

**Producció enantioselectiva de
diols vicinals i α -hidroxicetones
amb oxidoreductases de llevat.
Aplicació de tècniques
d'autoclonació per la generació
d'enzims i soques modificades.**

Tesis Doctoral

Eduard Calam Cervera

Universitat Autònoma de Barcelona
Setembre 2015



**Universitat Autònoma
de Barcelona**



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Bioquímica de Ciències

**Producció enantioselectiva de diols vicinals i
 α -hidroxicetones amb oxidoreductases de
lleuat.
Aplicació de tècniques d'autoclonació per la
generación d'enzims i soques modificades.**

Memòria presentada per Eduard Calam Cervera, llicenciat en
Biotecnologia, per optar al grau de doctor en Bioquímica i Biologia
Molecular.

Treball realitzat en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular,
Unitat de Ciències, de l'Universitat Autònoma de Barcelona, sota la
direcció del Doctor Josep Antoni Biosca Vaqué.

Dr. Josep Antoni Biosca Vaqué

Eduard Calam Cervera

Bellaterra, 29 de setembre de 2015

Agraïments

Agraeixo, en primer lloc, al Dr. Josep Antoni Biosca Vaqué, haver-me donat la oportunitat de treballar al laboratori amb el seu grup. També la paciència i el suport mostrat durant tots aquests anys.

A la Dr. Chari Fernández, com a post-doc del grup, tota la quantitat de informació i consells al llarg d'aquests anys.

Als companys del meu grup, que han sigut uns quants, per més o menys temps. En especial a la Eva Crosas, amb qui he compartit més temps al laboratori.

A tota la resta de companys de la unitat, amb els que més o menys, hem coincidit algun cop. En especial a en Joan, en Marc, en Ton, en Jordi, l'Alba, la Susanna, la Fani, en Sergio Porté, en Xavi Ruiz, l'Ana Paula Candiota i la Rita.

A l'Helena, per tota la feina estalviada en el laboratori, i a en Santi per tota la feina estalviada per les pràctiques.

A en Salva pel suport informàtic i l'assessorament tècnic.

A la Mari del SAQ per tota la feina feta i per la paciència durant totes les hores passades canviant figures.

A la Silvia Brumsons, pels anàlisis de seqüències proteiques.

També a tota la gent que m'ha donat suport fora de l'àmbit universitari. Als meus pares, Joan i Enriqueta, i al meu germà, David, per ser el que són

A la Neus, la meva parella, per aguantar-me i estimar-me en moments molt difícils.

A tots els meus amics, sense vosaltres no seria el que sóc. Especialment a en Jaume, l'Ignasi, l'Uri, en Jordi i en Joan.

Finalment, a tota aquella gent que no coneixo, escriptors i músics bàsicament, però que m'han acompanyat al llarg de tota la meva vida.

Moltes gràcies a tots.

Índex de Matèries

Agraïments	i
Índex de matèries	iii
Índex de figures i taules	vii
Abreviatures	ix
Resum	1
Introducció	3
<i>La superfamília de les deshidrogenases-reductases de cadena mitja (MDRs)</i>	4
Anàlisi de les diferents macrofamílies que componen les MDRs:	7
Estructura de les MDRS	13
Diversitat i plasticitat de les MDRs	14
MDRs en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
La Butanodiol Deshidrogenasa (Bdh1p)	17
Fermentació alcohòlica	19
Alcohol Deshidrogenases (ADHs)	24
Alcohol deshidrogenasa 1 i Alcohol deshidrogenasa 2 (Adh1p i Adh2p)	24
<i>La família de les Aldo-ceto reductases (AKRs)</i>	29
Arabinosa Deshidrogenasa (Ara1p)	32
AKR1B1 i AKR1B10 (humanes)	34
<i>Diacetil, 2,3-pentàdiona, acetoïna i 2,3-butanodiol.</i>	35
Estereoisòmers	40
<i>Clonació de gens de llevat per tècniques d'auto-clonació (self-cloning)</i>	42
Objectius	45
Materials i Mètodes	46
<i>Material i reactius</i>	46

<i>Soques de Llevat i Bacteri</i>	47
<i>Medis de cultiu</i>	49
<i>Condicions de creixement</i>	50
<i>Obtenció DNA genòmic</i>	50
<i>Mètode de transformació</i>	51
<i>Purificació de proteïnes</i>	53
Trencament Celular	53
Purificació AKRs	54
Purificació de Bdh1p, Bdh1(His)6p i Fdh1-Bdh1(His)6p	56
Purificació de ADH2p	59
Purificació de Adh1p i Adh3p	60
<i>Determinació de la massa relativa de les proteïnes d'estudi</i>	60
<i>Determinació de la concentració de proteïnes</i>	61
<i>Mètodes electroforètics</i>	62
Gels Agarosa	62
SDS-PAGE	63
<i>Assajos enzimàtics. Espectrofotometria</i>	63
<i>Western blots i IEF</i>	64
<i>Assajos de formació de productes</i>	65
Cromatografia de gasos i espectrometria de masses (CG-MS)	69
<i>Clonació de gens de llevat per tècniques d'auto-clonació (self-cloning)</i>	70
Construcció de la soca que sobreexpressa Bdh1p i Fdh1p. Delitto perfetto	70
Formació de la proteïna de fusió (FDH1p-Bdh1-(His)6p)	73
Mutants de Adh1p i Adh3p	75
Resultats	79
<i>Purificació de diverses AKRs de llevat i humanes. Determinació de les seves Mr.</i>	79
<i>Especificitat de substrat i paràmetres cinètics.</i>	81
<i>Regioselectivitat i estereoselectivitat de les AKRs.</i>	83
<i>Acció de les AKRs en la reducció d'acetoïna.</i>	87

<i>Els paràmetres cinètics i estereoselectivitat de Bdh1p envers dicetones veïnes</i>	90
<i>Recerca d'altres diacetil reductases dependents de NADH.</i>	94
<i>Construcció d'una soca de llevat que sobreexpressa Bdh1p i Fdh1p.</i>	95
<i>Propietats de la proteïna de fusió Fdh1-Bdh1(His)6p</i>	101
<i>Oxidació de diols veïns.</i>	105
<i>Mutacions cromosomals als gens ADH1 i ADH3 seguint la metodologia del delitto perfetto.</i>	110
Discussió	117
Conclusions	128
BIBLIOGRAFIA	131

Índex de Figures i taules

Figures

Figura 1	3
Figura 2	5
Figura 3	6
Figura 4	9
Figura 5	12
Figura 6	13
Figura 7	19
Figura 8	20
Figura 9	23
Figura 10	25
Figura 11	27
Figura 12	28
Figura 13	30
Figura 14	33
Figura 15	34
Figura 16	35
Figura 17	36
Figura 18	38
Figura 19	39
Figura 20	39
Figura 21	40
Figura 22	41
Figura 23	41
Figura 24	42
Figura 25	42
Figura 26	66
Figura 27	67
Figura 28	73
Figura 29	74
Figura 30	76
Figura 31	80
Figura 32	81
Figura 33	84
Figura 34	85
Figura 35	86
Figura 36	89
Figura 37	90
Figura 38	92
Figura 39	93
Figura 40	95
Figura 41	97
Figura 42	98
Figura 43	102
Figura 44	103
Figura 45	103

Figura 46	106
Figura 47	017
Figura 48	108
Figura 49	109
Figura 50	110
Figura 51	112
Figura 52	113
Figura 53	115
Figura 54	116
Figura 55	126

Taules

Taula 1	71
Taula 2	77
Taula 3	78
Taula 4	82
Taula 5	82
Taula 6	82
Taula 7	87
Taula 8	91

Abreviatures

ADH	Alcohol Deshidrogenasa
BDH	Butanodiol Deshidrogenasa
BSA	Albúmina de sèrum boví
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dNTPs	Desoxiribonucleòtid 5'-trifosfat
DTT	1,4-ditiotritol
D ₅₉₅	Densitat òptica a 595 nm
k _{cat}	Constant catalítica
K _M	Constant de Michaelis
MDR	Deshidrogenasa/reductasa de cadena mitja
Mr	Massa relativa
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleòtid (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleòtid (forma reduïda)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (forma reduïda)
NBT	Nitroblue tetrazoli
nm	Nanòmetre
ORF	Marc de lectura obert
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
pI	Punt isoelèctric
r.p.m.	Revolucions per minut
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida amb SDS
U.	Unitat internacional d'activitat enzimàtica
Tris	Tris (hidroximetil) aminoetà
VDK	Dicetona veïnal
Zn	Zinc

Resum

Les transformacions catalitzades per enzims s'utilitzen cada cop més per a la síntesis d'intermediaris útils destinats a les indústries farmacèutiques, agroalimentàries i de química fina (Turner 2003). La utilització d'enzims en síntesi química compleix amb els principis de la “química verda”, com per exemple en la utilització de solvents més segurs (les reaccions enzimàtiques són realitzades usualment, en medi aquós), en el disseny de reaccions amb millor eficiència energètica (les reaccions enzimàtiques es realitzen, sovint, a T ambient), i en la utilització de catalitzadors (els enzims ho són) entre d'altres (Hudlicky 2011). La majoria de molècules amb interès farmacèutic o emprades en la “química fina” posseeixen al menys un centre quiral i donades les propietats de quimioselectivitat, regioselectivitat i estereoselectivitat dels enzims, fan que aquests siguin òptims, per a la síntesi d'aquestes molècules.

Diversos diols, com 1,3-propanodiol, 1,2-propanodiol, 2,3-butanodiol i 1,4-butanodiol, es consideren productes químics bàsics (“platform chemicals”) a causa de les seves moltes aplicacions en la indústria, incloent la síntesi de productes químics especials i el seu ús com a precursors de polímers. A més, el 2,3-butanodiol s'ha utilitzat com un agent anticongelant (la forma de l'estereoisòmer (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol té un punt de congelació -60 ° C) i com un precursor de diversos compostos, a través de reaccions de deshidratació (obtenint metil etil cetona, que es pot utilitzar com un additiu de combustible), deshidrogenació (donant compostos aromatitzants com acetoïna i diacetil) i esterificació (donant precursors de fàrmacs i plastificants) (Zeng & Sabra 2011; Ji et al. 2011; Celińska & Grajek 2009).

En el nostre laboratori hem caracteritzat l'enzim Bdh1p de *Saccharomyces cerevisiae*, implicat en la síntesi de acetoïna i 2,3-butanodiol, que són productes del metabolisme del llevat (González et al. 2010). També hem caracteritzat l'activitat diacetil reductasa depenent de NADH dels enzims Bdh1p (Gonzalez et al. 2000) i Adh2p (Eva González. Tesis Doctoral, 2004); així com l'activitat diacetil reductasa depenent de NADPH de l'enzim Ara1p (González et al. 2010).

El primer objectiu d'aquesta Tesi és emprar el potencial biotecnològic de Bdh1p en la síntesi de molècules amb dos grups hidroxil veïns amb configuració *R*, en concret: (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol, (2*R*,3*R*)-2,3-pentanodiol, (2*R*, 3*R*)-2,3-hexanodiol i (3*R*,4*R*)-3,4-hexanodiol. Aquesta síntesi s'ha fet a partir de precursors (dicetones) i a diferents nivells: enzims purs (incloent enzims de regeneració de coenzim), soques de llevat que els sobre-expressen i una proteïna de fusió entre Bdh1p i formiat deshidrogenasa.

El segon objectiu de la Tesi és estudiar la estereoselectivitat de diferents aldo-ceto reductases (tant de llevat, com humanes) i la seva utilització en la síntesi d'hidroxicetones i diols derivats de dicetones veïnes.

El tercer objectiu de la Tesi és desenvolupar una tècnica d'autoclonació per llevat que permeti introduir mutacions específiques en el DNA, sense la introducció d'elements extra que pertorbin el context cromosomal dels gens. El seu ús en soques industrials evitarà la presència de gens que produeixin resistència a antibiòtics i en general de DNA forani a l'organisme. Aquesta tècnica s'ha aplicat per la construcció de soques de llevat que sobre-expressin Bdh1p des de un promotor activable per galactosa. També s'ha utilitzat per introduir mutacions específiques en el gen *ADH1* de llevat, de manera que s'alteri la seva preferència de coenzim. S'han estudiat els efectes d'aquestes mutacions puntuals en les corbes de creixement de les soques de llevat modificades, en diferents fonts de carboni.

Introducció

La classe de les oxidoreductases (EC1.b.c.d) a la que pertanyen enzims com deshidrogenases, monooxigenases, dioxigenases, oxidases i peroxidases, constitueix una de les sis classes enzimàtiques, que agrupa enzims que catalitzen reaccions d'oxidació de grups hidroxil, aldehyd, ceto, d'amines primàries i secundàries, així com les reduccions d'aldehyds, cetones, àcids carboxílics i de dobles i triples enllaços carboni-carboni (Figura 1).

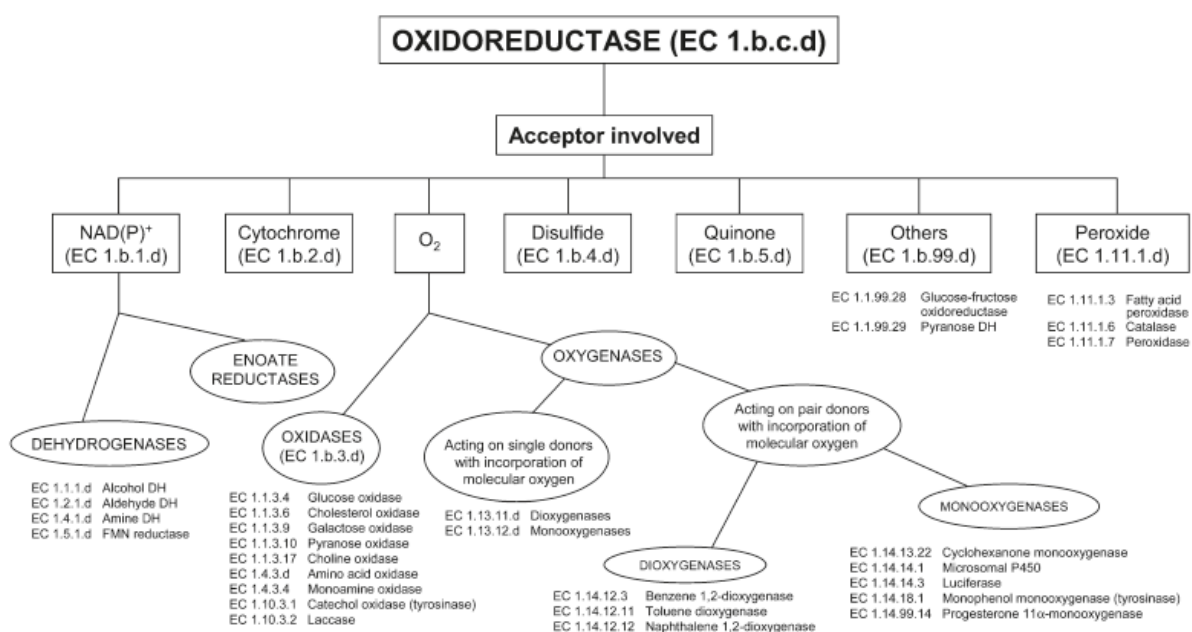


Figura 1. Classificació de les oxidoreductases de les que se n'han trobat aplicacions en química analítica o sintètica. (Monti et al. 2011).

De les aproximadament 6800 reaccions enzimàtiques catalogades (agost de 2015) a la base de dades BRENDA (www.brenda-enzymes.info/), unes 1900 estan catalitzades per oxidoreductases. En aquesta Tesi, s'han estudiat oxidoreductases pertanyents a dues grans superfamílies enzimàtiques: les MDRs i les AKRs.

La superfamília de les deshidrogenases-reductases de cadena mitja (MDRs)

Les MDRs o deshidrogenases/reductases de cadena mitja, són una superfamília de proteïnes amb una àmplia diversitat de funcions, localitzacions cel·lulars, supraestructures i ús de cofactors. El nombre de proteïnes de la superfamília (amb membres a tots els regnes de la naturalesa) ha crescut molt en els darrers anys: a maig de 2014 hi havien més de 15000 membres, mentre que 10 anys enrere n'hi havia uns 1000. (Hedlund et al. 2010; Nordling et al. 2002).

Estudis previs (Riveros-Rosas et al. 2003; Riveros-Rosas & Julián-Sánchez 2005) mostren que les MDRs posseeixen: en primer lloc, una activitat sorprenentment diversa ja que si bé la majoria són deshidrogenases o reductases, també hi ha presents en la superfamília dismutases, esterases, liases,..., i variants no catalítiques, com proteïnes d'unió a receptors nuclears, d'unió a ADN, proteïnes involucrades amb el tràfic de proteïnes de membrana i proteïnes estructurals com la ζ -cristal·lina. També presenten una distribució subcel·lular molt diversa, ja que a més de trobar-se al citoplasma poden trobar-se també en nucli, en mitocondries i en membranes. El contingut en zinc és variable, algunes requereixen de 2 àtoms de Zn^{2+} per subunitat (Nordling et al. 2002), altres en requereixen un per subunitat (sorbitol deshidrogenases, família PDH) i d'altres no tenen zinc (prostaglandina reductasa, família PTGR (veure més endavant). (Hisanaga et al. 2004). Les MDRs tenen una longitud aproximada de 350 residus i mostren uns percentatges d'identitat de seqüència entre elles de 25-30% de mitjana (Hedlund et al. 2010).

Pel que fa a la seva organització, la majoria de les MDRs formen estructures monofuncionals, ja sigui en forma de dímers o tetràmers (família PDH), tot i que algunes són funcionals com a monòmers (família MTD) o trímers. A més algunes estan unides a altres proteïnes o dominis, formant proteïnes multifuncionals. Finalment, pel que fa a ús de cofactors, la majoria

utilitzen NADH, NADPH, o ambdós, havent-hi algunes que no requereixen cofactor.

S'han proposat diferents formes de classificar-les, una d'elles mitjançant un algoritme basat en els perfils de Markow per a classificar automàticament noves seqüències dintre de les famílies de les MDRs (Hedlund et al. 2010).

En un estudi, (Riveros-Rosas et al. 2003), s'hi defineix els conceptes de macrofamília, família i subfamília, segons aquests autors (Figura 2). En una classificació efectuada pel mateix autor (Riveros-Rosas & Julián-Sánchez 2005), mostra com la superfamília de les MDRs es subdivideix en tres macrofamílies, vuit famílies i 49 subfamílies diferents (Figura 3).

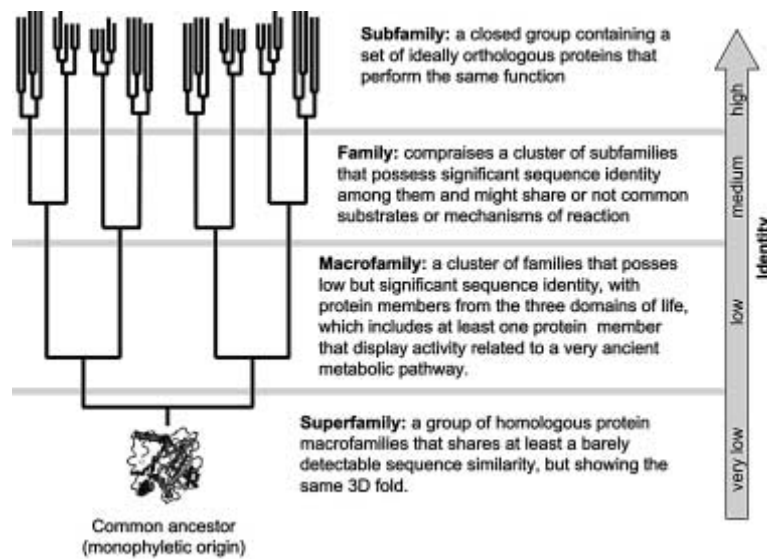


Figura 2. Visualització esquemàtica que mostra les principals relacions entre les diferents categories taxonòmiques dins d'una superfamília de proteïnes (Riveros-Rosas et al. 2003).

