, vol XI, Editor P.D.BOYER, pag 104-145. Academic Press Inc, New York.

- 19.- CABALLERO, E. (1980). Evoluci3n experimental de vias metab3licas: utilizaci3n de etilenglicol por mutantes de Escherichia coli K-12. Memoria de Llicenciatura, Fac. Farmàcia, Univ. Barcelona.
- 20.- CABALLERO, E., L.BALDOMÀ, J.ROS, A.BORONAT i J.AGUILAR. (1983). Identification of lactaldehyde dehydrogenase and glycolaldehyde dehydrogenase as functions of the same protein in Escherichia coli. J.Biol.Chem. 258:7788-7792.
- 21.- CALLEWAERT, D.M., M.S.ROSEMBLATT, K.SUZUKI i T.T.TCHEN. (1973). Succinic semialdehyde dehydrogenase from Pseudomonas species. Purification and chemical properties. J. Biol.Chem. 248:6909-6913.
- 22.- CALLEWAERT, D.M., M.S.ROSEMBLATT i T.T.TCHEN. (1974). Purification and properties of 3-aminopropanal dehydrogenase from a Pseudomonas species. Biochemistry. 13:4181-4184.
- 23.- CALLEWAERT, D.M., M.S.ROSEMBLATT i T.T.TCHEN. (1974). Purification and properties of 4-aminobutanal dehydrogenase from a Pseudomonas species. J.Biol.Chem. 249:1737-1741.
- 24.- CHAKRABARTI, T., Y.M.CHEN i E.C.C.LIN. (1984). Clustering og genes for L-fucose dissimilation by Escherichia coli. J.Bacteriol. 157:984-986.
- 25.- CHEN, Y.M. i E.C.C.LIN. (1984). Post-transcriptional control of L-1,2-propanediol oxido-reductase in the L-fucose pathway of Escherichia coli K-12. J.Bacteriol. 157:341-344.
- 26.- CHEN, Y.M., E.C.C.LIN, J.ROS i J.AGUILAR. (1983). Use of operon fusions to examine the regulation of the L-1,2-propanediol oxido-reductase gene of the fucose system in E.coli K-12. J.Gen.Microbiol. 129:3355-3362.

- 27.- CHERONIS, M.D. i T.S.MA. (1964). Organic group functional analysis. Pag 502-504. Interscience Publishers. John Wiley and sons Inc, New York.
- 28.- CHILD, J. i A.WILLETTS. (1978). Microbial metabolism of aliphatic glycols. Bacterial metabolism of ethylene glycol. *Biochim.Biophys.Acta.* 538:316-327.
- 29.- CHIU, T.H. i D.S.FEINGOLD. (1964). The purification and properties of L-rhamnulokinase. *Biochim.Biophys.Acta.* 92:489-497.
- 30.- CHIU, T.H. i D.S.FEINGOLD. (1969). L-rhamnuloze-1-phosphate aldolase from E.coli. Crystallization and properties. *Biochemistry.* 8:98-102.
- 31.- CLARKE, P.H. (1978). Experiments in microbial evolution. A The Bacteria, vol 6. L.N.ORNSTON i J.R.SOVATCH editors, pag 137-218. Academic Press Inc, New York.
- 32.- COCKS, G.T., J.AGUILAR i E.C.C.LIN. (1974). Evolution of L-1,2-propanediol catabolism in Escherichia coli by recruitment of enzymes for L-fucose and L-lactate metabolism. *J.Bacteriol.* 118:83-84.
- 33.- COOPER, R.A. (1975). The methylglyoxal bypass of the Embden Meyerhof pathway. *Biochem.Soc.Trans.* 3:837-840.
- 34.- COOPER, R.A. (1984). Metabolism of methylglyoxal in microorganisms. *Ann.Rev.Microbiol.* 38:49-68.
- 35.- D'ALESSIO, G. i J.JOSSE. (1971). Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase and phosphoglyceromutase of Escherichia coli. Simultaneous purification and physical properties. *J.Biol.Chem.* 246:4319-4325.

- 36.- D'ALESSIO, G. i J.JOSSE. (1971). Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase of Escherichia coli . Structural and catalytic properties. J.Biol.Chem. 246:4326-4333.
- 37.- DALZIEL, K. (1963). The purification of nicotinamide adenine dinucleotide and the kinetic effects of nucleotide impurities. J.Biol.Chem. 238:1538-1542.
- 38.- DALZIEL, K. (1975). Kinetics and mechanism of nicotinamide nucleotide linked dehydrogenases. A The Enzymes, vol XI, Editor P.D.BOYER, pag 1-25. Academic Press Inc, New York.
- 39.- DAVIS, R.W., D.BOTSTEIN i J.R.ROTH. (1980). A manual for genetic engineering. Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 40.- DAVIES, D.D. (1960). The purification and properties of glycolaldehyde dehydrogenase. J.Exp.Bot. 11:289-295.
- 41.- DAWSON, R.M.C., D.C.ELLIOT, W.H.ELLIOT i K.M.JONES. (1969). Detection of biochemical compounds. A Data for Biochemical Research. Pag 517. Oxford University Press.
- 42.- DAWSON, R.M.C., D.C.ELLIOT, W.H.ELLIOT i K.M.JONES. (1969). Preparation and composition of biochemical reagents. A Data for Biochemical Research. Pag 616. Oxford University Press.
- 43.- DELINCÉE, H. i B.J.RADOLA. (1970). Thin layer isoelectring focusing on sephadex layers of horseradish peroxidase. Biochim.Biophys.Acta. 200:404-407.
- 44.- DUBRAY, G. i G.BEZARD. (1982). A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrilamide gels. Anal.Biochem.

119:325-329.

- 45.- DUNCAN, R.J.S. (1985). Aldehyde dehydrogenase, an enzyme with two distinct catalytic activities at a single type of active syte. *Biochem.J.* 230:261-267.
- 46.-DUNCAN, R.J.S. i K.F.TIPTON. (1971). The purification and properties of the NAD-linked aldehyde dehydrogenase from pig brain. *Eur.J.Biochem.* 22:257-262.
- 47.- ECKFELDT, J., L.MOPE, K.TAKIO i T.YONETANI. (1976). Horse liver aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of two isoenzymes. *J.Biol.Chem.* 251:236-240.
- 48.- EDELHOCH, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry.* 6:1948-1954.
- 49.- ESCHENBRUCH, M. i R.R.BÜRK. (1982). Experimentally improved reliability of ultrasensitive silver staining of proteins in polyacrilamide gels. *Anal.Biochem.* 125:96-99.
- 50.- FAIRBANKS, G., T.L.STECK i D.F.H.WALLACH. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of human erythrocyte membrane. *Biochemistry.*10:2606-2617.
- 51.- FAZEL, A.M. i R.A.JENSEN. (1979). Obligatory biosynthesis of L-tyrosine via the pretyrosine branchet in coriiform bacteria. *J.Bacteriol.* 138:805-815.
- 52.- FISHER, H.F. i L.L.McGREGOR. (1961). The mechanism of the glutamic dehydrogenase reaction. II Substrate specificity of the enzyme. *J.Biol.Chem.* 236:791-794.

- 53.- FLYCARE, S., T.GRIFFIN, D.LARSSON i K.MOSBACK. (1983). Affinity precipitation of dehydrogenases. *Anal.Biochem.* 133:409-416.
- 54.- FORTE-McROBBIE, C.M. i R.PIETRUZKO. (1986). Purification and characterization of human liver "high Km" aldehyde dehydrogenase and its identification as glutamic γ -se-mialdehyde dehydrogenase. *J.Biol.Chem.* 261:2154-2163.
- 55.- FURUYA, A. i J.A.HAYASHI. (1963). Glycolic acid oxidation by *E.coli* adapted to glycolate. *J.Bacteriol.* 85:1129-1131.
- 56.- GABRIEL, O. (1971). Locating enzymes on gels. A Methods in *Enzymology*, vol XXII , pag 578-604. Academic Press Inc New York.
- 57.- GHALAMBOR, M.A. i E.C.HEATH. (1962). The metabolism of L-fucose. II The enzymatic cleavage of L-fuculose-1-phosphosphate. *J.Biol.Chem.* 237:2427-2433.
- 58.- GOLDBERG, A.L. i A.C.St.JOHN. (1976). Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells : part 2. *Ann.Rev.Biochem.* 45:747-803.
- 59.- GONZALEZ, C.F., W.A.TABER i M.A.ZEITOUN. (1972). Biodegradation of ethylene glycol by a salt-requiring bacterium. *Appl.Microbiol.* 24:911-919.
- 60.- GORBUNOFF, M.J. (1984). The interaction of proteins with hidroxyapatite. I.Role of protein charge and structure. *Anal.Biochem.* 136:425-432.
- 61.- GORBUNOFF, M.J. (1984). The interaction of proteins with hidroxyapatite. II.Role of acidic and basic groups. *Anal. Biochem.* 136:433-439.