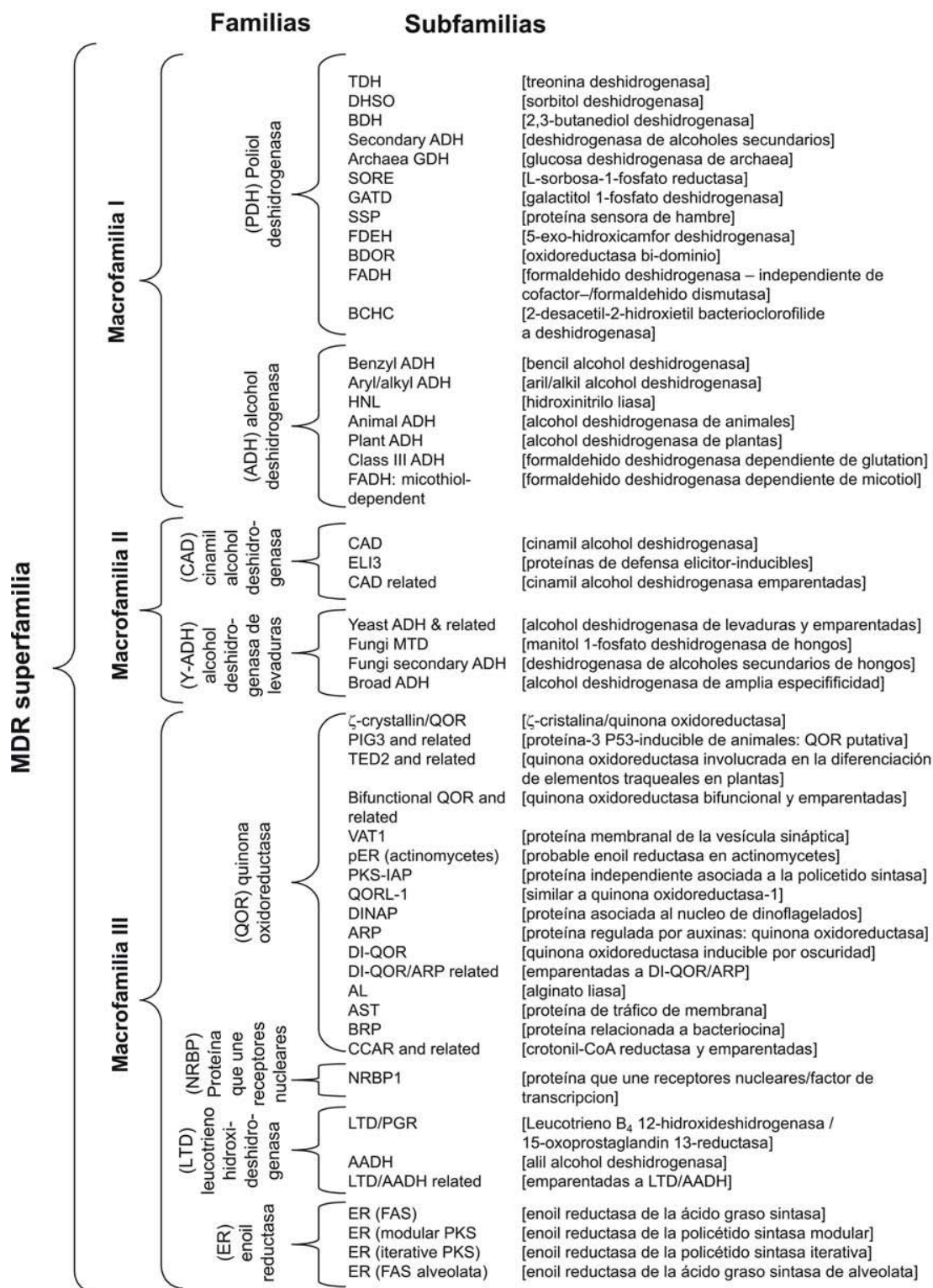


Figura 3. Classificació en tres diferents categories taxonòmiques i en 50 subfamílies, les proteïnes que conformen la superfamilia de les MDRs (Riveros-Rosas 2005).

Anàlisi de les diferents macrofamílies que componen les MDRs:

L'estudi de Riveros-Rosas et al., 2003 és un estudi extens, en el que es van utilitzar 583 seqüències de MDRs pertanyents a archaea, bacteris, protozous, fongs, plantes i animals. Les figures 3 i 4 mostren els arbres de les seqüències per a bacteris/archaea i eucariotes.

Macrofamília I: Està formada per dues famílies: la família PDH (poliol deshidrogenasa) i la família ADH. La família PDH es pot desglossar en 12 subfamílies (es defineix subfamília com un grup de proteïnes homòlogues amb la mateixa funció i que formen un grup tancat en el que la identitat i similitud entre dos membres qualsevol del grup és més gran que el que puguin tenir amb altres proteïnes fora de la subfamília, la identitat de seqüència entre els diferents membres de cada subfamília és superior al 30%). Els seus membres contenen Zn, tenen activitat deshidrogenasa o reductasa, uneixen NAD(H), excepte les ADHs secundàries (que uneixen NADP(H)) i són proteïnes citosòliques (excepte la subfamília BDOR, que són proteïnes transmembrana). Formen homotetràmers o homodímers, i estan implicades en diversos processos metabòlics. (Riveros-Rosas, 2003).

La família ADH inclou a les ADHs clàssiques d'animals i plantes, comprèn 7 subfamílies: les ADHs de plantes, les ADHs de classe III, les ADHs d'animals, la hidroxinitril liasa de plantes, les benzil ADHs, les aril/alquil ADHs i les formaldehid deshidrogenases dependents de micotiol. Una de les subfamílies, la classe III està present a animals, plantes, fongs i bacteris. Les proteïnes d'aquesta família solen ser citoplasmàtiques (encara que la classe III d'animals també està al nucli). Són proteïnes homodimèriques que necessiten el ió Zn^{2+} i utilitzen el cofactor NAD(H) per a la catàlisi; hi ha una excepció, la ADH8 de rana perezi, que és dependent de NADP(H) (Peralba et al. 1999).

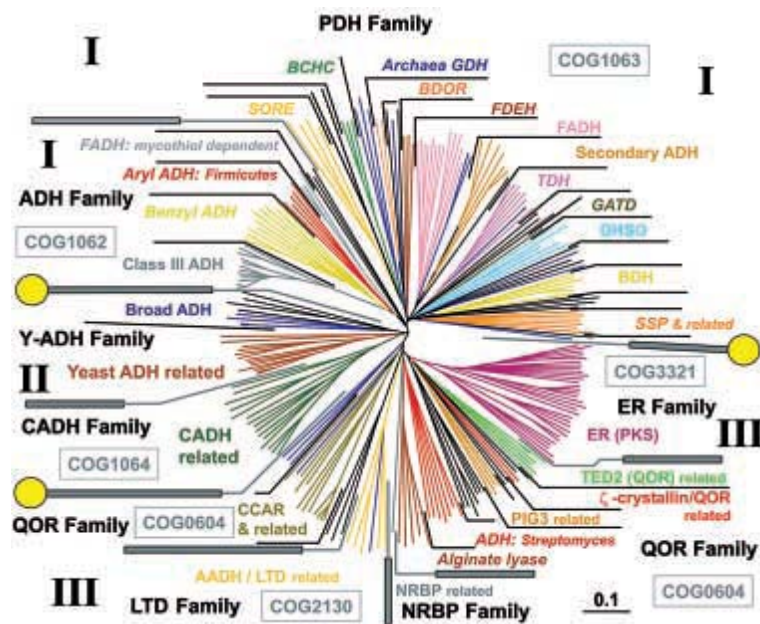


Figura 3. Arbre sense arrel clàssic construït a partir de seqüències de proteïnes que pertanyen a les MDRs en bacteris i archaea. Les seqüències de color blau pertanyen a archaea, mentre que la resta pertanyen a bacteria i estan dividides en color en funció de la subfamília. Les tres macrofamílies estan indicades amb nombres romans, i el nom de les famílies i subfamílies estan abreuiats. Les ratlles grises marquen els límits de les famílies, mentre que les que tenen un cercle groc marquen el límit de les macrofamílies. Les subfamílies que pertanyen només a un dels regnes es designen en cursiva. (Riveros-Rosas et al. 2003).

Macrofamília II: La macrofamília II també està composta per dues famílies: la família de les ADHs de llevat (Y-ADH) i la família de les cinamil alcohol deshidrogenases (CADH). Aquestes famílies estan desglossades en sis subfamílies: dues la família CADH: les CADHs i proteïnes emparentades i les proteïnes de plantes relacionades amb la defensa i activables per inductors (ELI3) i quatre la família Y-ADH: les ADHs de llevat i proteïnes emparentades, les manitol deshidrogenases de fongs (MTD), les ADHs secundàries de fongs i les ADHs d'àmplia especificitat de substrat. Les proteïnes de la subfamília CADH realitzen funcions anabòliques i participen en la biosíntesi de cinamil alcohols (precursors de la lignina en plantes). En bacteries i fongs participarien en la biosíntesi de lípids de paret cel·lular i en la síntesi d'alcohols complexos, respectivament. Les proteïnes de la subfamília ELI3 presenten activitats relacionades amb la defensa en front patògens i ferida, entre d'altres. Les

subfamílies de la família Y-ADH utilitzen Zn i són proteïnes tetramèriques, que utilitzen NAD(H) amb funcions catabòliques: implicades en el metabolisme de l'etanol, altres alcohols de cadena curta i del manitol.

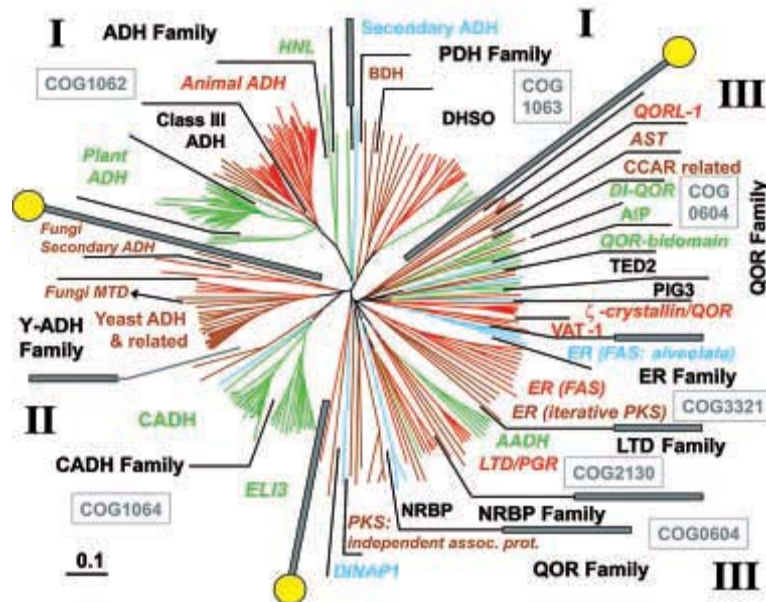


Figura 4. Arbre sense arrel clàssic construït a partir de les seqüències de 328 proteïnes, que mostra les 3 macrofamílies de les MDRs i les seves subfamílies en eucariotes. Cada seqüència està marcada en color en funció de del regne al que pertanyen: vermell per animals, verd per plantes, marró per fongs i blau per protistes. Les tres macrofamílies estan indicades amb nombres romans, i el nom de les famílies i subfamílies estan abreviats. Les ratlles grises marquen els límits de les famílies, mentre que les que tenen un cercle groc marquen el límit de les macrofamílies. Les subfamílies que pertanyen només a un dels regnes es designen en cursiva (Riveros-Rosas et al. 2003).

Macrofamília III: Aquesta macrofamília és la més heterogènia i està composta per quatre famílies: la família dels factors de transcripció/proteïna d'unió a receptors nuclears (NRBP), la família de les enoil reductases (ER), la família de les leucotriè deshidrogenases (LTD) i la família de les quinona oxidoreductases (QOR).. En general no requereixen Zn^{2+} per la catàlisi i utilitzen majoritàriament NADP(H) com a cofactor. La seva localització cel·lular és molt diversa.

És important assenyalar que a nivell de seqüència d'aminoàcids, la similitud entre proteïnes distants dins de la superfamília MDR és difícilment

detectable, encara que en aquests casos, es poden trobar una sèrie de proteïnes intermitges amb les quals es pot determinar una similitud estadísticament significativa amb els membres distants, el que corrobora la pertinença de totes aquestes seqüències a la mateixa superfamília de proteïnes.

Com que es coneix l'estructura terciària d'almenys un dels membres de cada una de les 8 famílies, és possible elaborar un alineament estructural global entre proteïnes representatives de cada família, i observar el grau de conservació de l'estructura.

La figura 5 mostra un alineament estructural de 14 proteïnes que pertanyen a la superfamília de les MDRs, de les quals es coneix l'estructura tridimensional.

En aquest alineament, 5, 4 i 5 proteïnes pertanyen a les macrofamílies I, II i III respectivament.

		β1			β2			
1	ADH 1N8K_ADHE_HORSE_P00327st agkv	I	KCKAAV	LWEEKK PFS IEEVEVAPP	31	
1	ADH 1F8F_XYLB_ACICA_AAC32671mselkd	I	IAAVT	PCKGADFELQALK	29	
1	PDH 1E3J_DHSO_BEMAR_AAD02817masd	N	LSAVLY	KQNDLRLEQRPIPEP	26	
1	PDH 1KOL_FADH_PSEPU_P46154sGNR	RGVV	Y	LGSGKVEVQKIDYPKM	31	
1	PDH 1JQB_ADH_CLOSE_P25984M	KGFAM	L	GINK-LGWIEKERPVA	22	
2	Y-ADH 1NTO_ADH_SULSO_P39462MRAV	R	LV	EIGKPLSLOEIGVPKP	23	
2	Y-ADH 1H2B_ADH1_AERPE_BAA81251mr	ieqdfsqslgver	L	KAARLHEYNKPLRIEDVDYPR	38	
2	Y-ADH 1LUJ_ADH_PSEAE_AAG08812mt	l	q	TMKAAV	HAYGAPLRIEEVKVPLP	29
2	CADH 1UUF_YAHK_ECOLI_P75691m	k	I	KAVGAYSAKQPLEPMDITRREP	25	
3	NRBP 1GU7_ETR_CANTR_AAL55472m	I	AQAV	LYTQHGE	pkvLFTOSFEI	31
3	LTD 1VJ1LTD_MOUSE_AAH21466m	I	IQRV	VLSR	Pgkngnpv	aENFRVEEFSLLDaL	34
3	QOR 1QOR_QOR_ECOLI_P28304m	A	T	RIEFH	KHGg	pEVLOAVEFTPADP	26
3	QOR 1I20QOR_THETH_BAB92082M	KAWV	L	KRLGG	LELVLDLPEPEA	23
3	ER 1PQW_PPSC-er-f_MYCTY_CAB06099G	LELVLDLPEPEA	1
		β3	(cat)	α1	(cat)	β4		
1	ADH 1N8K_ADHE_HORSE_P00327	K A H - E V R I K M V A T G I C R S D D H V V S G T L V			T P L P V I A G H E A A G I V E S I G E G	79	
1	ADH 1F8F_XYLB_ACICA_AAC32671	Q G D - E V L V K V V A T G M C H T D L I V R D Q K			Y P V P L P A V L G H E G S G I I E A I G P N	77	
1	PDH 1E3J_DHSO_BEMAR_AAD02817	K E D - E V L L Q M A Y V G I C S D V H Y Y E A G R I A D F I			V K D P M V I G H E A S G T V V K V G K N	78	
1	PDH 1KOL_FADH_PSEPU_P46154	I E H - G V I L K V V S T N I C G S D Q H M V R G R T			T A Q V G L V L G H E I T G V E I E K G R D	79	
1	PDH 1JQB_ADH_CLOSE_P25984	G S Y - D A I V R P L A V S P C T S D I H T V F E G A			L G D R K N M I L G H E A V G E V E V G S E	71	
2	Y-ADH 1NTO_ADH_SULSO_P39462	K G P - Q V L I K V E A A G V C H S D V H M R O G R F G N L R I V			E D L G V K L P V T L G H E I T A G K I E E V G D E	80	
2	Y-ADH 1H2B_ADH1_AERPE_BAA81251	E G R F d V I V R I A G A G V C H T D L H L V G M W			H E L L Q P K L P Y T L G H E N V G Y I E E V A E G	91	
2	Y-ADH 1LUJ_ADH_PSEAE_AAG08812	G P G - Q V L V K I E A S G V C H T D L H A A E G D W			P V K P P L P F I P G H E G V G Y V A A V G S G	79	
2	CADH 1UUF_YAHK_ECOLI_P75691	G P N - D V K I E I A Y C G V C H S D L H O V R S			E W A G T Y Y P C V P G H E I V G R V V A V G D Q	74	
3	NRBP 1GU7_ETR_CANTR_AAL55472	A P N - E V I V K T L G S P V N P S D I N Q L G V Y Y p s k p a k i				i g f g l t e p A A P C G N E G L F E V I K V G S N	90	
3	LTD 1VJ1LTD_MOUSE_AAH21466	N E G - Q V Q V R T L Y L S V P Y M R C K M N E D T G T D Y L A			P W Q L A O V A D G G G I G I V E E S K	88	
3	QOR 1QOR_QOR_ECOLI_P28304	A E N - E I Q V E N K A I G I N F T D T Y R S G L Y p p p s l			p s g l g T E A A G I V S K V G S G	75	
3	QOR 1I20QOR_THETH_BAB92082	E E G - E V V L R V E A V L N F A D H L M R L G A Y I t r l h p p l i			p g m	62	
3	ER 1PQW_PPSC-er-f_MYCTY_CAB06099	1	

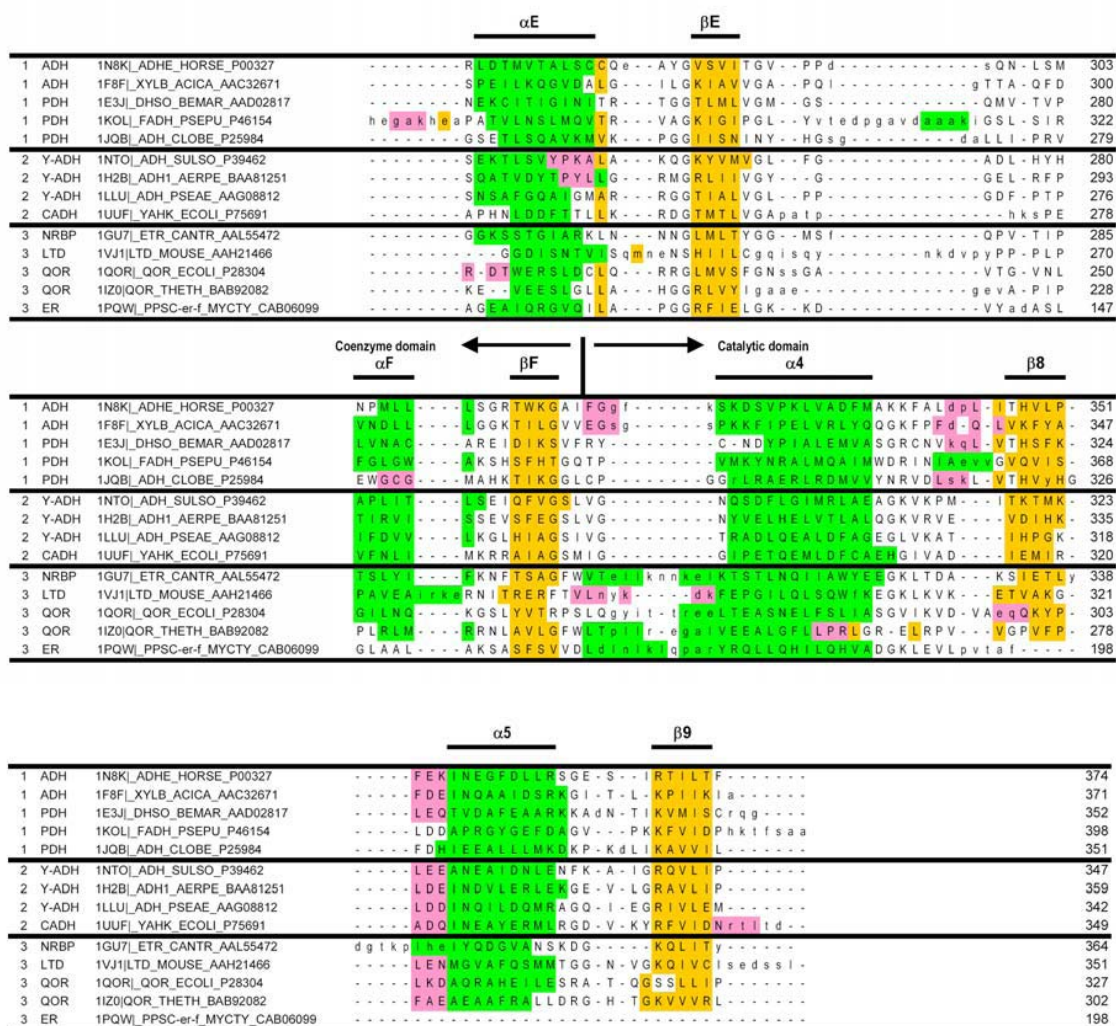


Figura 5. Alineament estructural de 14 proteïnes que pertanyen a la superfamília de les MDRs. Les proteïnes estan separades en grups en funció de la macrofamília a què pertanyen, essent les 5 primeres de la macrofamília I, les 4 segones de la macrofamília II i les 5 darreres de la macrofamília III. En l'alineament es separen les parts que conformen el domini catalític de les que conformen el domini d'unió a coenzim. Les seqüències marcades en groc assenyalen les parts que pertanyen a plegament β ; dins d'aquestes, s'enumeren de l'1 al 9 les que pertanyen al domini catalític i amb lletres, de la A a la F, les que pertanyen al domini d'unió al coenzim. Les seqüències marcades en verd assenyalen les hèlix α , i com en les d'estructura β , s'enumeren de l'1 al 5 les que pertanyen al domini catalític i de la A a la F les del domini d'unió al coenzim. També es mostren els zincs de les proteïnes, tant els estructurals com el catalític, just al damunt del residu que els uneix (Riveros-Rosas & Julián-Sánchez 2005)

De les cinc proteïnes de la macrofamília I, dos pertanyen a la família de les alcohol deshidrogenases (ADH) i tres a les poliol deshidrogenases (PDH); de les quatre proteïnes pertanyents a la macrofamília II, tres són de la família de les alcohol deshidrogenases de llevat (Y-ADH) i una de la família de les cinamil alcohol deshidrogenases (CADH). Finalment, de les proteïnes pertanyents a la

macrofamília III, una pertany a la família de proteïnes que uneix receptors nuclears (NRBP), una altra a la família de les leucotriè deshidrogenases (LTD), dos a la família de les quinona oxidoreductases (QOR) i l'altre a las enoil reductases (ER). D'aquesta manera, l'alineament mostrat en la figura 2 inclou almenys una seqüència representativa de cada una de les vuit famílies de proteïnes que componen la superfamília de les MDR.

Estructura de les MDRS

En l'alineament mostrat en la figura 2 estan indicats els dos dominis que formen part d'aquest grup d'enzims: el d'unió al coenzim i el catalític. Els dos dominis estan separats per una escletxa, butxaca, en la que hi ha el centre actiu i on també s'unirà el cofactor. El primer domini, el d'unó al coenzim, està present de forma similar en totes les 14 estructures alineades i es localitza en la part mitjana de la proteïna. Presenta el característic plegament de Rossmann que consisteix en 6 segments d'hèlix α ($\alpha A - \alpha F$) i 6 segments d'estructura β ($\beta A - \beta F$).

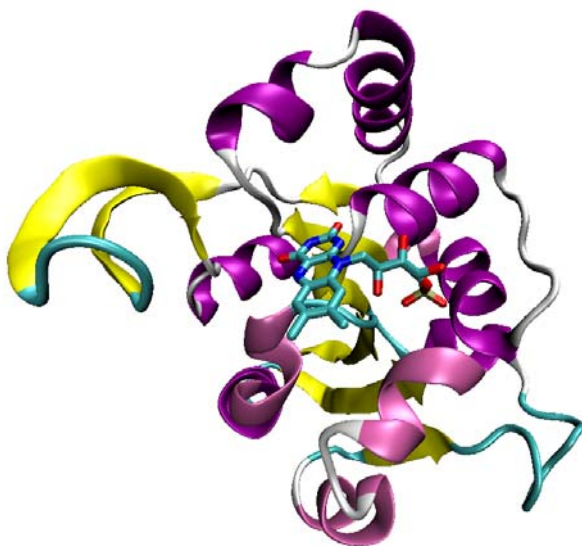


Figura 6. Estructura del plegament de Rossmann. En lila s'hi mostren els 6 segments d'hèlix α , i en groc els 6 segments de fulla β .

L'altre domini, el catalític, es troba localitzat en els extrems amino i carboxil de les MDRs. L'extrem carboxil correspon al segment més conservat del

domini catalític, i consisteix en dos segments d'hèlix α ($\alpha 4 - \alpha 5$) i dos segments d'estructura β ($\beta 8 - \beta 9$); en el extrem amino s'hi poden observar 7 segments d'estructura β conservats en totes les estructures ($\beta 1 - \beta 7$), i tres segments d'hèlix α ($\alpha 1 - \alpha 3$). De totes maneres, en totes les proteïnes pertanyents a la macrofamília III s'hi pot observar que el loop que uneix el zinc estructural, que inclou l'hèlix $\alpha 2$, no hi és. Això concorda amb el fet que, en totes les proteïnes pertanyents a la macrofamília III de les que se'n coneix l'estructura tridimensional, els hi manca el zinc.

Al contrastar les dades mostrades en les figures 2 i 5, s'observa clarament que les estructures secundàries estan molt conservades en les proteïnes que pertanyen a les macrofamílies I i II de les MDRs. Només existeix una variant estructural significativa, que és l'absència del loop d'unió al zinc estructural dins del domini catalític de l'extrem amino en els membres de la macrofamília III. Aquesta variant repercuteix en l'absència de zinc dins d'aquest grup de proteïnes i molt probablement és la causa per la qual la major diversitat d'activitats i funcions dins de les MDRs s'observi precisament entre els membres d'aquesta macrofamília III. De fet, només aquesta macrofamília agrupa a la meitat de les famílies i subfamílies que componen les MDRs.

Diversitat i plasticitat de les MDRs

La plasticitat i diversitat de les MDRs, és resultat d'una intensa enzimogènesi i/o proteinogènesi (Riveros-Rosas et al. 2003). Així, al llarg de l'evolució, es van adquirir un gran nombre de noves funcions dins de diferents taxa o grups d'organismes. De fet, la capacitat per desenvolupar noves funcions pot ser considerada com l'essència mateixa de l'evolució de les proteïnes. Els mecanismes d'evolució de les proteïnes no estan restringits a conservar l'especificitat de substrat o el mecanisme de reacció (Gerlt & Babbitt 2001), i es veu, almenys en el cas de les MDRs, que una mateixa arquitectura del centre

actiu d'una proteïna, pot participar en dos o més reaccions completament diferents. De fet, la presència de proteïnes multifuncionals sembla ser, ara, la regla i no l'excepció (James & Tawfik 2001). En aquest context, les activitats secundàries desenvolupades per una proteïna poden servir com a punt de partida de noves funcions (O'Brien & Herschlag 1999; James & Tawfik 2001).

D'altra banda, aquesta enorme plasticitat observada en les MDRs no sembla ser exclusiva d'aquesta superfamília, ja que si es té en compte que aproximadament un 80% de totes les proteïnes conegudes fins ara pertanyen a alguna de les grans superfamílies de proteïnes ja identificades (Wolf et al. 2000), és clar que a l'explorar en detall alguna d'aquestes altres superfamílies, s'obtidràn conclusions similars molt probablement. De fet, el sistema taxonòmic seguit aquí i proposat per Riveros-Rosas per les MDRs (Riveros-Rosas et al. 2003), que consisteix en superfamília, macrofamília, família i subfamília, possiblement pot ser extrapolat a d'altres superfamílies.

Les noves tècniques d'anàlisi massiu han mostrat la gran complexitat de la superfamília, com també s'ha vist en les SDRs. (Kavanagh et al. 2008). La seva distinció de les SDRs, que són típicament més petites (~250 residus), i que no tenen dependència de metall, ja es coneix de fa temps, tot i que inicialment se les va anomenar com a formes de cadena llarga. (Jörnvall et al. 1981). Les diferències entre els tipus de proteïnes de les dues famílies es va observar al voltant dels anys 1970, quan les primeres dades de la ADH de *Drosophila* (SDR) van mostrar patrons de seqüència diferents dels que mostraven les ADHs depenents de Zn^{2+} (MDRS).

El primer membre de les MDRs caracteritzat fóu l'alcohol deshidrogenasa de tipus I (ADHI) de mamífer, de la qual la primera estructura va ser presentada el 1970 (Jörnvall 1970). Posteriorment, s'han presentat estructures d'altres membres de les MDRs que inclouen la sorbitol deshidrogenasa (Jeffery et al. 1984), una ζ -cristalina, una proteïna sinàptica i diversos enzims del metabolisme

(Persson et al. 1994). Aquest últim article és també el que va encunyar el terme MDR.

MDRs en *Saccharomyces cerevisiae*.

S'han identificat 21 gens potencials, codificants de MDRs en el genoma de *S.cerevisiae* (Riveros-Rosas et al. 2003). Dotze d'aquests gens codifiquen per proteïnes que contenen una seqüència consens present en totes les MDRs que uneixen Zn²⁺ en el seu centre actiu. Es coneix l'activitat enzimàtica de 10 d'elles, les codificades pels gens: *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH5*, *ADH6*, *ADH7*, *SFA1*, *BDH1*, *XYL2* i *SOR1* (Larroy et al. 2002). Les altres dues proteïnes codificades per gens d'aquest grup, mostren un elevat grau d'identitat amb alguna de les 10 mencionades prèviament. La proteïna codificada pel gen *YDL246C*, té un 99% d'identitat amb la proteïna codificada pel gen *SOR1*, i se l'anomena *SOR2*. La codificada pel gen *YAL061W* té un 51 % d'identitat amb la proteïna codificada pel gen *BDH1*, i se l'anomena *BDH2* en el Saccharomyces Genome Database (SGD), encara que el nostre grup no ha trobat activitat butanodiol deshidrogenasa en aquesta proteïna (González et al. 2010).

Els altres gens codificants per proteïnes de la superfamília de les MDRs en llevat són: *ZTA1*, *YML131W*, *ETR1*, *AST1*, *AST2*, *YCR102C*, *YLR460C*, *YNL134C*, i *YMR152W*. La proteïna Zta1p ha estat caracteritzada, en part al nostre grup com una quinona reductasa (Crosas et al. 2015), pertanyent a la família de la ξ -cristal·lina, amb activitat enfront alquenals/ones i també activada per diferents estressos (com carència nutricional). Apart també s'ha vist que es pot unir a seqüències riques en AU localitzades a les regions 3'-UTR d'alguns mRNAs. Yml131p és una proteïna classificada en la família LTD (leucotrié B4 deshidrogenasa) i que darrerament s'ha vist que mostra activitat enfront furfural, reduint-lo a furà metanol (Li et al. (2015). Etr1p (2-enoil tioèster reductasa) en la síntesi d'àcids grassos, Ast1p i Ast2p estarien associades a "lipids rafts" i

Ycr102p, Ylr460p, Ynl134p i Ymr152p sense funció coneguda i que estan classificats dintre de la família de les quinona oxidoreductases.

La Butanodiol Deshidrogenasa (Bdh1p)

La (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol deshidrogenasa (Bdh1p) és un enzim de la família de les MDRs present en llevat, codificat pel gen *BDHI*(*YAL060W*), i que el nostre grup ha caracteritzat (Gonzalez et al. 2000). És un homodímer compost per 382 aminoàcids i té una massa molecular relativa de 41500.

Catalitza l'oxidació reversible del (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol a (3*R*)-acetoïna en una reacció dependent de NAD. També pot oxidar el centre de configuració *R* del (*meso*)-2,3-butanodiol obtenint (3*S*)-acetoïna, però no mostra cap activitat front (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol. La Bdh1p no presenta activitat amb etanol, glicerol o sorbitol. L'enzim també catalitza l'oxidació de varis 1,2 i 2,3-diols, mostrant una major activitat amb alcohols secundaris, com el 2,3-butanodiol. També és capaç de realitzar reaccions de reducció, en presència de NADH, per les quals necessita grups cetona o hidroxicetona. En aquest sentit, el substrat pel qual presenta una major eficiència catalítica és la (3*R*)-acetoïna que redueix a (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol, tot i que també pot reduir el diacetil, la 2,3-pentanodiona i altres dicetones.

Bdh1p és el principal enzim caracteritzat en llevat capaç de catalitzar la reducció d'acetoïna a 2,3-butanodiol (González et al. 2010; Ehsani et al. 2009). Mostra una estricta estereoespecificitat pels OH (grup hidroxil) dels carbonis en configuració *R*. També ha estat caracteritzada la seva preferència per actuar com a reductasa abans que com a deshidrogenasa. Així mateix, també s'ha caracteritzat la seva activitat front altres substrats *in vivo*, especialment la seva activitat diacetil reductasa, obtenint l'enantiòmer *R*-acetoïna específicament (González et al. 2010).

El vi conté 2,3-butanodiol a una concentració que oscil·la entre 0.2 i 3 G/L (Sponholz et al. 1993) i no afecta usualment a les seves propietats organolèptiques, degut el seu elevat llindar gustatiu (de 150 mG/L aproximadament). Quan està per sobre del seu llindar, però, confereix un gust una mica amarg i dona més cos al vi, degut a la seva viscositat. La major part de 2,3-butanodiol present al vi és produït durant la fermentació dels carbohidrats pel llevat *S.cerevisiae* i s'observa una relació recíproca entre nivells de 2,3-butanodiol i acetoïna, aquesta es pot trobar a concentracions que oscil·len entre pocs mG/mL a 200 mG/mL en soques molt determinades (Romano et al. 1996). La Bdh1p és l'enzim responsable de la producció de l'isomer (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol. La deleció del gen *BDH1* elimina l'acumulació d'aquest compost al medi així com l'activitat acetoïna reductasa (dependent de NADH) en homogenats de llevat crescuts en glucosa (González et al. 2010). Per tant, durant la fermentació alcohòlica l'enzim Bdh1p reduiria l'acetoïna sintetitzada a partir d'acetaldehid per la piruvat descarboxilasa, produint el 2,3-butanodiol. En efecte, la acetoïna procedeix de la condensació de dues molècules d'acetaldehid en una reacció catalitzada per l'enzim piruvat descarboxilasa (Chen & Jordan 1984), o bé de la reducció del diacetil, format espontàniament de la descarboxilació del α -acetolactat (un metabòlit de la via de la biosíntesi dels aminoàcids leucina i valina) (Figura 7).

L'enzim piruvat descarboxilasa produeix les dues formes estereoisomèriques de la acetoïna (*R*) i (*S*)-acetoïna, que després seran reduïdes a (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol i (*meso*)-2,3-butanodiol, respectivament, per l'enzim Bdh1p. Així, Bdh1p seria l'enzim responsable d'aquesta branca secundària del metabolisme fermentatiu, que podria contribuir a regular el balanç redox de manera fina.

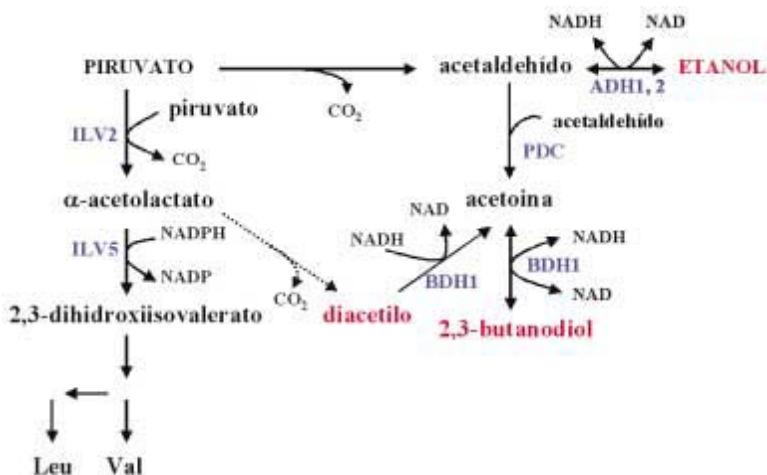


Figura 7. Via metabòlica de la biosíntesi dels aminoàcids leucina i valina. S'hi observa la síntesi i procedència del diacetil, l'acetoina i el 2,3-butanodiol.

La Bdh1p s'expressa preferencialment a la fase estacionària, quan s'esgota la glucosa del medi, així com quan es creix el llevat en fonts de carboni com l'etanol o la galactosa.

En la figura 8, s'hi mostra un alineament de seqüències entre la Bdh1p de *S. cerevisiae* i altres membres de les MDRs: butanodiol deshidrogenasa de *P. putida*, treonina deshidrogenasa de *E.coli*, sorbitol deshidrogenasa de *Homo sapiens*, alcohol deshidrogenasa de *S. cerevisiae*, formaldehid deshidrogenasa dependent de glutatió de *S. cerevisiae* i l'alcohol deshidrogenasa de fetge de cavall, classe I subunitat E.

Fermentació alcohòlica

El llevat *Saccharomyces cerevisiae* (una de les gairebé 800 espècies de llevat catalogades (Kurtzman et al. 2011)), és un organisme que pot créixer tant en condicions aeròbiques com anaeròbiques, produint etanol, via fermentació alcohòlica, en condicions anaeròbiques. També el produeix en condicions aeròbiques, ja que només el 10% de la glucosa és metabolitzada a través de la respiració, metabolitzant la resta de forma fermentativa (el que s'anomena efecte Crabtree).

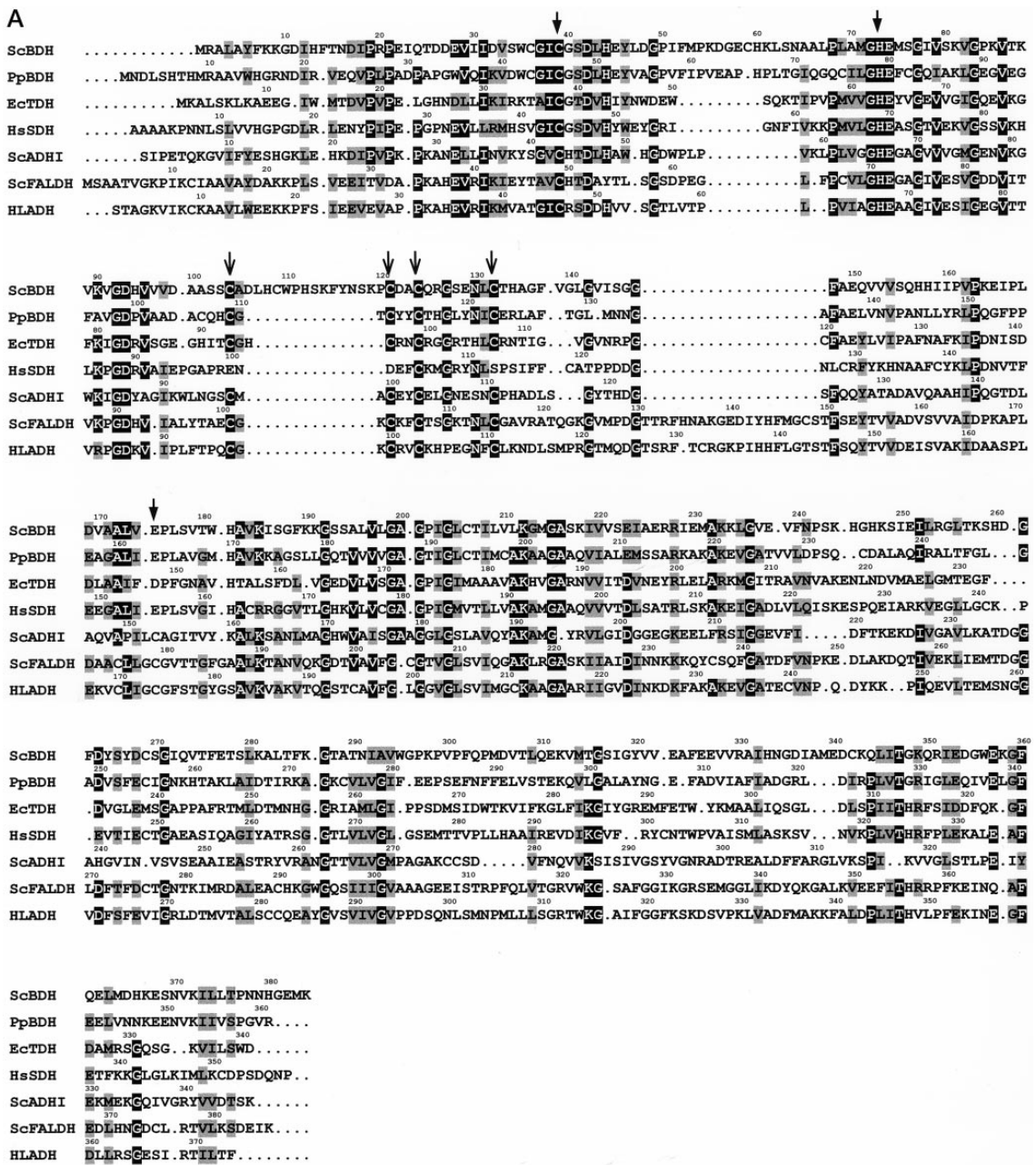


Figura 8. Alineament entre *Bdh1p* i altres membres de les MDRs, obtingut amb el programa ClustalW, excepte la posició 174 (d’acord amb la numeració de la *ADH1p* de fetge de cavall), que s’hi va introduir manualment. Els quadrats negres indiquen residus idèntics en com a mínim 5 de les 7 seqüències, i els grisos en les 7. Les fletxes “tancades” marquen els residus que enllacen amb el Zn^{2+} catalític, mentre que les fletxes obertes marquen els residus que enllacen amb el Zn^{2+} estructural. Les seqüències són: *ScBDH*, *Bdh1p* de *S. cerevisiae*; *PpBDH*, *Bdh1p* de *P. putida*; *EcTDH*, *Tdh1p* de *E. coli*; *HsSDH*, *Sdh1p* de *Homo sapiens*; *ScADHI*, *Adh1p* de *S. cerevisiae*; *ScFALDH*, *Faldhp* de *S. cerevisiae*; *HLADH*, *Adh1p* de fetge de cavall, classe I subunitat E. (Gonzalez et al. 2000).