- 62.- GORBUNOFF, M.J. i S.N.TIMASHEFF. (1984). The interaction of proteins with hidroxyapatite. III.Mechanisme. Anal. Biochem. 136:440-445.
- 63.- GOODWIN, T.W. i R.A.MORTON. (1946). The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. Biochem.J. 40:628-632.
- 64.- GRAY, W.R. i B.S.HARTLEY. (1963). A fluorescent end-group reagent for proteins and peptids. Biochem.J. 89: 59p.
- 65.- GREEN, M. i S.S.COHEN. (1956). Enzymatic conversion of L-fucose to L-fuculose. J.Biol.Chem. 219:557-568.
- 66.- GUARDIOLA, R. (1986). Avances en el estudio del mecanismo de regulación de la actividad del enzima propanodiol óxido-reductasa de Escherichia coli. Memoria de Llicenciatura. Fac Farmàcia, Univ. Barcelona.
- 67.- GUERRILLOT, L. i J.P. VANDECASTEELE. (1977). Purification and characterization of two aldehyde dehydrogenases from Pseudomonas aeruginosa. Eur.J.Biochem. 81:185-192.
- 68.- HACKING, A.J., J.AGUILAR i E.C.C.LIN. (1978). Evolution of propanediol utilization in E.coli : mutant with improved substrate scavering power. J.Bacteriol. 136:522-530.
- 69.- HACKING, A.J. i EC.C.LIN. (1976). Disruption of a fucose pathway as a consequence of genetic adaptation to propanediol as a carbon source in E.coli. J.Bacteriol. 126:1166-1172.
- 70.- HACKING, A.J. i E.C.C.LIN. (1977). Regulatory changes in the fucose system associated with the evolution of a

- catabolic pathway for propanediol in E.coli. J.Bacteriol. 130:832-838.
- 71.- HALVORSON, H. (1972). Utilization of single L-aminoacids as sole source of carbon and nitrogen by bacteria. Can. J.Microbiol. 18:1647-1650.
- 72.- HARTLEY, B.S. (1974). Enzyme families. A Evolution in the microbila world. XXII Simposi de la Societat General de Microbiologia. Editors M.J.CARLILE i J.J.SKEHEL. Pag 151-182. Cambridge University Press.
- 73.- HEATH, E.C. i M.A.GHALAMBOR. (1962). The metabolism of L-fucose. I.The purification and properties of L-fuculose-kinase. J.Biol.Chem. 237:2423-2426.
- 74.- HIGGINS, I.J. i J.M.TURNER. (1969). Enzymes of methylglyoxal metabolism in a Pseudomonad wich rapidly metabolizes aminoacetone. Biochim.Biophys.Acta. 184:464-467.
- 75.- HILLMAN, J.D. (1979). Mutant analysis of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in Escherichia coli. Biochem.J. 179:99-107.
- 76.- HILLMAN, J.D. i D.G.FRAENKEL. (1975). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase mutants of Escherichia coli. J. Bacteriol. 122:1175-1179.
- 77.- HOCKNEY, R.C. i T.A. SCOTT. (1979). The isolation and characterization of three types of vitamin B₆ auxotrophs of Escherichia coli K-12. J.Gen.Microbiol. 110:275-283.
- 78.- HUFF, E. (1961). The metabolism of 1,2-propanediol. Biochim.Biophys.Acta. 48:506-517.