La conseqüència directe d'aquesta fermentació de la glucosa és una producció important d'etanol i de CO₂, el que ha fet que aquest llevat hagi estat de gran utilitat a les civilitzacions durant milers d'anys (Samuel 1996), i ho continuï siguent actualment per les indústries cervesera, vinícola i panificadora principalment. Aquest comportament la fa diferent de moltes altres espècies de llevat, com les dels gèneres *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* i moltes espècies del gènere *Pichia*, en les que, en condicions aeròbies, més del 70% de glucosa és metabolitzada a través de la respiració (Gancedo et al. 1987). A aquest comportament que presenta *S.cerevisiae*, de supresió del metabolisme respiratori causada per una elevada concentració de glucosa, se l'anomena repressió per catabolít.

La glucosa exerceix dos efectes importants en l'expressió gènica de *S.cerevisiae*: reprimeix l'expressió de molts gens, incloent aquells que codifiquen proteïnes de la cadena respiratòria, com citocroms, i també la de gens que codifiquen per a enzims necessaris en l'utilització de fonts de carboni alternatives, com galactosa, sacarosa i maltosa. Alhora, indueix l'expressió de gens requerits per a la utilització de la glucosa, com gens que codifiquen per a enzims glucolítics i gens que codifiquen proteïnes necessàries per al transport de de glucosa (Johnston 1999). En aquestes condicions de repressió per catabolít, les cèl·lules no presenten activitat respiratòria ja que per manca de citocroms la cadena de transport electrònic no esta completa., i el cicle de l'àcid cítric no és operatiu per manca de l'enzim 2-oxoglutarat deshidrogenasa.

Aquests canvis bioquímics van acompanyats de modificacions morfològiques, essent molt destacable el fet de que aquestes cèl·lules reprimides per glucosa presentin alteracions a l'estructura dels mitocondris (Boulton & Quain 2001; Visser et al. 1995). Quan s'inocula *S. cerevisiae* en un medi de cultiu que conté glucosa, en condicions aeròbies, s'obté una corva de creixement bifàsica (creixement diàuxic). En una primera fase s'observa un creixement exponencial (després de l'etapa inicial de latència), durant la qual la glucosa és fermentada a etanol, amb la conseqüent producció de CO₂. En aquesta primera fase, la

respiració esta reprimida. Un cop la glucosa ha estat metabolitzada, hi ha una segona etapa de latència, seguida d'una segona fase de creixement en la que l'etanol produït en la primera fase és metabolitzat a CO₂ i H₂O. En aquesta segona fase, la respiració està activada.

El creixement dels llevats, amb la conseqüent formació de biomassa, està caracteritzat per un consum net de NADPH i una producció neta de NADH (Gommers et al. 1988). Una part important d'aquest NADH és generat en la biosíntesi d'aminoàcids, en la que estan implicats tant enzims citosòlics com mitocondrials. Com que les concentracions intracelulars de NAD⁺ i NADH, en *S. cerevisiae*, són en total 1 mM aproximadament (de Koning & van Dam 1992), el NADH produït durant el creixement del llevat ha de ser reoxidat contínuament a NAD⁺, per a mantenir una correcta relació del balanç redox ([NAD]/[NADH]). Degut a la impermeabilitat de la membrana mitocondrial al NAD⁺ i al NADH (Jagow & Klingenberg 1970), la necessitat de mantenir un adequat balanç redox implica que el NADH ha de ser reoxidat en el compartiment celular en el que és generat.

Existeixen, un mínim de cinc mecanismes de reoxidació del NADH en *S. cerevisiae*: fermentació alcohòlica, producció de glicerol, respiració del NADH citosòlic via deshidrogenases de NADH “extramitocondrials” (en realitat están situades a la membrana mitocondrial interna, pero encarades cap a l'espai intermembrana), respiració del NADH citosòlic a través de la “llançadora” del glicerol-3-fosfat i, per últim, l'oxidació del NADH intramitocondrial per mitjà d'una deshidrogenasa de NADH present en l'interior dels mitocondris.

Les principals vies de metabolisme dels sucres estan representades en la Figura 9. Els monosacàrids són convertits majoritàriament a piruvat per la via glucolítica de Embden-Meyerhof, tot i que una petita part de la glucosa-6-fosfat és dirigida cap a la via de les pentoses, per la que s'obté NADPH, que és essencial pel metabolisme anabòlic (per exemple, la biosíntesi de lípids).

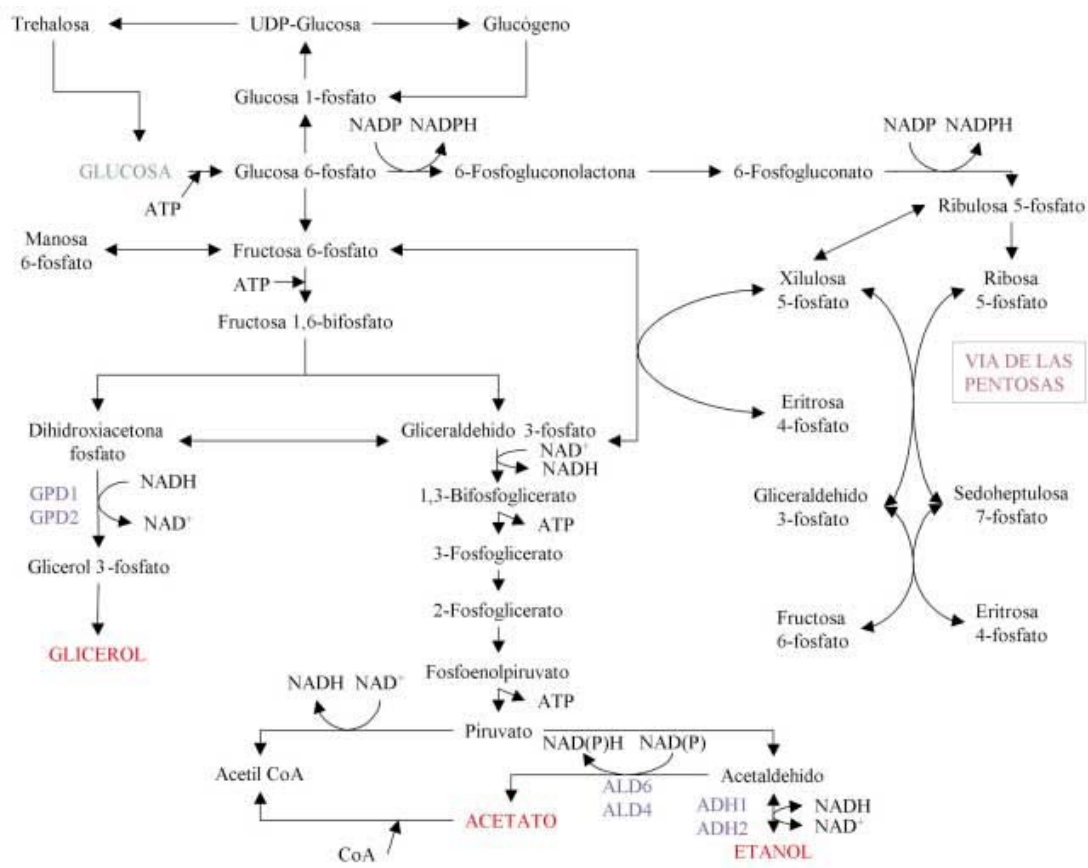


Figura 9. Principals rutes metabòliques dels sucres. S'hi observen les vies que porten a la producció de glicerol, acetat, etanol, així com la via de les pentoses.

L'acció de les ADHs de llevat implicades en el metabolisme de l'etanol, permet la coordinació entre el metabolisme "fermentatiu" i l'"oxidatiu" del carboni, utilitzant-se de forma òptima els carbohidrats. Així doncs, a altes concentracions de sucre (hi hagi o no disponibilitat d'oxigen), opera la fermentació alcohòlica i l'enzim ADHI serveix per regenerar NAD⁺ (usat en part per la reacció catalitzada per l'enzim gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa), catalitzant la reducció de l'acetaldehid a etanol.

Quan s'ha utilitzat tot el sucre té lloc l'oxidació de l'etanol, per acció de l'enzim ADHII, en una reacció que utilitza NAD⁺ i regenera NADH, amb la conseqüent producció d'acetaldehid. Aquest acetaldehid serà oxidat a acetat per acció de les aldehid deshidrogenases, i l'acetat transformat en acetilcoA (Figura 9). Totes aquestes reaccions s'esdevenen tan en el citosol com en els mitocondris. En els

mitocondris, l'acetil CoA entra en el cicle de l'àcid cítric obtenint-se ATP per a la següent fosforilació oxidativa. La regeneració del NAD^+ (necessària ja que les oxidacions de l'etanol i de l'acetaldehid utilitzen NAD^+ , produïnt NADH), en aquestes condicions, té lloc, principalment, per acció de la cadena de transport electrònic.

Alcohol Deshidrogenases (ADHs)

Les alcohol deshidrogenases (ADHs), pertanyen a la classe enzimàtica de les oxidoreductases, i es defineixen com els enzims que catalitzen la oxidació reversible d'alcohols als corresponents aldehids o cetones, amb reducció de NAD o NADP (Jörnvall et al. 1987; Reid & Fewson 1994)

Existeixen almenys tres famílies d'alcohol deshidrogenases amb estructures diferents: les deshidrogenases/reductases de cadena mitja (MDRs), les deshidrogenases/reductases de cadena curta (SDRs) i les alcohol deshidrogenases activades per ferro (Persson et al. 1994). En aquest treball, ens centrarem en les propietats i funcions metabòliques de les ADHs que hem emprat: Adh1p i Adh2p, que són dependents de Zn^{2+} i pertanyents a la família de les MDRs.

Alcohol deshidrogenasa 1 i Alcohol deshidrogenasa 2 (Adh1p i Adh2p)

Els enzims Adh1p i Adh2p tenen, ambdós, 348 aminoàcids. Difereixen entre ells per tan sols 22 aminoàcids, presentant una identitat de seqüència mútua del 93%. Els dos són tetràmers i es troben en el citoplasma (Wills & Jörnvall 1979; Ciriacy 1975). L'enzim Adh1p ha estat cristal·litzat i determinada la seva estructura 3-D (Raj et al. 2014) (Figura 10). Són dels membres de les MDRs que uneixen dos àtoms de Zn^{2+} per subunitat (Zn-catalític i Zn-estructural). En el tetràmer s'han vist dos tipus diferents d'unió al Zn-catalític: en la conformació "tancada" està coordinat als residus Cys-43, His-66, Cys-153 i a l'oxigen del substrat. En la conformació "oberta" el Zn-catalític està coordinat als residus

Cys-43, His-66 , Glu 67 i Cys-153 (amb l'oxigen del substrat unit a la segona esfera de coordinació). El Zn^{2+} estructural està coordinat per les Cys situades en les posicions 97, 100, 103 y 111. Tindria una funció d'estabilització de l'estructura terciària dels enzims (Magonet et al. 1992). El mecanisme catalític que segueixen ambdós enzims és seqüencial i ordenat, unint-se abans el coenzim que l'etanol, i separant-se també abans el coenzim que el producte, un cop donada la catàlisi.

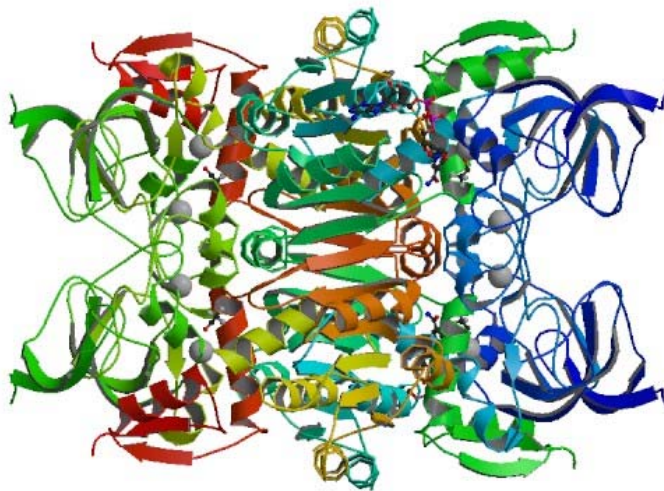


Figura 10. Estructura tridimensional de la Adh1p. Les cadenes de la proteïna estan colorejades amb un espectre de gradient de color d'arc iris des de el N-terminal fins al C-terminal (Raj et al. 2014)

Les constants cinètiques dels enzims Adh1p i Adh2p són molt semblants, excepte la K_M (etanol) i la K_M (acetaldehid) que són més baixes (entre 7 i 20 vegades) per Adh2p que per Adh1p (per tant, la afinitat de l'enzim Adh2p vers l'etanol i l'acetaldehid és de 7 a 20 vegades més gran que la de l'enzim Adh1p). De totes maneres, la constant catalítica per la reacció d'oxidació de l'etanol és unes tres vegades superior per l'Adh1p (340 sec^{-1}), que per l'Adh2p (130 sec^{-1}). El patró d'activitat d'aquests dos enzims front els alcohols primaris mostra un "doble pic". El primer és el que correspon a l'etanol, després disminueix fins al pentanol, i tot seguit augmenta fins al decanol (Dickinson & Dack 2001). L'activitat enzimàtica front butanol, pentanol i hexanol és molt baixa pels dos enzims (Ganzhorn et al. 1987).

També s'ha estudiat l'activitat de Adh1p i Adh2p enfront diols α,ω i s'ha vist que tant Adh1p com Adh2p són molt poc actius amb diols de longituds entre C₂ i C₆. S'observa, però, un augment de l'activitat amb diols en cadenes hidrocarbonades molt llargues, desde C₈ fins a C₁₆. Sembla ser, doncs, que l'afinitat de l'àrea del centre actiu, responsable d'exercir interaccions hidrofòbiques, és molt baixa per grups alquil petits. Amb cadenes alifàtiques llargues (de C₈ fins a C₁₆) hi ha una interacció més forta, tal com passa amb els alcohols primaris (Dickinson & Dack 2001). Ambdós enzims són molt poc actius amb alcohols cíclics, com el ciclohexanol i el benzil alcohol. El patró d'activitat que mostren pels aldehids és molt semblant al mostrat pels alcohols. Tenen activitats elevades per l'acetaldehid i pel 1-decanal, i molt inferiors per la resta d'aldehids (pel 1-butanal i el 1-hexanal són el 5% de l'activitat mostrada davant l'acetaldehid).

L'especificitat de substrat de l'Adh1p s'ha estudiat a nivell molecular mitjançant tècniques de mutagènesi dirigida, i s'ha arribat a la conclusió de que l'accessibilitat a la butxaca d'unió de substrat és diferent entre la Adh1p i la ADH de cavall, de la que se'n coneix l'estructura tridimensional. De fet, el patró d'activitat per a l'oxidació d'alcohols primaris de la ADH de cavall és molt diferent al mostrat per Adh1p i Adh2p de llevat (augmenta des de l'etanol fins a l'octanol, i disminueix progressivament fins al tetradecanol).

Ja s'ha mencionat anteriorment que Adh1p és el principal enzim implicat en la producció d'etanol a elevades concentracions de sucre (durant la fermentació alcohòlica). Si es fa créixer en glucosa cèl·lules que tenen l'enzim deletat (*adh1Δ*), creixen lentament i produeixen nivells baixos d'etanol, alhora que acumulen acetaldehid, acetat i glicerol (Wills & Jornvall 1979; Ciriacy 1976; Drewke et al. 1990). En aquestes cèl·lules, la regeneració del NAD utilitzat en la glucòlisi es duu a terme per acció de les NADH deshidrogenases situades a la cara externa de la membrana mitocondrial interna (producte dels

gens *NDE1* i *NDE2*). També podria intervenir en aquest procés la “llançadora” del glicerol-3-fosfat.

Per la seva banda, l’Adh2p és el principal enzim encarregat de l’oxidació de l’etanol a acetaldehid (figura 11), que és la primera etapa necessària per a poder créixer utilitzant l’etanol com a font de carboni. En aquestes condicions, l’Adh2p és l’alcohol deshidrogenasa més abundant en la cèlula.

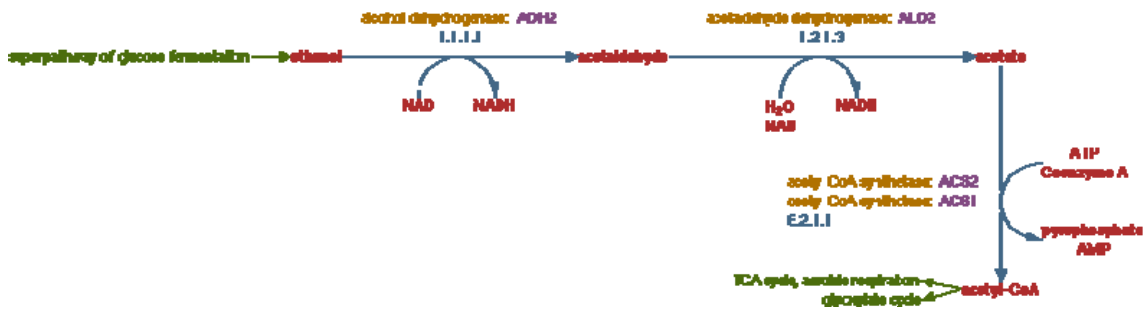


Figura 11. Ruta metabòlica on intervé Adh2p. L’Adh2p és activa en absència de sucres fermentables i en presència d’etanol, el qual transforma en acetaldehid, que acabarà produint acetil-CoA.

Pel que fa a la regulació, els nivells dels enzims Ah1p i Adh2p depenen de la disponibilitat de sucres fermentables, i es duu a terme mitjançant inducció/repressió de la transcripció dels gens respectius (Ciriacy et al. 1997). Així doncs, el nivell d’Adh1p augmenta de 5 a 10 vegades en presència de glucosa o altres sucres fermentables. El canvi d’expressió ve determinat per un increment del mRNA de l’enzim en aquestes condicions (Denis et al. 1983), mitjançant els factors de transcripció Rap1p i Gcr1p.

Per la seva part, el gen *ADH2* només s’expressa en absència de glucosa o altres fonts de carboni fermentables. El principal activador de l’expressió del gen *ADH2* és *ADR1*, que codifica per a una proteïna que s’uneix al promotor de *ADH2* i que és essencial per a la seva transcripció. L’acció de la proteïna Adr1p depèn de múltiples quinases, com *SNF1* o *SCH9*. D’altra banda, el promotor del gen *ADH2* té una segona seqüència a la que poden unir-se diferents proteïnes que

afecten a la transcripció d'aquest gen. Així, la regulació d'*ADH2* per la glucosa depèn de múltiples factors (Denis & Audino 1991; Donoviel et al. 1995).

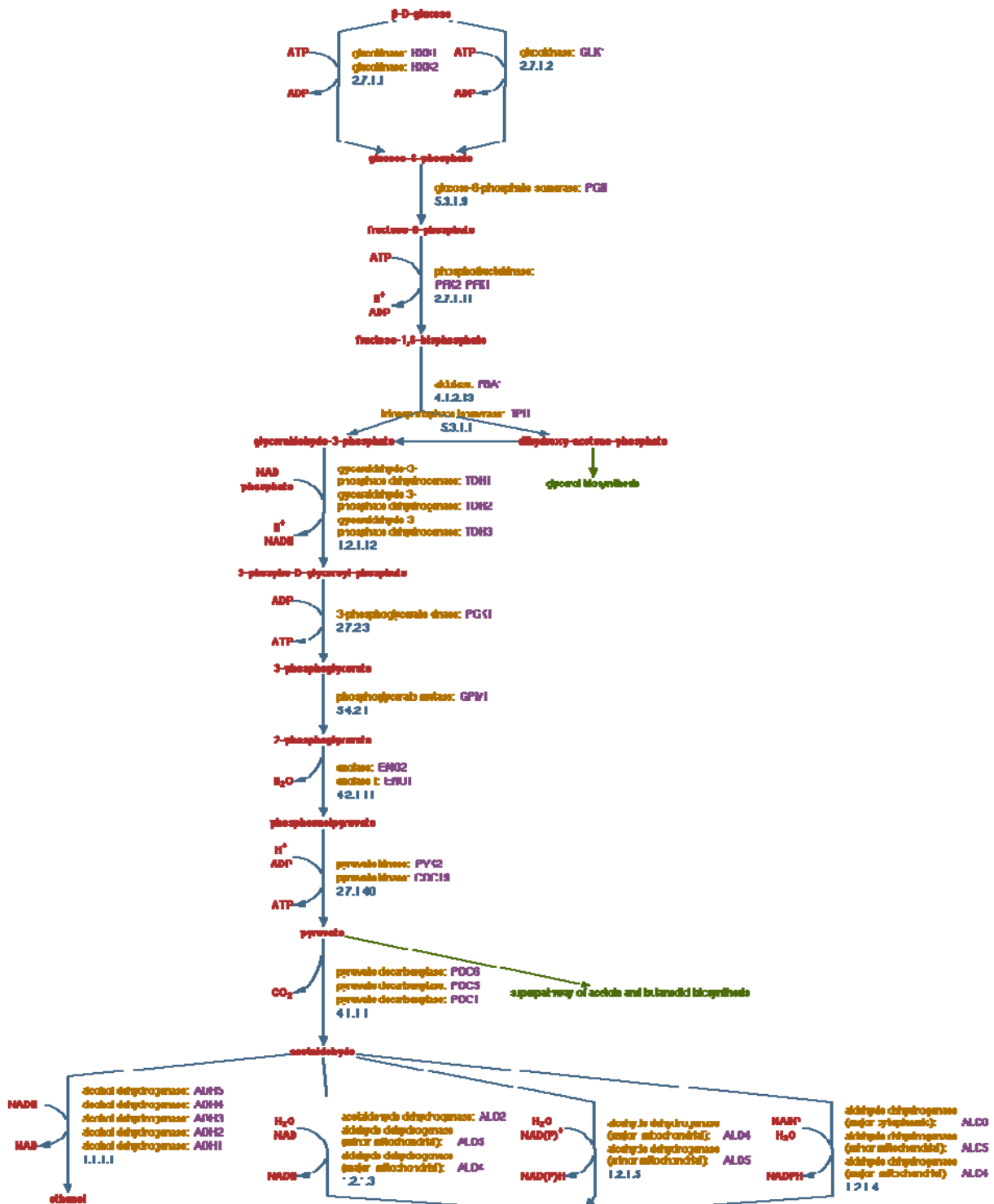


Figura 12. Ruta metabòlica global de la glucosa. S'hi observa la formació de piruvat a partir de la glucosa, el qual pot desviar-se cap a la via de formació d'acetoina i 2,3-butanodiol vista abans, o bé formar acetaldehid, que serà transformat en acetat o en etanol via fermentació, gràcies a l'acció de les ADHs.

La família de les Aldo-ceto reductases (AKRs)

Són una superfamília de proteïnes evolutivament conservades de bacteris a humans. Són oxidoreductases dependents de NAD(P)H, que actuen reduint aldehyds i cetones a alcohols primaris i secundaris respectivament. S'han identificat més de 150 enzims (<http://www.med.upenn.edu/akr/>) en un grup ampli d'organismes procariotes i eucariotes, que tenen una longitud mitja de 320 aminoàcids. Solen ser citosòlics i monomèrics i utilitzen NADP(H) com a coenzim, metabolitzant molts tipus diferents de substrats: aldehyds, cetones, monosacàrids, cetoesteroids, ceto-prostaglandines, carcinògens químics i els seus metabòlits, entre d'altres

En base a la similitud de seqüència, es divideix la superfamília en 15 famílies (AKR1-AKR15), les quals contenen a la vegada múltiples subfamílies (AKR1A-AKR1E). Els membres que formen les subfamílies tenen almenys un 60% d'identitat de seqüència entre ells (Mindnich & Penning 2009).

S'ha cristallitzat i determinat l'estructura de 25 membres d'aquesta superfamília, mostrant una estructura 3D conservada $(\alpha/\beta)_8$ -TIM barrel amb tres llargs loops associats (Figura 13). Dins del cor hidrofòbic, o butxaca hidrofòbica del barril hi ha el centre actiu, de forma que els substrats interaccionen amb aminoàcids provinents dels tres loops variables que sobresurten del barril. La conservació de seqüència és baixa en aquests loops, si es compara amb la de les hèlixs α i fulles β del barril.

En els complexos terciaris dels enzims d'aquesta superfamília, el lloc d'unió al cofactor (N-terminal) i el lloc d'unió del substrat convergeixen en el centre actiu. Aquest està format per la tètrada catalítica formada pels residus Asp50, Tyr55, Lys84 i His117 (numeració basada en la proteïna AKR1C9). El mecanisme sol ser ordenat bi-bi i de catàlisi àcid-base general. Primer s'uneix el cofactor i en la direcció de reducció, l'hidrur pro-*R* del NADPH es transfereix al carbonil, seguit per la protonació de l'oxigen carbonílic per una Tyr (Figura 13).

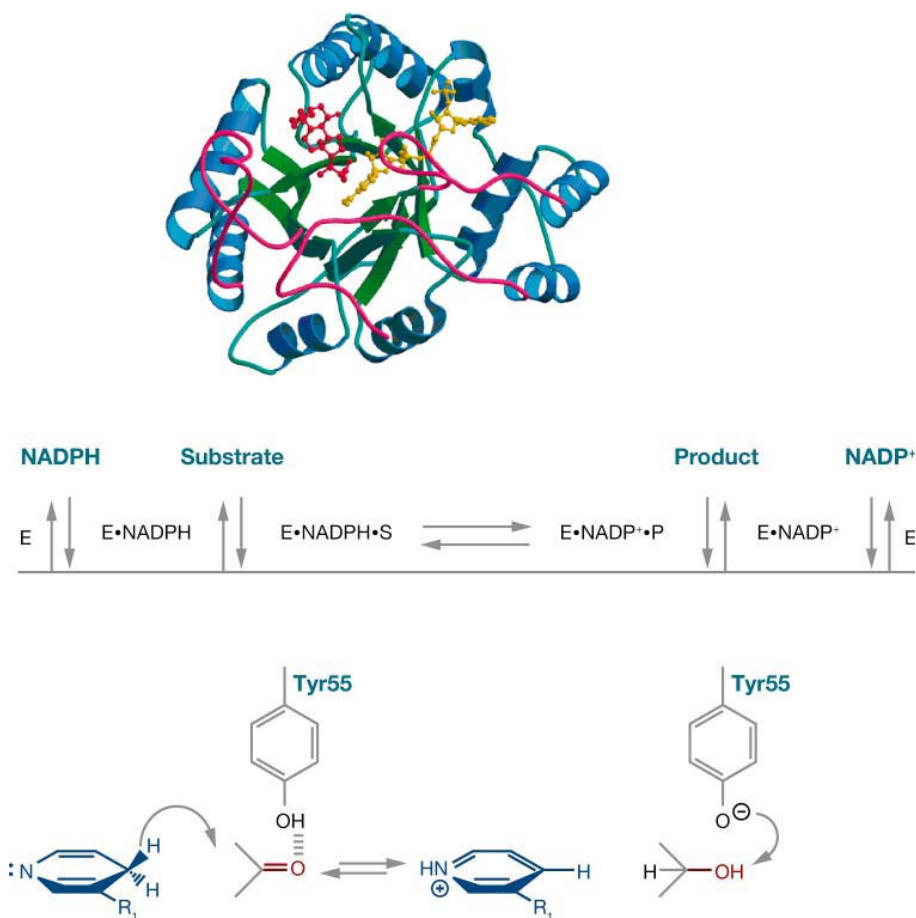


Figura 13. Estructura del $(\alpha/\beta)_8$ -TIM barrel, i mecanisme químic i cinètic de la reducció del grup carbonil catalitzada per les AKRs. A dalt, en blau s'hi mostren les helix α , en verd les fulles β , en rosa els 3 *loops* associats, en vermell el substrat i en groc el coenzim. Al mitg es pot observar l'ordre del mecanisme catalític, i a baix la transferència de l'hidrur del NADPH al grup carbonil, que és estereoespecífica. (Jin & Penning 2007)

La conservació dels residus de la tètrada catalítica és molt gran, exceptuant potser, la His117 (que es troba en el 88% de totes les AKRs anotades) i que de vegades està substituïda per Glu. Alguns membres, com les ρ -cristal·lines en les lens d'amfíbis sembla que s'empren per raons estructurals en aquest teixit, havent perdut quasi tota la seva activitat enzimàtica

En humans, aquestes proteïnes estan implicades en el metabolisme de varis substrats que inclouen fàrmacs, carcinogens, aldehids reactius, i també

estan involucrades en malalties que presenten un excés d'aldoses. Alguns agents emprats en quimioteràpia, com la daunorubicina i doxorubicina són reduïts per AKRs donant alcohols secundaris que són tòxics pel cor, el que limita l'ús clínic dels fàrmacs parentals. També se els ha implicat en la activació d'alguns hidrocarburs aromàtics políciclics presents al fum del tabac, gasos d'escapament de vehicles, etc., de forma que els productes resultants actuarien com carcinògens pulmonars (Jin & Penning 2007).

Les bases de dades de famílies proteïques, com PFAM o SUPERFAMILY, identifiquen 16 AKRs en *S. Cerevisiae*. D'aquestes, n'hi ha 7 amb una identitat de seqüència molt gran, que s'han classificat com aril alcohol deshidrogenases que actuen sobre substrats derivats de la lignina (com trans-cinamaldehyd, o 3,4-dimetoxi-benzaldehyd) (Delneri et al. 1999).

Sis altres AKRs de llevat codifiquen per proteïnes amb seqüència similar, entre el 30-44 % d'identitat, a la aldosa reductasa humana i, se les ha implicat en diferents papers fisiològics, com metabolització d'arabinosa i xilosa, i també com proteïnes que s'induirien en situacions d'estrès oxidatiu (Chang & Petrash 2008; Träff et al. 2001; Kratzer et al. 2006; González et al. 2010).

S'ha vist recentment que algunes AKRs de llevat s'uneixen a RNA, com Gre3p, Ydl124p i Gcyp (Scherrer et al. 2010; Tsvetanova et al. 2010)

Si bé bona part de l'interès que hi ha darrere l'estudi de les AKRs recau en la seva implicació en el desenvolupament de malalties humanes, hi ha un considerable interès en el seu ús com a biocatalitzadors. Així, gràcies a la seva capacitat de reduir de forma estereoselectiva grups carbonil, es poden obtenir compostos, com alcohols quirals, que s'utilitzen en la síntesi d'agents antitumorals, com ara el taxol (Feske et al. 2005), antidepressius i inhibidors de la proteïna β -amiloid (Hoyos et al. 2010). S'han descrit aplicacions tecnològiques de proteïnes de les AKRs, com l'obtenció d'etanol a partir de xilosa (Hahn-Hägerdal et al. 2001; Wilson et al. 2003), i la reducció enantioselectiva de grups carbonil proquirals (Wills & Hannedouche 2002).

Arabinosa Deshidrogenasa (Ara1p)

L'enzim Ara1p, codificat pel gen *ARA1* (*YBR149W*), és una aldoceto-reductasa, amb activitat arabinosa deshidrogenasa, dependent de NAD(P)⁺ involucrada en el metabolisme de carbohidrats, catalitzant reaccions d'oxidació de L-xilosa, L-fucosa i L-galactosa. La reacció per la qual rep el nom és l'oxidació de la D-arabinosa a D-arabinono-1,4-lactona acompanyada de la reducció de NAD(P)⁺ a NAD(P)H:



Juntament amb el gen *ARA2* se els ha considerat que intervindrien en la síntesi de l'equivalent a l'àcid ascòrbic d'animals i plantes, que en molts fongs és l'àcid eritroascòrbic. La síntesi de l'àcid eritroascòrbic des de arabinosa està formada per dues reaccions consecutives catalitzades per un enzim amb activitat D-arabinosa deshidrogenasa i un altre amb activitat D-arabinono- γ -lactona oxidasa (Figura 14). Encara que els gens *ARA1* i *ARA2* de llevat s'han associat a la primera reacció de la via, l'elevat valor de la K_M de Ara1p per D-arabinosa (160 mM, quan la seva concentració intracel·lular seria menor a 100 mM), sugereix que Ara2p seria més rellevant en la catàlisi d'aquesta etapa: la K_M de Ara2p per D-arabinosa està al voltant de 1 mM i resultats d'experiments de deleció de *ARA1* i *ARA2* confirmen que Ara2p contribueix a la major part de síntesi d'àcid eritroascòrbic:

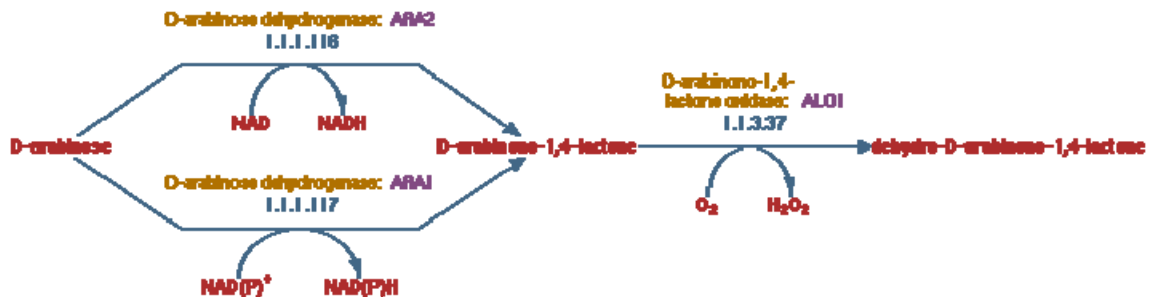
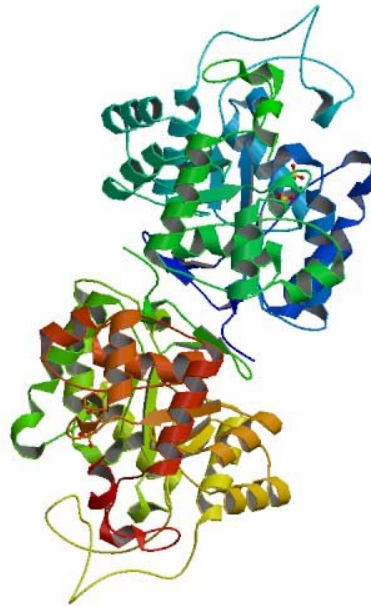


Figura 14. Ruta metabòlica en la que participa Ara1p. S'hi observa la formació de D-arabinono-1,4-lactona gràcies a Ara1p (o Ara2p), i la posterior transformació d'aquesta en l'equivalent de l'àcid ascòrbic, dehidro-D-arabinono-1,4-lactona

Es considera actualment que Ara1p actua com una α,β -dicarbonil reductasa implicada en la detoxificació de compostos com metil glioxal, diacetil i 2,3-pentàdiona, coneguts intermediaris tòxics generats en el metabolisme del llevat. La estructura 3-D de Ara1p s'ha obtingut recentment (Hu et al. 2013) i s'ha vist que és un dímer en el que cada subunitat adopta la topologia d'un barril $(\alpha/\beta)_8$ amb 8 cadenes β paral·leles que alternen amb 8 hèlixs α (Figura 15). Un dels cristalls obtinguts ho ha estat amb NADPH, amb el que s'han assignat els residus que interaccionen amb el coenzim (A249, S250, A248, L251, N268 i R291 interaccionen amb l'anell adenina per interaccions de van der Waals), el grup fosfat està fixat per S286, L287 i R291 i el grup hidroxil de la ribosa de la adenosina per R285. L'anell de nicotinamida està localitzat en una cavitat en la que forma ponts d'hidrogen amb Q214 i S192. Malgrat que no es varen poder obtenir cristalls ternaris (ni amb diacetil, ni amb 2,3-pentàdiona), per modelatges amb els programes HADDOCK i WHISCY s'ha proposat un model per la unió d'aquests compostos dicarbonílics. Anteriorment ja s'havia validat la seva activitat α,β -dicarbonil reductasa (van Bergen et al. 2006).

Figura 15. Estructura tridimensional de l'Ara1p. Les cadenes de la proteïna estan colorejades amb un espectre de gradient de color d'arc iris des de el N-terminal fins al C-terminal (Hu et al. 2013).



AKR1B1 i AKR1B10 (humanes)

Les AKRs humanes AKR1B1 i AKR1B10 estan sobreexpressades en molts tipus de càncers (de pulmó, fetge i mielomes, entre d'altres) i subexpressades en d'altres (colon i pròstata, per exemple) (Laffin & Petrash 2012). Tenen un 70% d'identitat de seqüència i molta similitud estructural (Gallego et al. 2007) (Figura 16).

Tenen diferent distribució tisular (AKR1B1 és ubicua, mentre que AKR1B10 està enriquida en el tracte gastrointestinal) i mostren activitat envers molts compostos xenobiòtics, reduint els seus grups carbonil (peròxids lipídics, retinal, hidrocarburs policíclics i agents anticancerígens, entre d'altres). Entre els substrats més proclius en quan al seu paper patològic estan els compostos carbonílics $\alpha\beta$ -insaturats, que es produeixen durant el metabolisme de lípids, carbohidrats, aminoàcids, etc.

Són dianes de molts fàrmacs per estar implicades en les complicacions de la diabetes (AKR1B1, que és l'enzim aldosa reductasa) i en càncers (sobretot AKR1B10, però també AKR1B1), de forma que es busquen inhibidors selectius (Zhang et al. 2013) (Figura 16).

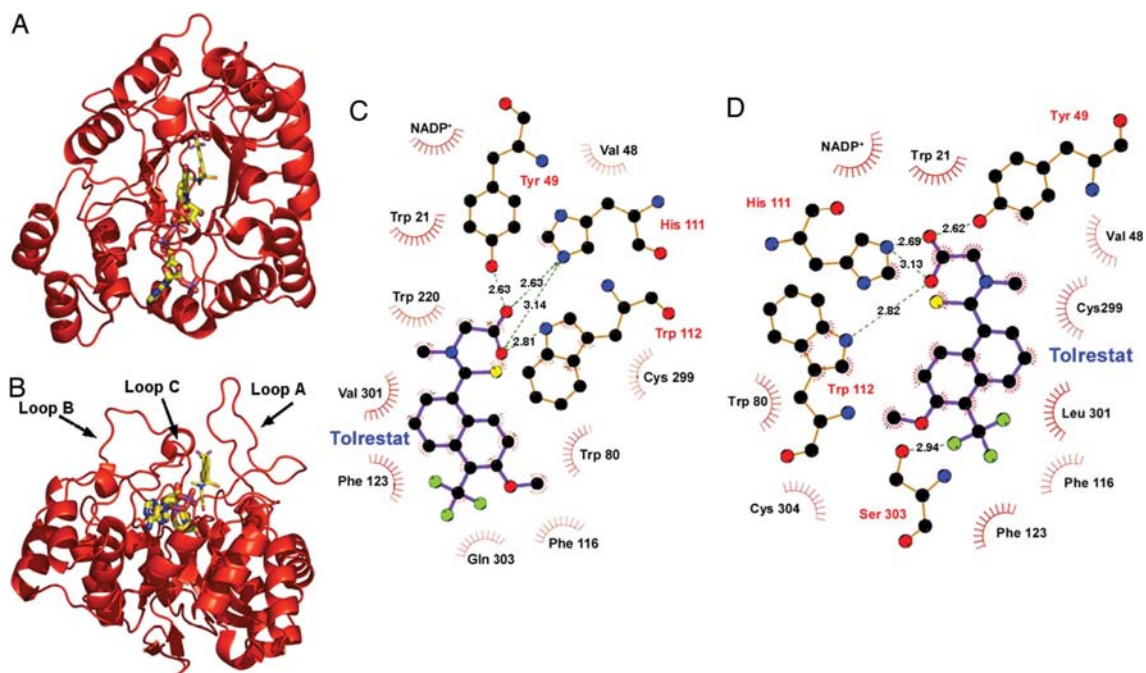


Figura 16. Estructura tridimensional de la AKR1B10. Estructura cristalina de la AKR1B10 en complex amb NADP⁺ i tolrestat. (A) Vista des de dalt del (α/β)₈-TIM barrel, on el centre catalític es veu en el centre de l'estructura. (B) Vista del (α/β)₈-TIM barrel en rotació de 90° respecte a l'anterior. (C) *LIGPLOT* on s'observen les interaccions de la molècula de tolrestat en el complexe AKR1B10–NADP. (D) *LIGPLOT* on s'observen les interaccions de la molècula de tolrestat en el complexe AKR1B1–NADP. (Gallego i cols., 2007)

Diacetil, 2,3-pentàdiona, acetoïna i 2,3-butanodiol.