- 88.- KITSON, T.M. (1985). High concentrations of aldehydes slow the reaction of citoplasmic aldehyde dehydrogenase with thiol group modifiers. *Biochem.J.* 228:765-767.
- 89.- KLINE, E.S. i H.R.MAHLER. (1965). The lactic dehydrogenases of E.coli. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 119:905-919.
- 90.- KLUYER, A.J. i C.SCHINELLEN. (1937). Uberdie vergarung von rhamnose. *Enzymologia.* 4:7-12.
- 91.- KOIVULA, T. i M.KOIVUSALO. (1975). Partial purification and properties of a phenobarbital induced aldehyde dehydrogenase of rat liver. *Biochim.Biophys Acta.* 410:1-11.
- 92.- KONECKA, A.M. i J.RITKA. (1970). Drogi przemian metyloglioksaluw organizmach zywych. (Metabolic pathways of methylglyoxal in living organisms). *Postepy Biochemii.* 16:513-524.
- 93.- KOO, P.H. i A.ELIJAM. (1974). α -Ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase of Pseudomonas. *J.Biol.Chem.* 249:1704-1716.
- 94.- KORNBERG, H.L. (1965). Anaplerotic sequences in microbial metabolism (1). *Angrew.Chem.Int.Ed.Engl.* 4:558-565.
- 95.- KORNBERG, H.L. i J.SMITH. (1969). Genetic control of hexose phosphate uptake by E.coli. *Nature (Lond).* 224:1261-1262.
- 96.- KRAKOW, G.Y. i S.S.BARKULIS. (1956). Conversion of glyoxylate to hidroxypyruvate by extracts of E.coli. *Biochim. Biophys.Acta.* 21:593-594.
- 97.- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. *Nature.* 227:680-685.

- 79.- IKAWA, M., C.C.IMPRAIM, G.WANG i A.YOSHIDA. (1983). Isolation and characterization of aldehyde dehydrogenase isozymes from usual and atypical human livers. J. Biol.Chem. 258:6282-6287.
- 80.- ISHERWOOD, F.A. i C.S.HANES. (1953). Separation and stimulation of organic acids on paper chromatograms. Biochem. J. 55:824-830.
- 81.- JAKOBY, W.B. (1958). Aldehyde oxidation. I. Dehydrogenase from Pseudomonas fluorescens. J.Biol.Chem. 232:75-88.
- 82.- JAKOBY, W.B. (1958). Aldehyde oxidation. II. Evidence for closely yuxtaposed sulfhydryl groups on dehydrogenases. J.Biol.Chem. 232:89-97.
- 83.- JAKOBY, W.B. (1963). Aldehyde dehydrogenases. A The Enzymes, vol 7. Editor P.D.BOYER. Pag 203-221. Academic Press Inc, New York i London.
- 84.- JAKOBY, W.B. i J.FREDERICKS. (1959). Pirrolidine and putrescine metabolism : γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase. J.Biol.Chem. 234:2145-2148.
- 85.- JONES, L.R. i J.A.RIDDICK. (1957). Colorimetric determination of 1,2-propanediol and related compounds. Anal. Chem. 29:1214-1215.
- 86.- KELETI, T. i R.WELCH. (1984). The evolution of enzyme kinetic power. Biochem.J. 223:299-303.
- 87.- KERKAERT, J.P. (1978). Highly simplified analytical or preparative slab gel electrophoresis. Anal.Biochem. 84:354-360.

- 98.- LAMY, J., S.COMPIN i J.N.LAMY. (1983). Immunological correlates between multiple isolated subunits of An-droctonus australis and Limulus polyphemus hemocyanins: an evolutionary approach. Arch.Biochem.Biophys. 223: 584-603.
- 99.- LARSSON, O. i K.MOSBACH. (1979). Affinity precipitation of enzymes. FEBS LETTERS, 98:333-338.
- 100.- LAURELL, C.B. (1966). Quantitative stimulation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Anal.Biochem. 15:45-52.
- 101.- LEBLANC, D.J. i R.P.MORTLOCK. (1971). Metabolism of D-arabinose :a new pathway in E.coli. J.Bacteriol. 106: 90-96.
- 102.- LERNER, S.A., T.T.WU i E.C.C.LIN. (1964). Evolution of a catabolic pathway in bacteria. Science, 146:1313-1315.
- 103.- LEVENE, P.A. i J.WALTI. (1931). Studies in polimerization and condensation of α -hidroxiladehydes. J.Biol.Chem. 94:358-372.
- 104.- LIN, E.C.C. i T.T.WU. (1984). Functional divergence of the L-fucose system in mutants of Escherichia coli. A Microorganisms as model systems for studying evolution. Editat per R.P.MORTLOCK. Pag 135-164. Plenum Publishing Corporation.
- 105.- LINEWEAVER, H. i D.BURK. (1934). Determination of enzy-me dissociation constants. J.Am.Chem.Soc. 56:548-555.
- 106.- LOWE, D.A. i J.M.TURNER. (1970). Microbial metabolism of aminoketones : D-1-aminopropan-2-ol and aminoacetone me-tabolism in Escherichia coli. J.Gen.Microbiol. 63:49-61.

- 107.- LOWRY, O.H., N.J.ROSEBROUGH, A.L.FARR i R.J.RANDALL. (1951). Protein mesurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193:265-275.
- 108.- MAYER, R.J. i F.DOHERTY. (1986). Intracellular protein catabolism : state of the art. FEBS LETTERS. 198:181-193.
- 109.- MONDER, C. (1967). α -ketoaldehyde dehydrogenase, an enzyme that catalyzes the enzymic oxidation of methylglyoxal to piruvate. J.Biol.Chem. 242:4603-4609.
- 110.- MOORE, S. i W.H.STEIN. (1963). Chromatographic determination of aminoacids by the use of automatic recording equipment. A Methods in Enzymology, vol VI, pag 819-831. Academic Press Inc, New York.
- 111.- MORITA, H., T.NISHIMURA, Y.TANI, K.OGATA i H.YAMADA. (1979). Bacterial distribution of glycolaldehyde dehydrogenase in relation to vitamin B₆ biosynthesis. Agric.Biol.Chem. 43:185-186.
- 112.- MORITA, H., Y.TANI, K.OGATA i H.YAMADA. (1978). Further characterization of glycolaldehyde dehydrogenase isozymes from Escherichia coli B. Involvement in vitamin B₆ biosynthesis. Agric.Biol.Chem. 42:2077-2081.
- 113.- NAYLOR, J.F. i I.FRIDOVICH. (1968). The form of the aldehydes susceptible to enzymic oxidation. J.Biol.Chem. 243:341-345.
- 114.- NIRENBERG, M.W. i W.B.JAKOBY. (1960). Enzymatic utilization of γ -hidroxybutyric acid. J.Biol.Chem. 235:954-960.
- 115.- OAKLEY, B.R., D.R.KIRSH i N.R.MORRIS.(1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins

- in polyacrilamide gels. *Anal.Biochem.* 105:361-369.
- 116.- OHSAWA, K. i N.EBATA. (1983). Silver stain for detecting 10-femtogram quantities of protein after polyacrilamide gel electrophoresis. *Anal.Bioche.* 135:409-415.
- 117.- OLD, D.C., P.F.DAWES i R.M.BARKER. (1980). Transduction of inositol fermenting ability demonstrating phylogenetic relationships among strains of Salmonella typhimurium. *Genet.Res.* 35:215-224.
- 118.- OLSON, J.A. (1959). The purification and properties of yeast isocitriclyase. *J.Biol.Chem.* 234:5-10.
- 119.- ORSTON, L.N. (1966). The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by Pseudomonas putida. *J.Biol.Chem.* 241:3800-3810.
- 120.- ORSTON, L.N. i M.K.ORSTON. (1969). Regulation of glyoxylate metabolism in E.coli K-12. *J.Bacteriol.* 98:1098-1108.
- 121.- OUCHTERLONY, O. (1953). Antigen-antibodies reactions in gels. IV: types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Pathol.Microbial.Scand.* 22:231-240.
- 122.- PADMANABHAN, R. i T.T.TCHEN. (1972). Aminoladehyde dehydrogenases from a Pseudomonas species grown on polyamines. *Arch.Biochem.Biophys.* 150:531-541.
- 123.- PETRESON, J.B. i T.A.LARUE. (1982). Soluble aldehyde dehydrogenase and metabolism of aldehydes by soybean bacteroids. *J.Bacteriol.* 151:1473-1484.
- 124.- POLLOCK, M.R. (1965). Purification and properties of penicillinase from two strains of Bacillus licheniformis,