S. cerevisiae produeix una gran quantitat de metabolits durant el creixement, tan si és en metabolisme aeròbic com anaeròbic. Produeix aproximadament entre 600 i 800 compostos, entre ells etanol, diòxid de carboni, alcohols de cadena llarga, àcids, èsters, compostos de sofre,..., i dicetones veïnes (VDKs: diacetil i 2,3-pentàdiona són les més importants pel que fa a la fabricació de cervesa). La formació dels diferents productes depèn en gran mesura del balanç metabòlic general (Stewart & Russell 1986). Hi ha molts factors que poden influir en aquest balanç, com els productes d'origen, la soca de llevat escollida o les condicions de fermentació. Diacetil (2,3-butàdiona) i 2,3-pentàdiona es produeixen durant el metabolisme del llevat i es generen per descarboxilació del α -acetolactat i del α -

aceto- α -hidroxibutirat, dos intermediaris que es generen en la biosíntesi de la valina i l'isoleucina respectivament (veure figura 7). Tenen un umbral organolèptic molt baix (0.15 ppm pel diacetil i 0.9 ppm per la 2,3-pentàdiona) i estan considerats com “desagradables” conferint un olor mantegós (Jackson &

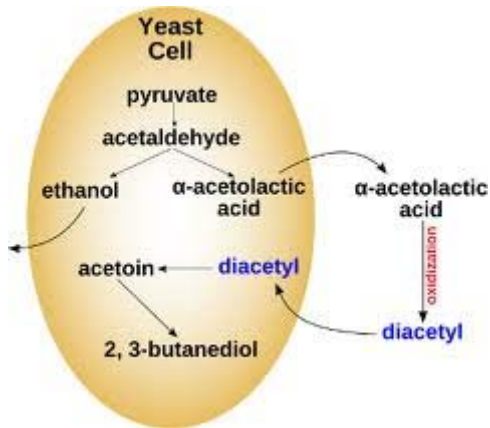


Figura 17. Esquema del cicle del diacetil respecte d'una cèl·lula de llevat en fermentació

Linskens 2002). Una de les raons principals per dur a terme la maduració de la cervesa obtinguda en la fermentació primària, és disminuir el contingut en diacetil i 2,3-pentanodiona. Durant la fermentació, els precursors de les dicetones són excretats de la cèl·lula, sofrint una descarboxilació oxidativa espontània, donant diacetil i 2,3-pentàdiona (Figura 17).

En la part final de la fermentació aquestes VDKs són metabolitzades per reductases de llevat, donant acetoïna, 2,3-butanodiol i 2,3-pentanodiol bàsicament. Aquests compostos persisteixen a la cervesa, però donat que tenen un umbral organolèptic més alt, són tolerats.

Cal ressaltar que els α,β -dicarbonils, com el diacetil, són compostos altament reactius, i poden reaccionar amb residus de arginina, cisteïna i lisina amb el perill de provocar cross-linking de proteïnes (Oya et al. 1999) (Lundblad, 1995)

Donat que el procés de maduració requerit per eliminar el diacetil és llarg, d'una a tres setmanes, s'han desenvolupat estratègies per escurçar-lo. Una d'elles, basada en l'ús de soques amb baixa activitat α -acetolactat sintasa (el producte del gen *ILV2*) (Figura 7), aconseguia disminuir la producció d' α -acetolactat, amb el que s'aconseguia disminuir la producció de diacetil a la meitat del que produïa la soca parental (Gjermansen et al. 1988). Una altra estratègia

consistia en augmentar el flux a través de la ruta de biosíntesi de la valina, amb el propòsit de minimitzar la producció de diacetil des del α -acetolactat. Això s'aconsegueix sobreexpressant el gen *ILV5*, que converteix el α -acetolactat a 2,3-dihidroxiisovalerat, integrant múltiples còpies d'aquest gen en una soca cervesera (Mithieux & Weiss 1995). Una altra estratègia possible, que no té l'inconvenient d'interferir amb el metabolisme de la valina o la isoleucina, consisteix en integrar el gen de la α -acetolactat descarboxilasa d'*Enterobacter aerogenes* en el genoma del llevat, obtenint-se una soca recombinant amb una producció molt baixa de diacetil (Fujii et al. 1990). Això succeeix gràcies a que la α -acetolactat descarboxilasa converteix el α -acetolactat en acetoïna minimitzant la producció de diacetil. De totes formes, la integració de gens foranis a soques cerveseres té percepció negativa per la societat, essent més acceptable la manipulació del propi genoma del llevat, per alterar el flux de les vies que porten a la síntesi dels α -cetohidroxi àcids. Finalment, una estratègia seguida pel nostre grup, consisteix en la sobreexpressió del propi gen del llevat *BDH1*, capaç de reduir el diacetil, i també l'acetoïna a 2,3-butanodiol. Apart de *Bdh1p*, s'han identificat altres proteïnes que poden reduir el diacetil, com els diferents Oye (Old Yellow Enzyme), la D-Arabinosa Deshidrogenasa (*Ara1p*) i les diferents *Adhs*.

El diacetil és també important per la indústria alimentària en la mesura que és un additiu emprat per a donar aroma i sabor, com per exemple en les crispetes, a les que els hi dona l'aroma mantegós. Donat que es forma en les fermentacions de molts microorganismes (sobretot bacteris), se'l considera un "producte natural" (la Unió Europea considera "producte natural" tot allò sintetitzat per qualsevol font biològica, ja siguin cèl·lules o enzims).

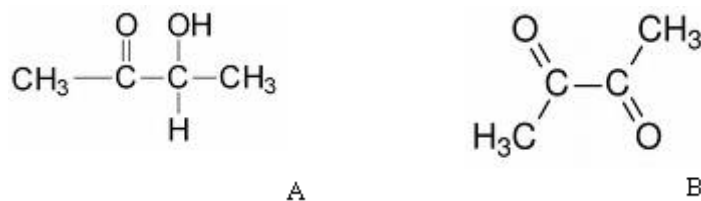


Figura 18. A) Acetoïna. B) Diacetil.

De totes formes, nivells massa elevats de diacetil s'ha vist que tenen efectes tòxics per la salut cel·lular i se l'ha trobat associat a malalties neurodegeneratives, i en general a envelliment celular. S'ha demostrat la implicació del diacetil (i també del metilglioxal) en diverses malalties/disfuncions en cèl·lules de mamífer, com problemes vasculars diabètics (Brownlee, 1995), malalties neurodegeneratives, i envelliment celular (Wondrak *et al.*, 2002).

La 2,3-pentanodiona, també coneguda amb el nom de acetil propionil, és la dicetona vicinal del diacetil (2,3-butanodiona). S'utilitza per a diverses finalitats com a solvent per a pintures, tintes o laques. També s'utilitza com a component inicial de pesticides, tinys i inclús fàrmacs. Com el diacetil, té un ús important en la indústria d'aromes i sabors artificials perquè té un aroma que es pot descriure com a mantegós, de formatge, dolç, de caramel. Aquest paper de la 2,3-pentanodiona, com en el cas del diacetil, és controvertit, degut a la seva toxicitat. S'ha utilitzat com a agent aromàtic en el líquid que s'utilitza per als cigarrets electrònics, però un estudi demostra que causa lesions fibròtiques de les vies respiratòries, tant intraluminals com intramurals, en rates (Morgan *et al.* 2012).

Les α -hidroxicetones, com la acetoïna, s'utilitzen àmpliament en la indústria farmacèutica com a intermediaris per a l'elaboració de diferents composts d'interès, com antidepressius, compostos antitumorals, inhibidors (inhibidor de la proteassa HIV), etc. La obtenció de α -hidroxicetones pot ser mediada per l'acció d'enzims o de cèl·lules, a partir de substrats determinats,

com dicetones. L'acetoïna s'usa sobretot com a aroma o essència per a potenciar sabors en la indústria alimentària.

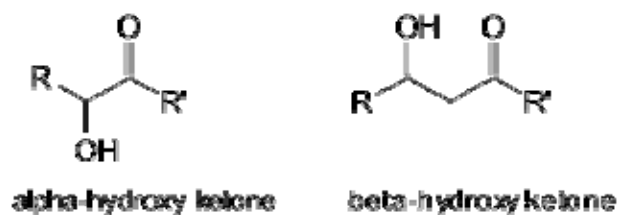


Figura 19. Diferència entre α -hidroxicetona i β -hidroxicetona

El 2,3-butanodiol pot existir en tres formes estereoisomèriques: (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol, (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol i (*meso*)-2,3-butanodiol (Figura 20).

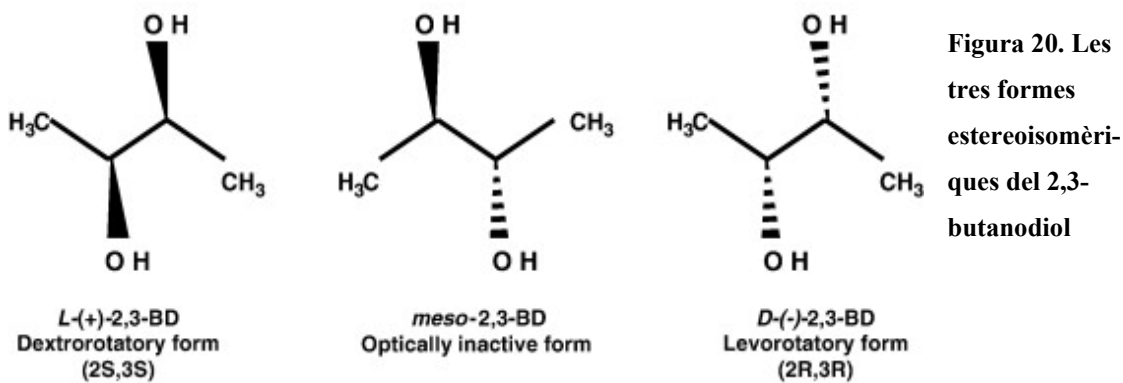


Figura 20. Les tres formes estereoisomèriques del 2,3-butanodiol

Aquest és un compost amb múltiples aplicacions industrials. Darrerament, hi ha hagut un important desenvolupament en el camp de les bio-refineries, amb el bio-fuel (etanol), gràcies a la búsqueda d'alternatives al petroli, degut a la paulatina desaparició d'aquest i a la elevada pol·lució que se'n deriva. El 2,3-butanodiol n'és una alternativa, com a combustible, inclús per avions, degut a la seva elevada tasa d'octans. Té un *heating value* (27,2 kJ/g) semblant als de l'etanol (29,1 kJ/g) i el metanol (22,1 kJ/g). També és útil, com a reservori (*feedstock*), en substitució de petroli, per a l'elaboració d'olis i altres productes químics. De fet, actualment ja n'existeix producció biotecnològica, amb bacteris, concretament dels gèneres *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Enterobacter* i *Klebsiella*. Es va començar la seva producció industrial, química, a principis de segle, i durant la segona guerra mundial va tenir una producció elevada. Després

de la guerra, va prendre més volada la refinació de fuels fòssils. La deshidratació del 2,3-butanodiol porta a la formació d'un solvent industrial molt important i utilitzat anomenat metil-etil-cetona. Aquest és un molt efectiu additiu pels fuels, i té una calor de combustió més elevada que l'etanol. També s'utilitza com a solvent per a resines i laques.

Si segueix endavant la deshidratació, es produeix 1,3-butadiè, que és la base amb la que es fabrica la goma, cautxú, sintètic.

Té potencialment moltes aplicacions, com per exemple per la fabricació de cartutxos de tinta, perfums, fumigants, agents humidificants, per estovar, i per donar sabors en l'indústria alimentària, anticongelants, explosius, plàstics i fàrmacs.

Estereoisòmers

De totes les dicetones veïnes utilitzades en aquesta tesi se'n poden obtenir α -hidroxicetones i diols si es redueixen. Cada una de les hidroxicetones obtingudes d'aquestes reaccions són estereoisòmers *R* o *S*. A més, en les molècules no simètriques (2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona) existeixen dos possibles productes diferents quan es redueixen, a part de les dues formes estereoisomèriques *R* i *S*.

Les dues dicetones simètriques utilitzades en aquest estudi són el diacetil i la 3,4-hexanodiona:

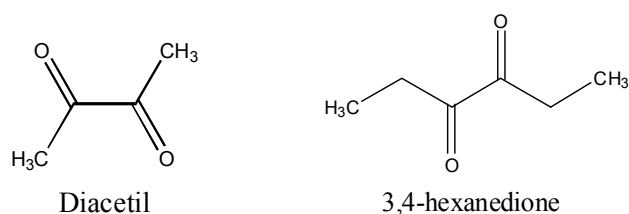


Figura 21. Dicetones simètriques. Les dues dicetones simètriques emprades, diacetil i 3,4-hexanodiona.

Quan es redueixen, se n'obté una mateixa molècula que pot ser *R* o *S*, en funció de l'especificitat de l'enzim usat. En el cas del diacetil, és l'acetoïna, que pot ser:

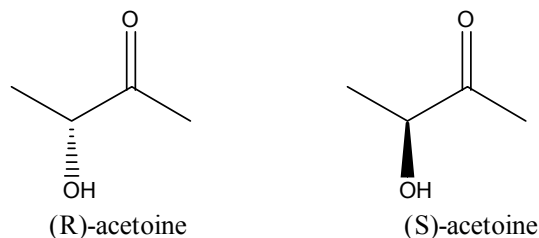


Figura 22. Les dues configuracions possibles de l'acetoïna. Quan es redueix el diacetil, es poden obtenir, en funció de l'estereoespecificitat de l'enzim, dues configuracions, la *R*-acetoïna o la *S*-acetoïna.

Quan reduïm aquestes hidroxiketones, el grup ceto pot prendre altre cop les dues configuracions, obtenint-se així els tres possibles enantiòmers del 2,3-butanodiòl de la figura 20.

Amb les dicetones no simètriques utilitzades, és possible obtenir 4 hidroxiketones diferents, enlloc de dues, i 4 diòls diferents enlloc de 3.

Prenem la 2,3-pentanodiona com a exemple de molècules no simètriques, i amb la 2,3-hexanodiona passaria exactament el mateix.

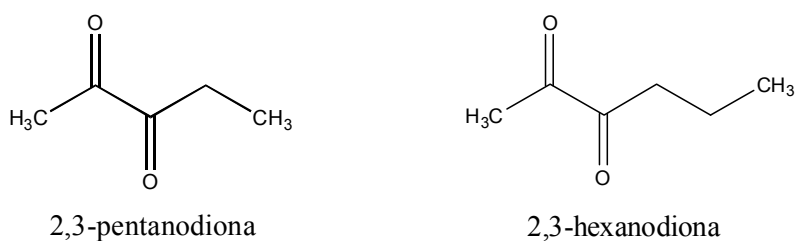


Figura 23. Dicetones no-simètriques. Les dues dicetones no-simètriques emprades, la 2,3-pentanodiona i la 2,3-hexanodiona.

Si reduïm la 2,3-pentanodiona, l'enzim pot actuar sobre el carboni 2, obtenint la 2-hidroxil, 3-pentanona, o bé sobre el carboni 3 obtenint la 3-hidroxil, 2-pentanona. I a més, en funció de l'estereoespecificitat de l'enzim, cada una d'elles pot estar en configuració *R* o *S*, com es veu a la figura 24.

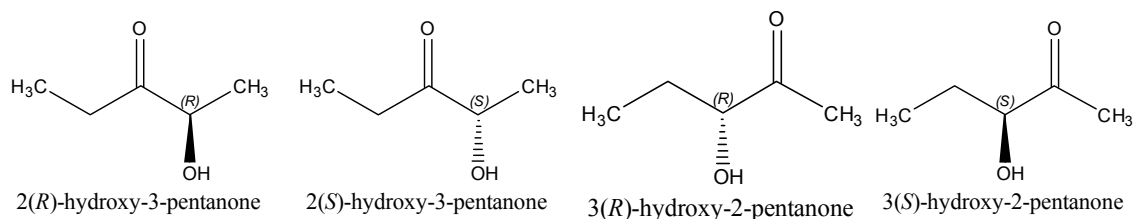


Figura 24. Les quatre hidroxicetones possibles de la 2,3-pentanodiona. Quan es redueix la 2,3-pentanodiona es poden obtenir 4 hidroxicetones, degut a no ser simètriques.

Al continuar amb la reducció, l'enzim actuarà en el grup ceto que queda i li donarà una configuració que pot ser la mateixa que té l'altre carboni, o no. Així, es poden obtenir les següents molècules:

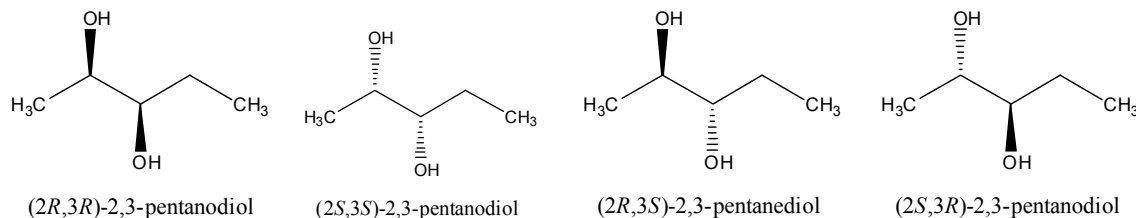


Figura 25. Els 4 isòmers possibles del 2,3-pentanediol. A part de les configuracions (*R,R*) i (*S,S*), també s'obtenen les configuracions (*R,S*) i (*S,R*) dels diols.

Així doncs, en el cas de les dicetones no simètriques, a diferència de les simètriques, no tenim la configuració *meso*, i en el seu lloc tenim les dues configuracions (*R,S*) i (*S,R*) a més de les configuracions (*R,R*) i (*S,S*) dels diols.

Clonació de gens de llevat per tècniques d'auto-clonació (self-cloning)

La utilització de microorganismes modificats genèticament planteja objeccions per al seu ús en la indústria alimentària. La utilització de microorganismes que posseeixen gens de resistència a antibiòtics o en general

DNA forani no es considera aconsellable atesa la possibilitat de transferència d'aquests gens a altres microorganismes que puguin residir en l'ésser humà o en animals. No obstant això, recentment s'han desenvolupat tècniques de "auto-clonació" amb les quals s'han obtingut organismes modificats en què s'han eliminat els gens de resistència a antibiòtics, així com DNA d'origen bacterià, de manera que l'organisme final obtingut no tindria cap seqüència de DNA que no estigués present en l'organisme original. En altres paraules, amb aquestes tècniques s'ha aconseguit la reordenació de seqüències de DNA de l'organisme original per satisfer els objectius perseguits.

L'existència de la recombinació homòloga en llevat ha permès el desenvolupament de diverses tècniques per produir llevats modificats genèticament. En un grup de tècniques, s'utilitzen marcadors de selecció flanquejats per la seqüència *loxP* que al costat de la utilització de la recombinasa Cre-*loxP*, resulta en la manipulació dels gens desitjats (Güldener et al. 1996). Aquest és un sistema que pot utilitzar-se en llevats industrials i que té l'avantatge d'eliminar els gens de resistència a antibiòtics que s'utilitzen en les etapes intermèdies. No obstant això, cada modificació gènica efectuada per aquesta tècnica deixa després de si, una "cicatriu" en el genoma: la seqüència *loxP*, que encara que no té el potencial de codificar cap producte patogènic, la seva presència repetida en el genoma podria induir a reordenacions cromosòmiques inesperades, via recombinacions intra o intercromosomals, que fins i tot podrien produir soques de llevat no eficients per a la fermentació.

Altres tècniques per a l'obtenció de llevats industrials modificades són les tècniques "d'auto-clonació". En aquestes tècniques, gens del mateix microorganisme són clonats en el propi microorganisme, de manera que al no haver DNA forani introduït, no hi ha perill de transferència de gens de resistència a antibiòtics a organismes patogènics, ni de producció de proteïnes al·lergògenes per l'organisme modificat (Akada 2002). De fet, l'abril de 2001, el Govern Japonès va aprovar l'ús d'una soca de llevat industrial (obtinguda utilitzant

tècniques de "auto-clonació"), per a l'obtenció de sake (Hirosawa et al. 2004). Aquesta soca contenia un gen propi modificat que feia que la soca final produís nivells més elevats de caproat d'etil que la soca de procedència. Atès que aquesta soca no contenia DNA forani, se la va considerar que no havia de ser tractada com a organisme modificat genèticament.

S'han desenvolupat dues noves estratègies "d'auto-clonació" en les que construirem un "cassette" que contindrà un marcador de selecció i un marcador de contra-selecció. El marcador dominant de selecció (el gen *natMX4* de *Streptomyces noursei*, que confereix resistència a l'antibiòtic clonNAT), ens permetrà seleccionar les cèl·lules que hagin adquirit el "cassette" al locus desitjat. Apart, s'han emprat dos marcadors de contra-selecció diferents: el cassette *URA3* de *Kluyveromyces lactis* i el cassette *GIN11M86* (Akada i cols. (2002), que inhibeixen el creixement de llevats quan s'expressen). Aquests dos marcadors ens permeten seleccionar les cèl·lules que els hagin perdut per l'acció d'una segona transformació, que introdueix la modificació desitjada en el locus triat. Aquests particulars marcadors de "selecció-contra selecció" permeten manipular tant soques de laboratori, com soques industrials.