- a chemical, physicochemical and physiological comparison. *Biochem.J.* 94:666-675.
- 125.- POWER, J. (1967). The L-rhamnose genetic system in Escherichia coli K-12. *Genetics*, 33:557-568.
- 126.- PRICE, N.C. i L.STEVENS. (1982). The mechanisms of enzyme action. A Fundamentals of enzymology. Pag 152-205. Oxford University Press.
- 127.- RADOLA, B.J. (1974). Isoelectring focusing in layers of granulated gels. II Preparative isoelectring focusing. *Biochim.Biophys.Acta.* 386:181-195.
- 128.- RADOLA, B.J. (1984). High-resolution preparative isoelectring focusing. A Methods in Enzymology, vol 104, pag 256-275. Academic Press Inc, New York.
- 129.- RIGBY, P.W.J., B.D.BURLEIGH i B.S.HARTLEY. (1974). Gene duplication in experimental enzyme evolution. *Nature*, 251: 200-204.
- 130.- RIORDAN, J.F. i B.L.VALLEE. (1967). Reactions with N-ethylmaleimide and p-mercuriobenzoato. A Methods in Enzymology, vol XI ,pag 541-548. Academic Press Inc, New York
- 131.- ROS, J. (1984). Metabolisme de fucosa i ramnosa en Escherichia coli : duplicitat genètica, estructural i de regulació per la propandiol òxido-reductasa i comparació amb l'enzim de Salmonella typhimurium i Klebsiella pneumoniae. Dpt. de Bioquímica, Fac. Farmàcia, Univ. de Barcelona.
- 132.- ROS, J. i J.AGUILAR. (1984). Genetic and structural evidence for the presence of propanediol oxido-reductase isoenzymes in Escherichia coli. *J.Gen.Microbiol.* 130:687-692.

- 133.- ROS, J. i J.AGUILAR. (1985). Propanediol oxido-reductase of Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Salmonella typhimurium. Aspects of interspecies structural and regulatory differentiation. Biochem.J. 231:145-149.
- 134.- ROSEMBLATT, M.S., D.M.CALLEWAERT i T.T.TCHEN. (1973). Succinic semialdehyde dehydrogenase from a Pseudomonas species. J.Biol.Chem. 248:6014-6018.
- 135.- ROSEMBLATT, M.S., D.M.CALLEWAERT i T.T.TCHEN. (1974). In vivo subunit hybridization of succinic semialdehyde and 4-aminobutanal dehydrogenases from a Pseudomonas species. Biochemistry, 13:4176-4180.
- 136.- ROSSMANN, M.G., A.LILJAS, C-I.BRÄNDÉN i L.J.BANASZAN. (1975). Evolution of dehydrogenases. A The Enzymes, vol XI. Editor P.D.BOYER. Pag 61-102. Academic Press Inc, New York.
- 137.- RUDOLPH, F.B., D.L.PURICH i H.J.GROMH. (1968). Coenzyme A-linked aldehyde dehydrogenase from Escherichia coli. J.Biol.Chem. 243:5539-5545.
- 138.- SANDERSON, K.E. i M.DEMEREC. (1965). The linkage map of Salmonella typhimurium. Genetics, 51:897-913.
- 139.- SANDERSON, K.E. i J.R.ROTH. (1983). Linkage map of Salmonella typhimurium. Edition VI. Microbiol.Rev. 47:410-453.
- 140.- SANWAL, B.D. (1969). Regulatory mechanisms involving nicotinamide adenine nucleotids as allosterics effectors. I Control characteristics of malate dehydrogenase. J. Biol.Chem. 244:1831-1837.