Emprarem la metodologia d'auto-clonació per a mutar específicament aminoàcids implicats en la unió a coenzim de diferents ADHS en el seu context cromosomal. Es vol estudiar l'impacte en l'estatus redox de la cèl·lula i en els productes obtinguts en diferents condicions de creixement. La implementació d'aquesta tècnica permetrà estudiar els efectes de mutagènesi dirigida en gens reguladors, en el seu context cromosomal.

Objectius

Caracteritzar oxidoreductases de llevat per a produir diols enantiopurs, des de dicetones veïnes.

Caracteritzar els paràmetres cinètics (K_M , k_{cat}) dels enzims d'estudi front els substrats: acetoïna, diacetil, 2,3-butanodiol, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona i 3,4-hexanodiona.

Determinar la estereoselectivitat dels enzims caracteritzats enfront les dicetones veïnes: 2,3-butàdiona (diacetil), 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona i 3,4-hexanodiona.

Estudi dels compostos produïts emprant enzims purs, extractes de soques que sobreexpressen els enzims adients, soques permeabilitzades i proteïnes de fusió.

Desenvolupar una variant de la metodologia del *delitto perfetto*, que permeti introduir mutacions cromosomals en llevats de laboratori i industrials.

Aplicar la metodologia anterior en introduir mutacions en els gens *ADH1* i *ADH3*, de forma que codifiquin proteïnes mutants amb ús de cofactor diferent (NADPH enlloc de NADH, ambdós, o cap), i monitoritzar el creixement de les soques de llevat mutants obtingudes.

Materials i Mètodes

Material i reactius

El material de plàstic era de Becton Dickinson (Maryland, EUA) i de SUDELAB (Terrassa). Els medis de creixement bacto-peptone, bacto-agar, medi de nitrogen mínim de llevat eren de Difco-YNB. Les reïnes *DEAE-Sepharose*, Reactiu de Bradford, Reïna *Affi-Gel Blue*, reïna *Hidroxiapatite*, marcador de pesos moleculars per gels d'acrilamida *Low Range SDS-PAGE Standards*, anticòs secundari anti-ratolí de cabra eren de Bio-Rad (Berkeley, EUA). La Reïna Ni^{2+} -*Sepharose*, columnes gel-filtració PD10 i kit de recuperació de bandes de DNA des de gels eren de General Electrics Healthcare (Connecticut, EUA). Etanol, cloroform, KOD polimerasa eren de Merck (Nottingham, Regne Unit). L'enzim Vent polimerasa era de New England Biolabs, Inc. (Beverly, EUA). La agarosa de baixa EEO (electroendoosmosis) era de Pronadisa (Madrid, Espanya). Els enzims de restricció (BamHI, EcoRI, HindIII, XbaI, KpnI), DNA-ligasa (bacteriòfag T4), Detergent Y-Per, Glucosa-6-fosfat, *cocktail* d'inhibidors de proteasses (lliure de EDTA), RNasa (10 mg/ml), marcador de pesos moleculars per gels d'agarosa *DNA molecular weight marker X*, anticòs monoclonal anti-his6 de ratolí eren de Roche (Basel, Suïssa). Fosfat sòdic, acetat d'amoni, sulfat amònic, β -mercaptoetanol, DTT, EDTA, fenol:cloroform:isoamil alcohol (25:24:1), NaCl, D-glucosa (99,5%), D-galactosa (98%), acetoïna, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona, 3,4-hexanodiona, aminoàcids (adenina hemisulfat, arginina (HCL), histidina (HCL), isoleucina, tirosina, metionina, lisina (HCL), leucina, fenilalanina, triptòfan, d'àcid aspàrtic, àcid glutàmic, uracil, serina, treonina i valina), ampicilina, PEG, BSA, Triton, 5-FOA, SDS, Tris-CHL, acetat de liti, reïna *Cibacron Blue*, DNA de salmó d'alt pes molecular, formiat deshidrogenasa (*Candida boidinii*), glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (*Saccharomyces cerevisiae*) eren de Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). Les proteïnes estàndard que es van emprar com marcadors de Mr eren de SIGMA i són: β -amilasa (200 kDa); alcohol deshidrogenasa de llevat (150 kDa); albúmina de sèrum boví (66 kDa); anhidrasa

carbònica (29 kDa) i citocrom *c* (12.4 kDa). La síntesi i purificació dels oligonucleòtids emprats per amplificar els gens adients per PCR eren de Sigma-Genosys (Haverhill, Regne Unit)

Soques de Llevat i Bacteri

Pels experiments de clonatge, s'han utilitzat la soca XL-1 blue de *Escherichia coli* (endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)), provinent de Stratagene (La Jolla, EUA), i la soca DH5α (F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-).

Les cel·lules de llevat *S. cerevisiae* utilitzades en els experiments amb Bdh1p i Ara1p per a l'estudi del metabolisme del 2,3-butanodiol, provenen de quatre soques de laboratori amb diferents backgrounds genètics:

FY834_ (*MAT_ his3_200 ura3-52 leu2_1 lys2_202 trp1_63*) (Winston et al. 1995); CEN.PK2-1C (*MATa ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3_1 MAL2-8c SUC2*) (van Dijken JP et al. 2000); WCG4-11/22a (*MATa pre1-1 pre2-2 ura2 leu2-3,112 his3-115*), que és una soca amb el proteasoma danyat (Richter-Ruoff 1994); WV36-405 (*MATa ura3-52, trp1, adh1Δ, adh2Δ, adh3, adh4::TRP1*), construïda pel Doctor Wolfgang Vogel (Neuherberg, Germany), i que és una soca Adh-.

Les soques mutants FY *bdh1Δ*, FY*bdh2Δ*, FY*bdh1Δ bdh2Δ*, CEN.PK2-1C *bdh1Δ*, CEN.PK2-1C *bdh2Δ*, CEN.PK2-1C *bdh1Δ bdh2Δ*, WCG4-11/22a *bdh1Δ*, i WV36-405 *bdh1Δ* van ser construïdes per disrupció dels gens *BDH1* i *BDH2* en les soques parentals corresponents mitjançant PCR dirigida amb els marcadors *kanMX4* (Oka et al. 1981) i *natMX4* (Goldstein & McCusker 1999), respectivament.

Per als experiments duts a terme amb les AKRs de llevat, les soques de llevat utilitzades són derivacions de la soca deficient en Adh WV36-405 (*MATa*, *ura3-52*, *trp1*, *adh1Δ*, *adh2Δ*, *adh3*, *adh4::TRP1*) vista abans. Per tal d'evitar que els enzims Bdh1p i Ara1p interferissin en les reaccions de reducció de les dicetones (ja que aquests enzims són actius en front d'aquestes), es va utilitzar la soca de llevat derivada de WV36-405 en la que els gens d'aquests enzims estan deletats (*WV36-405 bdh1::kanMX4*, *ara1::natMX4*) com a soca-recipient per a la sobreexpressió de les AKRs de llevat d'estudi.

El plasmid seleccionat per a tal sobreexpressió és el pYES2 (Invitrogen), que conté el gen *URA3* com a marcador seleccionable per auxotrofia, en presència de galactosa com a font de carboni (el promotor que controla l'expressió dels gens clonats en el MCS és el promotor del gen *GAL1*, induïble per galactosa).

Les soques de *Saccharomyces cerevisiae* utilitzades en els experiments amb la proteïna de fusió (Fdh1p-Bdh1p-6his) i per a la sobreexpressió de Bdh1p i Fdh1p, s'han originat a partir de dues soques: la soca salvatge FY834α (*MATα*, *his3Δ200*, *ura3-52*, *leu2Δ1*, *lys2Δ202*, *trp1Δ63*) (Winston et al. 1995), i la soca Adh⁻ WV36-405 (*MATa*, *ura3-52*, *trp1*, *adh1Δ*, *adh2Δ*, *adh3*, *adh4::TRP1*). La soca mutant EG2 (FY834α *MATα his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ 63TRP1::bdh1*) (Gonzalez et al. 2000) s'ha usat per tal de caracteritzar altres diacetil reductasses dependents de NADH.

La soca emprada per a la sobreexpressió dels enzims Bdh1p i Bdh1p-(His)₆p ha estat la WV36-405 *ara1Δ*. Aquesta va ser construïda mitjançant un mètode de truncament d'un gen en un sol pas (Ito et al. 1983), amb un fragment que contenia el gen *natMX4* flanquejat per seqüències idèntiques al gen *ARA1*, per tal que es pogués donar el procés de recombinació homòloga (González et al. 2010).

Medis de cultiu

Els medis s'autoclabaven a 121°C i 1 Kg/cm² de pressió, durant 20 minuts. I sempre el sucre a part.

El medi de cultiu SC-Ura (*Simple Complete*, sense l'aminoàcid Uracil), es prepara amb 32 mL de YNB (*Yeast Nitrogen Base*), més 4 mL de *Drop-Out* -Ura (10x), més 4 mL de solució de galactosa al 20%, per a 40 mL de medi final, en el que la concentració de galactosa és del 2%. El YNB es prepara addicionant 0,43 gr de la base de nitrogen de llevat, YNB, sense aminoàcids ni sulfat amònic, i 1,25 gr de sulfat amònic en 200 mL d'aigua MilliQ. El *Drop-Out* -Ura (10x) és el que aportarà els aminoàcids (excepte uracil), i es prepara addicionant per cada 80 mL d'aigua MilliQ les següents quantitats d'aminoàcids: 0,036 gr de adenina hemisulfat, arginina (HCL), histidina (HCL), isoleucina, tirosina, metionina i lisina (HCL); 0,048 gr de leucina, fenilalanina i triptòfan; 0,080 gr d'àcid aspàrtic i àcid glutàmic; 0,16 gr de serina, treonina i valina. La solució de galactosa, o glucosa, conté 16 gr del sucre en cada 80 mL de solució.

El medi que conté 5-FOA (àcid 5-fluorooròtic), és el mateix medi SC amb 20 mg/L d'uracil i un 0,1% de 5-FOA.

El medi YPD (YEPD: *Yeast Extract Peptone Dextrose*), està compost de 10 gr d'extracte de llevat (1%) i 20 gr de bacto-peptona (2%) per a 1 L de medi, i posteriorment s'hi afegeix el sucre corresponent a una concentració final del 2%.

El medi de cultiu LB (Luria-Bertani), conté 10 gr de bacto-peptona, 5 gr d'extracte de llevat, 10 gr de NaCl i aigua MilliQ fins a 1 L. Ens els casos en que s'addicionava antibiòtic, aquest era ampicilina a una concentració de 50 µg/ml.

Alhora de fer plaques amb aquests medis, s'hi adiciona 20 g/L de bacto-agar (2%), excepte per les de medi LB, en la que se n'hi posaven 15 gr (1,5%), i, a diferència del medi LB líquid, quan s'hi addicionava l'ampicilina era a una concentració de 75 µg/ml. S'omplia la placa amb, més o menys 2/3 parts, del

medi amb el bacto-agar, i es deixa assecar *overnight* a temperatura ambient, o bé 30-60 minuts en una campana de flux laminar vertical. Posteriorment, es dipositaven dins una bossa de plàstic segellada i es guardaven a 4°C durant uns tres mesos com a màxim.

Condicions de creixement

Les cèl·lules de *E.coli* es van fer créixer en un agitador orbital (Radiber S.A., España), a 37°C i en medi Luria–Bertani amb un suplement de 50ug/ml de l'antibiòtic ampicilina per tal de poder seleccionar els constructes de plàsmids desitjats.

Les soques de llevat derivades de la soca WV36-405, van créixer en un agitador orbital a 250 rpm i 28 °C, en medi SC-Ura amb el 2% de galactosa. Les derivades de la soca FY van créixer en medi YPD en el mateix incuador a la mateixa temperatura.

El creixement de les cèl·lules en les plaques es duia a terme en una estufa (Radiber S.A., España), a 30°C les de llevat i a 37°C les de *E.coli*.

Obtenció DNA genòmic

El DNA genòmic s'utilitzarà com a motlle en reaccions de PCR per obtenir fragments lineals dels gens amb els que es treballa.

En primer lloc, cal fer créixer la soca d'interès fins a fase estacionària en medi YPD (5-10 ml). Es centrifuga el cultiu en una centrífuga basculant (Heraeus, Alemanya) a 4000g durant 15 min. Es descarta el sobrenedant, es resuspenen les cèl·lules en 0,5 ml d'aigua destilada i es traspasa a un microtub de 1,5 ml. Es centrifuga el microtub, es descarta el sobrenedant, i amb el vortex es resuspèn el

pellet amb l'aigua residual del tub. Tot seguit s'hi adicionen 0,2 ml del tampó 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA. S'hi afegeixen 0,2 ml de fenol:cloroform:isoamil alcohol (25:24:1), i 0,3 gr de boletes de vidre. La mescla es vortexa durant 3-4 min, i en acabat s'hi adicionen 0,2 ml de TE (10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA). Es centrifuga a 16000g en una microcentrífuga durant 5 min. En un tub nou s'hi posa el sobrenedant, que és la fase aquosa, s'hi adiciona 1 ml d'etanol absolut i es mescla per inversió. Es torna a centrifugar durant 2 min a la microcentrífuga i es descarta el sobrenedant. El pellet que ha quedat es resuspèn amb 0,4 ml de TE i s'hi afegeixen 3 µl d'una solució de RNasa a 10 mg/ml. Aquesta mescla s'incuva a 37°C durant 5 min, i posteriorment s'hi afegeixen 10 µl d'acetat d'amoni 4M i 1 ml d'etanol absolut. Es mescla per inversió, es torna a centrifugar durant 2 min a 16000g, i es descarta el sobrenedant. El pellet humit que ha quedat es deixa assecar durant 24 hores a temperatura ambient, o bé 30-60 minuts en un *speed-vac* (ThermoSavant,EUA). Un cop sec, es resuspèn amb 50 µl de tampó TE.

Mètode de transformació

Per a la transformació, es segueix el mètode de l'acetat de liti (Ito et al. 1983).

En primer lloc, cal tenir preparat el *transformation mix* que consta de:

- DNA *carrier* d'una sola cadena (2 mg/ml): s'adicionen 200 mg del DNA de salmó d'alt pes molecular en 100 ml del tampó TE (10 mM Tris-HCL pH 8, 1 mM EDTA). Un cop ben mesclat, se'n fan alíquotes de 1 ml i es guarda a -20°C. Abans d'utilitzar-lo, cal bullir-lo en un bany almenys 5 min, i refredar-lo ràpidament en un bany de gel.
- Acetat de liti (1 M): s'adicionen 8,16 gr d'acetat de liti en 80 ml d'aigua MilliQ. Un cop fet, s'ha d'autoclavar en les mateixes condicions descrites abans pels medis.

- PEG (50% p/v): s'adicionen 6 gr de PEG en 6 ml d'aigua MilliQ. Un cop ben mesclat s'esterilitza amb un filtre de 0,45 μm , i es guarda a temperatura ambient.
- DNA plasmídic: Els plàsmids d'interès s'obtenen a través del *kit* de Sigma *GeneElute Plasmid Miniprep Kit*.

Per a una transformació, la composició del *transformation mix* és:

- | | |
|----------------------|-------------------|
| - PEG (50% p/v) | 240 μl |
| - Acetat de liti 1 M | 36 μl |
| - SS-carrier DNA | 50 μl |
| - Plàsmid en aigua | 34 μl |

Que fa un total de 360 μl que s'adicionen a cadascuna de les transformacions que es fan (quan es prepara el *transformation mix* cal tenir en compte que sempre se n'ha de preparar per una transformació més de les que es vulguin fer).

Un cop preparats els reactius, es procedeix a la transformació:

- Es centrifuga el cultiu de llevat (40 ml) que estava creixent en l'agitador orbital a 4000g durant 10 min en una centrífuga basculant.
- Es descarta el sobrenedant, i s'hi afegeixen 25 ml d'aigua estèril per rentar el pellet. Es torna a centrifugar, i es resuspèn el pellet en 1 ml d'aigua estèril per traspasar-lo a un microtub.
- Es centrifuga 1 min a 16000g en una microcentrífuga (Eppendorf, Alemanya), es descarta el sobrenedant i es torna a resuspendre en el mateix microtub amb 0,8 ml d'aigua estèril.
- Es posen 100-200 μl de la suspensió de cèl·lules en tants tubs com transformacions diferents es vulguin fer, i es torna a centrifugar en la microcentrífuga.
- Es descarta el sobrenedant, i s'afegeixen els 360 μl del *transformation mix* directament sobre el pellet, que es resuspèn amb el vortex.
- S'incuben els tubs en un bany d'aigua a 42°C durant 40 min.

- Es centrifuga a 16000g durant 1 min. Es treu el sobrenedant amb una pipeta, i es resuspèn el pellet en 1 ml d'aigua estèril.
- Finalment, es sembren 100-200 µl de la suspensió celular en plaques SC-Ura, i s'incuben en una estufa a 30°C durant 3 o 4 dies fins que apareixin les colònies.

Purificació de proteïnes

Trencament Celular

Abans de dur a terme els processos de purificació, o les activitats en extractes, cal obtenir aquests extractes crus de les diferents soques. Per fer-ho, cal un trencament celular, que en aquest cas es fa per mitjans físics amb boletes de vidre generalment, i en algun cas amb detergent (explicat en el cas concret).

En funció del tamany del pellet, es va fer amb tubs de vidre (de 5 ml) quan el volum a trencar és petit, i amb un *Bead Beater* (Biospec Products) quan el volum és més gran.

Es resuspèn el pellet amb 0,5-2 ml (en funció del tamany) de tampó NaPi amb inhibidors de proteases, i es posa la suspensió en el tub de vidre o el *Bead Beater*, amb un volum igual de boletes de vidre. Es fan 4 cicles de: 1 min al vortex – 1 min al bany de gel. En el *Bead Beater* la cubeta on es du a terme el trencament ja està en un bany de gel, i el cicle que es fa és engegar-lo durant 1 minut i parar-lo durant un minut. Aquests descansos de 1 min es fan perquè no pugi massa la temperatura de la suspensió celular amb boletes, amb el risc de desnaturalització de proteïnes que això comportaria.

A continuació, es recupera el màxim del volum que hi ha i es guarda en un microtub en un bany de gel. Es posa un volum igual al que hi havia al tub o al *Bead Beater* de NaPi que servirà per “rentar” les boletes. Aquets volum s'adiciona al que teniem guardat en el bany de gel, i es centrifuga en una

microcentrífuga a 16000g durant 15 min. Seguidament, es recupera el sobrenedant de les restes celulars, i es posa en un tub nou. Amb aquest extracte es fan els assajos enzimàtics o la purificació de la proteïna immediatament.

Purificació AKRs

Els oligonucleòtids utilitzats per l'amplificació de les AKRs són:

- ARA1 (AKR3C1):

ARA1- Fw: 5' CGG GAT CCA TGT CTT CTT CAG TAG CC 3'

ARA1- Rv: 5' CTA GTC TAG AAA AGT GAA AAT AAA GTC G 3'

- YDL124W (AKR5G):

YDL124-fw: 5' CGC AAG CTT CAG ATG TCA TTT CAC CAA CAG TTC
TTT ACC 3'

YDL124-his-rv: 5' GCC GGA TCC TTA **ATG ATG ATG ATG ATG ATG**
TAC TTT TTG AGC AGC GTA GTT GTA TTT ACC G 3'

- YJR096W (AKR5F):

YJR096-fw: 5' CGC AAG CTT AAC ATG GTT CCT AAG TTT TAC AAA
CTT TCA AAC GG 3'

YJR096-his-rv: 5' GCC GGA TCC TTA **ATG ATG ATG ATG ATG ATG** TGG
CGC GTC TGT GCA TTC CC 3'

Tots els oligonucleòtids utilitzats per a l'amplificació dels diversos gens contenen una diana de restricció (subratllada), per tal de poder clonar el gen amplificat en el vector pYES2, autoinduïble i regulable per galactosa.

Prenem com a exemple el cas d'ARA1 per tal d'explicar el procés fet amb els diversos gens.

En primer lloc, es va amplificar el gen mitjançant PCR amb la polimerassa *KOD DNA polymerase*. L'amplificació s'inicia amb un "hot start" seguit de 30 cicles de 2 minuts a 95 °C, 20 s a 95°C, 30 s a 60 °C, i 20 s d'extensió a 75 °C, amb una extensió final de 5 min a 75°C després dels 30 cicles. La mescla de PCR

contenia 1 U. de *KOD* DNA polimerasa, cada oligo a 1 μ M, cada dNTP a 0,2 mM i MgSO₄ a 1,5 mM.