- 141.- SANWAL, B.D. i R.S.MANDO. (1969). Malic enzyme of Escherichia coli. Diversity of the effectors controlling enzyme activity. J.Biol.Chem. 244:1817-1823.
- 142.- SAWADA, H. I Y.TAKAGI. (1964). The metabolism of L-rhamnose in E.coli. III L-rhamnulose phosphate aldolase. Biochim.Biophys.Acta. 92:26-32.
- 143.- SCHULTZ, R.M. i P.M.WASSARMAN. (1977). ³H-dansyl chloride a useful reagent for the quantitation and molecular weight determiantion of nanogram amounts of protein. Anal.Biochem. 77:25-29.
- 144.- SCOTT, T.A. i R.C.HOCKNEY. (1979). Synthesis of vitamin B₆ by a mutant of Escherichia coli K-12 and the action of 4'-deoxypyridixine. J.Gen.Microbiol. 110:285-289.
- 145.- SEEGMILLER, J.E. (1955). TPN linked aldehyde dehydrogenase from yeast. A Methods in Enzymology, vol I, pag 511-514, Academic Press Inc, New York.
- 146.- SEGEL, I.H. (1976). Biochemical calculations. John Wiley and Sons, Inc, New York.
- 147.- SHIMIZU, S. i W.B.DEMPSEY. (1978). Pyridoxine-requiring mutants of Escherichia coli, glycolaldehyde dehydrogenase is not coded for by the pdxB gene. J.Bacteriol. 133:1273-1277.
- 148.- SILVERSTONE, A.E., B.MAGASANIK, W.S.REZNIKOFF, J.H.MILLER i J.R.BECKWITH. (1969). Catabolic sensitive site of the lac operon. Nature, 221:1012-1014.
- 149.- SOKATCH, J.R. (1969). Oxidation of aminoacids. A Bacterial physiology and metabolism. Pag 178-179. Academic Press London i New York.

- 150.- SRIDHARA, S. i T.T.WU. (1969). Purification and properties of lactaldehyde dehydrogenase from Escherichia coli. J.Biol.Chem. 244:5233-5238.
- 151.- SRIDHARA, S., T.T.WU, T.M.CHUSED i E.C.C.LIN. (1969). Ferrous-activated nicotinamide adenine dinucleotide linked dehydrogenase from a mutant of E.coli capable of growth on 1,2-propanediol. J.Bacteriol. 93:87-95.
- 152.- STEINMAN, C.R. i W.B.JAKOBY. (1968). Yeast aldehyde dehydrogenase. II Properties of the homogeneous enzyme preparations. J.Biol.Chem. 243:730-734.
- 153.- ST.MARTIN, E.J. i R.P.MORTLOCK. (1976). Natural and altered induction of the L-fucose catabolic enzymes in Klebsiella aerogenes. J.Bacteriol. 127:91-97.
- 154.- STENLAKE, J.B. (1978). Drug metabolism. A Foundations of molecular pharmacology, vol 2. The chemical basis of drug action. Pag 253-254. The Athlone Press of the University of London.
- 155.- STOPPANI, A.O.M. i C.MILSTEIN. (1957). Essential role of thiol groups in aldehyde dehydrogenases. Biochem.J. 67: 406-416.
- 156.- STOUTHAMER, A.M., J.M.VAN BOOME i A.J.BASTIANSE. (1963). Metabolism of C₂ compounds by Acetobacter aceti. Antonie van Leeuwenhoek. J.Microbiol.Serol. 29:393-406.
- 157.- STREEKSTRA, H., M.J.TEIXEIRA DE MATTOS, O.M.NEIJSSEL i D.W.TEMPEST. (1985). Metabolic versatility: the physiological significance of branched fermentation pathways. A 13^e Congrès Internacional de Bioquímica, I.U.B., Amsterdam, 1985

- 158.- STUDIER, F.W. (1973). Analysis of bacteriophage T₇ early RNAs and proteins on slab gels. *J.Mol.Biol.* 79:237-248.
- 159.- SUGAWARA, Y. i S.SASAKI. (1977). Purification and properties of aldehyde dehydrogenase from Proteus vulgaris. *Biochim.Biophys Acta.* 480343-350.
- 160.- SWITZER, R.L. (1977). The inactivation of microbial enzymes in vivo. *Ann.Rev.Microbiol.* 31:135-157.
- 161.- TAKAGI, Y. i H.SAWADA. (1964). The metabolism of L-rhamnose in E.coli. I: L-rhamnose isomerase. *Biochim.Biophys. Acta.* 92:10-17.
- 162.- TAKAGI, Y. i H.SAWADA. (1964). The metabolism of L-rhamnose in E.coli. II: L-rhamnulose kinase. *Biochim.Biophys. Acta.* 92:18-25.
- 163.- TALBOT, D.N. i D.A.YPHANTIS. (1971). Fluorescent monitoring of SDS gel electrophoresis. *Anal.Biochem.* 44:246-253.
- 164.- TANI, Y. i W.B.DEMPSEY. (1971). Glycolaldehyde is a precursor of pyridoxal phosphate in E.coli B. *J.Bacteriol.* 116:341-345.
- 165.- THORNER, J.W. i H.PAULUS. (1973). Glycerol and glycerate kinases. A *The Enzymes*, vol VIII. Editor P.D.BOYER. Pag 504-508. Academic Press Inc, New York.
- 166.- TIJSSSEN, P. i E.KURSTAK. (1979). A simple and sensitive method for the purification and peptiide mapping of proteins solubilized from denonucleosis virus with SDS. *Anal.Biochem.* 99:97-104.
- 167.- TING, H-H. i M.J.C.CRABBE. (1983). Bovine lens aldehyde dehydrogenase. Kinetics and mechanism. *Biochem.J.* 215: 361-368.

- 168.- TING, S-M., O.N.MILLER i O.Z.SELLINGER. (1965). The metabolism of lactaldehyde. VII: The oxidation of D-lactaldehyde in rat liver. *Biochim.Biophys Acta.* 97: 407-415.
- 169.- TURNER, J.M. (1966). Microbial metabolism of aminoketones. Aminoacetone formation from 1-aminopropan-2-ol by a dehydrogenase in Escherichia coli. *Biochem.J.* 99:427-433.
- 170.- TURNER, J.M. (1967). Microbial metabolism of aminoketones. L-1-aminopropan-2-ol dehydrogenase and L-threonine dehydrogenase in Escherichia coli. *Biochem.J.* 104:112-121.
- 171.- VELLA, G.I., R.E.HILL, B.S.MOOTOO i I.D.SPENSER. (1980). The status of glycolaldehyde in the biosynthesis of vitamin B₆. *J.Biol.Chem.* 255:3042-3048.
- 172.- WEINER, H. (1979). Aldehyde dehydrogenase. Mechanism of action and possible physiological roles. A *Biochemistry and Pharmacology of ethanol*, vol I . Editors E.MAJCHOWICZ and E.P.NOBLE. Pag 107-124. Plenum Press, New York.
- 173.- WILLETS, A.J. i J.M.TURNER. (1970). Threonine metabolism in a strain of Bacillus subtilis: enzymic oxidation of the intermediates D- and L- lactate. *Biochim.Biophys.Acta.* 215:403-405.
- 174.- WILLETS, J.A. i J.M.TURNER. (1970). Threonine metabolism in a strain of Bacillus subtilis: enzymic oxidation of the intermediate D,L-lactaldehyde. *Biochim.Biophys.Acta.* 222:234-236.
- 175.- WILLETS, A.J. i J.M.TURNER. (1971). L-threonine acetaldehyde lyase in a strain of Bacillus subtilis. *Biochim. Biophys.Acta.* 252:105-110.

- 176.- WIMPENNY, J.W.T. i A.FIRTH. (1972). Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. *J.Bacteriol.* 111:24-32.
- 177.- WINER, A.D.(1964). Crystallization of nicotinamide adenine dinucleotide. *J.Biol.Chem.* P.C.3598.
- 178.- WISEMAN, A. (1975). Enzyme induction in microbial organisms. *A Enzyme Induction*. Editor D.V.PARKE. Pag 1-11. Plenum Press, New York.
- 179.- WONG, D.J.O. i S.J.AJL. (1956). Conversion of glyoxylate and acetate to malate. *J.Amer.Chem.Soc.* 78:3230-3231.
- 180.- WRAY, W., T.BOULIKAS, V.P.WRAY i R.HANCOCK. (1981). Silver staining of proteins in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 118:197-203.
- 181.- WRIGHT, J.A. i B.D.SANWAL. (1969). Regulatory mechanisms involving nicotinamide adenine nucleotides as allosteric effectors. II: control of phosphoenolpyruvate carboxylase. *J.Biol.Chem.* 244:1838-1845.
- 182.- YAMADA, E.W. i W.B.JAKOBY. (1960). Aldehyde oxidation. V: direct conversion of malonic semialdehyde to acetyl-coenzyme A. *J.Biol.Chem.* 235:589-594.
- 183.- ZAGALAK, B., P.A.FREY, L.KARABATSOS i R.H.ABELES. (1966). The stereochemistry of the conversion of D- and L-1,2-propanediol to propionaldehyde. *J.Biol.Chem.* 241:3028-3035.
- 184.- ZWAIG, N., W.S.KISTLER I E.C.C.LIN. (1970). Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 102:753-759.