Com que l'oligonucleòtid ARA1-Fw conté la diana de restricció BamHI (GGATCC), mentre que l'oligonucleòtid ARA1-Rv conté la diana XbaI (TCTAGA), es van digerir els fragments amplificats provinents de la PCR, així com el plàsmid pYES2, amb els dos enzims de restricció anomenats. Seguidament es van lligar per obtenir els constructes recombinants, que van ser introduïts al llevat (soca WV36-405 ($\Delta adh1$, $\Delta adh2$, $\Delta adh3$, $\Delta adh4$) *bdh1::kanMX4*, *ara1::natMX4*), mitjançant el mètode de transformació de l'acetat de liti (Ito et al. 1983). Els transformants es van seleccionar en medi SC-Ura gràcies a l'auxotrofia de l'uracil. Finalment, es va confirmar la correcció dels constructes per seqüenciació.

Els oligonucleòtids usats per a l'amplificació dels gens YDL124W i YJR096W, estan dissenyats per tal que afegeixin 6 residus d'histidina (en verd) a l'extrem carboxil de les seves corresponents proteïnes, amb la finalitat de facilitar la seva purificació. Les dianes de restricció són les mateixes pels 2, i són BamHI (GGATCC) i HindIII (AAGCTT).

El pel·let de llevat dels cultius va ser solubilitzat amb el detergent Y-Per, que contenia inhibidors de proteases. L'extracte cru va ser centrifugat a 10.000g durant 1 hora per tal d'eliminar la fracció insoluble, i també per canviar el tampó utilitzant filtres de centrifuga Amicon. Amb la fracció soluble es procedí a la purificació dels enzims, feta amb tres passos de cromatografia. El primer consistí en una columna d'afinitat Ni²⁺-Sepharose, equilibrada amb el tampó fosfat sòdic 50mM pH 7,4, NaCl 150 mM i imidazole 20 mM, que és el mateix que havia substituït el detergent en l'extracte, rentada amb 300 mL del mateix tampó i eluïda amb el mateix tampó amb 0,5 M d'imidazol. El pic d'activitat fou carregat posteriorment a una columna Red-Sepharose, equilibrada amb tampó fosfat sòdic 50 mM pH 7,4, rentada amb 300 ml del mateix tampó i eluïda amb un gradient de

NaCl (0 a 5 M), en el mateix tampó. El nou pic d'activitat va ser carregat finalment a una columna preparativa Hi-Load (26/60) SuperDex 200 (Pharmacia, Suècia), de la qual l'enzim pur va ser eluït amb tampó fosfat de sodi a 33 mM i pH 7.0.

Per la seva banda, el gen ARA1 es va sobreexpressar a la mateixa soca de llevat, WV36-405 ($\Delta adh1$, $\Delta adh2$, $\Delta adh3$, $\Delta adh4$) $bdh1::kanMX4$, $ara1::natMX4$), i utilitzant el mateix vector pYes2. En aquest cas, la ruptura del llevat es va dur a terme de forma física mitjançant boles de vidre, amb el tampó A: 50 mM Tris-HCL pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, i que a més contenia inhibidors de proteases. Es va centrifugar a 10000 durant durant 1 hora. El sobrenedant soluble es va dialitzar *overnight* amb tampó A per a eliminar el detergent. L'endemà es va carregar a una columna d'intercanvi iònic DEAE-Sepharose equilibrada amb el tampó *column buffer* (10 mM Tris-HCL pH 7,4, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT). Es va rentar amb 300 mL del *column buffer* i s'eluí amb un gradient de NaCl (0 a 0.5 M) en *column buffer*, en fraccions de 5 ml. Les fraccions actives van ser carregades a una columna d'afinitat Affi-Gel Blue equilibrada amb tampó A, de la que es va eluir amb un gradient de NaCl (0 a 0,75 M) en el mateix tampó. L'últim pas cromatogràfic amb la columna SuperDex 200 es féu igual que amb els altres dos gens comentats anteriorment.

Les AKRs humanes AKR1B1 i AKR1B10 es van sobreexpressar en la soca bacteriana *E. Coli* BL21 utilitzant el vector pET16b. L'expressió de la proteïna es va induir amb IPTG. El trencament cel·lular es va fer amb ultrasons. La purificació es va dur a terme mitjançant una columna d'afinitat Ni²⁺-NTA. Aquesta purificació és cortesia del Dr. Sergio Porté.

Purificació de Bdh1p, Bdh1(His)₆p i Fdh1-Bdh1(His)₆p

Els oligos utilitzats en aquests experiments estan a la taula 1.

Els oligos utilitzats per a la purificació de Bdh1p(His)₆ són:

1- 5' GGGGTACCAATTATGAGAGCTTTGGCATATTC 3'

2- 5' GCGGAATTCTTACTTCATTTACCGTGATTGTTAG 3'

El primer hibrida amb l'extrem 5' del propi gen i introdueix la diana de restricció *KpnI* (subratllat en la seqüència), mentre que el segon híbrida amb l'extrem 3' i introdueix la diana de restricció *EcoRI* (subratllat).

La amplificació duta a terme per PCR va començar amb un “hot start,” que va ser seguit per 5 cicles que consistien en 1 minut a 95 C, 1 minut a 57 C i 1.5 minuts a 72 C. Aquesta fase inicial va ser seguida de 25 cicles més, que consistien en 1 minut a 95 C, 1 minut a 60 C i 1.5 minuts a 72 C. La barreja de PCR contenia 1 unitat de *Vent* DNA polymerase, 1 mM de cada encebador, 200 µM de cada dNTP i 2 mM MgSO₄.

El gen *BDHI*, que codifica per Bdh1p, es va clonar en el plàsmid pYES2, que posteriorment es va transformar en la soca WV36-405*ara1Δ*. En aquesta soca també es va transformar el constructe *BDHI(His)6*, que codificarà per Bdh1(His)₆p, obtenint-se així les dues noves soques WV36-405*ara1Δ* [pYES2-*BDHI*] i WV36-405*ara1Δ* [pYES2-*BDHI(His)6*]. El trencament celular per a la purificació de Bdh1p es va dur a terme amb boletes de vidre amb el tampó A (20 mM fosfat de potassi pH 6,8, 0,5 Mm DTT amb un 30% de glicerol. Després de centrifugar a 29000g durant 1 hora, el sobrenedant es va carregar a una columna de hidroxilapatita Bio-Gel HT equilibrada amb el tampó A. Després de rentar la columna amb 250 mL del mateix tampó, es va eluir l'enzim mitjançant un gradient de 20–600 mM de fosfat de potassi pH 6,8, 0,5 Mm DTT amb un 30% de glicerol. Les fraccions actives es van concentrar amb un Amicon, alhora que es canviava el tampó per tampó A. Posteriorment, es va carregar a una columna amb Cibacron Blue 3GA, equilibrada amb el tampó A. Es va rentar amb 330 mL de tampó A, i es va eluir amb un gradient de NaCl (0–2 M), en el mateix tampó. Les fraccions actives es van carregar a la columna de gel-filtració Superdex 200 HR 10/30 equilibrada amb fosfat sòdic 50 mM pH 7, NaCl 0,15 M

i un 30% de glicerol. La columna es va eluïr amb el mateix tampó a un flux de 0,2 ml/min (Gonzalez et al. 2000).

Per a la purificació de Bdh1p(His)₆p, l'extracte que la contenia va ser carregat a una columna de *Ni-Sepharose* equilibrada amb el tampó fosfat sòdic 50 mM pH 7,4, NaCl a 150 mM i imidazol a 20mM, i es va rentar amb 300 mL del mateix tampó. Es va eluïr amb el mateix tampó, però amb 0,5 M d'imidazol. Les fraccions actives es van passar per una columna de gel-filtració per tal de canviar el tampó a fosfat potàssic 20 mM pH 7. Posteriorment es va carregar a una columna d'hidroxilapatita equilibrada i rentada amb el tampó fosfat potàssic. Es va eluir amb un gradient del mateix tampó, de 20 mM a 600 mM fosfat potàssic pH 7. Les fraccions actives, es van tornar a carregar a una columna PD10 per tal de canviar el tampó a fosfat sòdic 50mM pH 7, NaCl 50 mM, per fer l'últim pas amb la columna Superdex 200 com en el cas de Bdh1p.

Els oligonucleòtids utilitzats per a la construcció de la proteïna de fusió són:

- **o-gal1-Fw**: 5' CCGACGGAAGACTCTCCTCCG 3'
- **bdh1his Rw**: 5'GCGGAATICTTAATGATGATGATGATGATG CTTCATT TCACCGTGATTGTTAGG 3'
- **link_iBDH1_PFiFw**: 5' CAGAAGAAAGAAAATTTGTATTTTCAAGGT A TGAGAGCTTTGGCATATTTCAAGAAG 3'
- **fFDH1_link_PFiRw**: 5' CAAAGCTCTCATACCTTGAAAATACAAA TTT TCTTTCTTCTGTCCATA AGCTCTGG 3'

Els dos darrers són els dos oligos interns, que porten (marcat en gris) la seqüència que introdueix el *linker* entre les dues proteïnes que formaran part de la proteïna de fusió. Els dos anteriors, són els externs, i s'hi observa marcat en verd la cua d'histidines per a la purificació, i subratllat la diana de restricció EcoRI. L'oligo o-gal1-Fw, no porta diana de restricció perquè hibrida en l'inici del plàsmid pYES2, on ja hi ha clonat *FDH1* amb la diana BamHI.

Pel que fa a la purificació de la proteïna de fusió Fdh1-Bdh1(His)₆p, el procediment va ser el mateix, clonació del constructe i posterior transformació en cèl·lules de llevat. La soca d'elecció en aquest cas és una mica diferent, té deletat el gen BDH1 a més del gen ARA1, ja que no interessaven possibles activitats degudes a Bdh1p endògena, que no formés part de la proteïna de fusió esmentada. Aquesta soca és WV36-405 $\text{ara1}\Delta\text{bdh1}\Delta$ [pYES2-FDH1-BDH1-6His].

El primer pas de purificació consisteix en una columna de *Ni-Sepharose* equilibrada amb el tampó fosfat sòdic 50 mM pH 7,4, NaCl a 150 mM i imidazol a 20mM, i es va rentar amb 300 mL del mateix tampó. Es va eluir amb el mateix tampó, però amb 0,5 M d'imidazol. Les fraccions actives, es van tornar a carregar a una columna PD10 per tal de canviar el tampó a HEPES 50mM pH 7, NaCl 50 mM. L'últim pas de purificació es fa també amb la finalitat de determinar la Mr de la proteïna de fusió. Consisteix en una cromatografia de gel-filtració a través de la columna Hi-Load (26/60) SuperDex 200, equilibrada amb el tampó HEPES a 50 mM, pH 7 i NaCl a 150 mM. La columna s'elueix amb aquest mateix tampó d'equilibrat a un flux de 1.75 mL/min.

Purificació de ADH2p

El protocol per a purificar Adh2p consisteix en tres passos de purificació mitjançant cromatografia: DEAE-Sepharose, seguida de hidroxipatita, i finalment Cibachron Blue 3GA.

El trencament cel·lular es dugué a terme amb el detergent de la mateixa manera que en el cas de AKR5 i AKR5F. L'extracte dialitzat en tampó C (10 mM Tris-HCL pH 7,5, 0,5 mM DTT), es va carregar en una columna de DEAE-Sepharose equilibrada també amb el tampó C, i es va eluir amb un gradient de NaCl (0-0,4M) en el mateix tampó C. Les fraccions actives es van carregar a una

columna Affi-Gel Blue equilibrada amb el mateix tampó. D'aquesta columna, se'n va fer l'elució amb gradient de NADH (0-750 μ M) en el mateix tampó. Finalment es va canviar el tampó (100 mM KH_2PO_4 pH7,5, 0,5 mM DTT), alhora que es concentrava amb filtres per centrifuga Amicon (Millipore, EUA) per tal d'eliminar l'excés de NADH que hi pogués quedar.

Purificació de Adh1p i Adh3p

Per a la purificació de Adh1(His)₆p, Adh3(His)₆p i els seus mutants, es van carregar els extractes trencats amb boletes de vidres amb el tampó fosfat sòdic 50 mM pH 7,4, NaCl a 150 mM i imidazol a 20mM a una columna de *Ni-Sepharose* equilibrada amb el mateix tampó fosfat sòdic 50 mM pH 7,4, NaCl a 150 mM i imidazol a 20mM, i es va rentar amb 300 mL del mateix tampó. Es va eluir amb el mateix tampó, però amb 0,5 M d'imidazol. Les fraccions actives es van passar per una columna de gel-filtració per tal de canviar el tampó a fosfat potàssic 20 mM pH 7. Posteriorment es va carregar a una columna d'hidroxilapatita equilibrada i rentada amb el tampó fosfat potàssic. Es va eluir amb un gradient del mateix tampó, de 20 mM a 600 mM fosfat potàssic pH 7. Les fraccions actives, es van tornar a carregar a una columna PD10 per tal de canviar el tampó a fosfat sòdic 33 mM pH 7.

Determinació de la massa relativa de les proteïnes d'estudi

Prèviament a la cromatografia de Gel-Filtració, es van carregar a la columna Hi-Load (26/60) SuperDex 200, equilibrada amb el tampó Hepes (Hepes 50 mM pH 7, NaCl 150 mM), uns estàndards de Mr per a poder determinar la massa relativa de les proteïnes d'estudi. Els marcadors són: citocrom C (Mr=12,400), anhidrasa carbònica (Mr=29,000), albúmina de sèrum

boví ($M_r=66,000$), alcohol deshidrogenasa de llevat ($M_r=150,000$) i β -amilasa ($M_r=200,000$). El flux de la columna és 1,75 ml/min.

Amb els volums d'elució d'aquests marcadors es va fer una recta patró, en la que en l'eix Y s'hi representen els logaritmes dels pesos moleculars, i en l'eix X el quocient V_e/V_0 , on V_e és el volum d'elució corresponent i V_0 el volum d'elució del blau dextrà. Finalment s'interpolen els volums d'elució de les diferents proteïnes estudiades en aquesta recta.

Determinació de la concentració de proteïnes

El mètode utilitzat majoritàriament per a la determinació de la concentració de proteïnes és l'assaig de Bradford. Aquest mètode es basa en fer una recta patró d'absorbàncies amb mostres de concentracions conegudes d'albúmina, en la que s'interpolen els valors d'absorbància de les mostres d'estudi.

Es parteix d'una solució mare de BSA (*Bovine Serum Albumin*) de 10 mg/ml. Aquesta solució es prepara afegint 0,1 gr de BSA a 10 ml de NaPi, i es guarda a 4°C. D'aquesta solució se'n fa una dilució per obtenir una solució de BSA a 1 mg/ml (0,2 ml de solució BSA 10 mg/ml + 1,8 ml de NaPi). Cal comprovar la concentració d'aquesta solució mesurant l'absorbància en l'espectrofotòmetre Cary 100 (Varian Medical Systems, EUA), a 280 nm amb una cubeta de quars. L'absorbància ha de ser 0,667, si no caldrà reajustar a la següent dilució. Partint d'aquesta solució de 1 mg/ml de BSA, es fa una altra dilució per obtenir una solució de BSA de 100 µg/ml (0,1 ml de solució BSA 1 mg/ml + 0,9 ml de NaPi). Tot seguit, es fa un banc de dilucions amb la solució de BSA 100 µg/ml amb els volums següents: 0, 10, 20, 40, 60, 80 i 100 (µl). S'ajusta el volum de cadascuna d'elles amb NaPi fins 800 µl, i s'afegix a totes 200 µl de reactiu de Bradford. Finalment, s'obtenen 7 tubs que seran els 7 punts de la recta patró, de solucions que contenen respectivament 0, 1, 2, 4, 6, 8 i 10 µg de BSA. Es miren les absorbàncies de cadascun d'ells i es genera la recta patró. El

primer tub de la recta (0 gr de BSA), és el que ens proporciona l'absorbància que du a terme el reactiu de Bradford sol, és el blanc.

A continuació, es mesuren les absorbàncies de les mostres d'estudi. Si és un extracte, cal diluir-lo, i normalment es feia una dilució 1/15 (0,02 ml d'extracte + 0,28 ml de NaPi). Amb els extractes diluïts, o els enzims purs, es preparen dues solucions per cada mostra: 10 i 20 µl de la mostra amb NaPi fins a un volum de 800 µl, i posteriorment s'hi adicioneu els 200 µl de reactiu de Bradford.

Finalment, es mesuren les absorbàncies dels duplicats de les mostres i s'interpolen els resultats a la recta patró.

Aquest mètode de Bradford, s'ha alternat alguna vegada amb determinacions amb el Nano-Drop 2000 (Thermo Scientific, USA).

Mètodes electroforètics

Gels Agarosa

Per a la visualització dels inserts de DNA, o els plàsmids, es van dur a terme electroforesis en gels d'agarosa al 0,7%. Aquests gels es fan mesclant 0,35 gr d'agarosa (baixa EEO) en 50 ml del tampó TBE (0,5x). S'escalfa la mescla en un microones a 550 W, durant 50 segons, i seguidament es remena fins que clarifica. Es sellen les plaques a la cubeta amb la mateixa mescla, i a la que sobra se li adicioneu bromur d'etidi (Amresco, EUA), per tal de visualitzar les bandes amb llum ultraviolada. Es deixa gelificar a temperatura ambient. Mentrestant, es preparen les mostres prenent 12 µl de la mostra a visualitzar i s'hi adicioneu 2,4 µl del tampó d'aplicació (6x). Així mateix es prepara la solució que conté els estàndards de pes molecular, que consisteix en 3 µl de *DNA molecular weight marker X*, 2 µl del tampó d'aplicació (6x) i 7 µl de tampó TE. Un cop gelificat,

s'omple la cubeta amb el tampó TBE, s'hi diposita el gel, es carrega el gel amb les mostres i l'estandard i s'endolla a la font elèctrica, mantenint un voltatge constant de 100 V. Un cop han corregut les mostres, es visualitzen col·locant el gel sobre una làmpada de llum ultraviolada.

SDS-PAGE

La puresa dels enzims va ser analitzada per electroforesi en gels de poliacrilamida amb SDS. Les SDS-PAGE es van dur a terme segons el procediment descrit per Laemmli (Laemmli 1970), en un sistema de gel vertical (Miniprotean II, Bio-Rad,). El gel separador es preparava a 12% d'acrilamida, i el tampó utilitzat era Tris 25 mM, glicina 0,2 M, pH 8,4, SDS 0,1%. Els patró de pesos moleculars utilitzat va ser el *Low Range SDS-PAGE Standards*, de Bio-Rad.

Les bandes de proteïnes es van visualitzar amb blau de Coomassie (Sambrook & W Russell 2001), seguint els protocols estàndards establerts.

Assajos enzimàtics. Espectrofotometria

Les diferents activitats enzimàtiques es van determinar per espectrometria, mesurant el canvi d'absorbància a 25°C i a una longitud d'ona de 340 nm, en un espectrofotòmetre Cary 100 (Varian, Agilent). El que es mesura és l'aparició de NADH, o NADPH ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), provinent de NAD^+ , o NADP^+ en les reaccions d'oxidació, o bé la desaparició d'aquests mateixos en les reaccions de reducció.

Per obtenir l'activitat dels diversos enzims en aquestes condicions, una unitat d'activitat correspon a 1 μmol de NAD^+ , o NADP^+ , format/gastat per minut. L'activitat específica va ser mesurada en un tampó fosfat a 33 mM i pH

7, en presència del substrat, que pot ser acetoina a 50 mM o una dicetona a 100 mM, i NADH o NADPH a 0,2 mM, per a les reaccions de reducció, i etanol a 100 mM i NAD⁺ a 5 mM per les reaccions d'oxidació. A més, totes les mesclures porten BSA a 1 mg/ml per tal d'estabilitzar els enzims.

Les solucions dels reactius per als assajos enzimàtics es preparen de la següent forma:

- NADH (20 mM): 0,0142 gr NADH en 1 ml de NaPi.
- NAD⁺ (50 mM): 0,033 gr NAD⁺ en 1 ml de NaPi.
- Diacetil (1 M): 0,09 ml diacetil + 0,91 ml de NaPi.
- 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona i 3,4-hexanodiona (1 M): 0,1 ml de la dicetona corresponent + 0,9 ml de NaPi.
- Etanol (1 M): 0,06 ml d'etanol absolut + 0,94 ml de NaPi.
- Acetoïna (0,5 M): 0,044 gr d'acetoïna en 1 ml de NaPi.

Western blots i IEF

Per tal d'assegurar la presència de les proteïnes d'interès, es van fer, a part dels gels electroforètics convencionals (SDS-PAGE) i de les activitats per espectorfotometria, un western blot i un gel d'isoelectroenfoc.

Les proteïnes Bdh1(His)₆p i Fdh1-Bdh1(His)₆p expressades en les soques WV36-405*ara1Δbdh1Δ*[pYES2-BDH1-6His] i WV36-405*ara1Δbdh1Δ*[pYES2-FDH1-BDH1-6His] respectivament, van ser detectades per western blot gràcies a un anticòs anti-His₆ monoclonal de ratolí. Les soques van créixer en SC-Ura amb el 2% de galactosa fins a l'inici de la fase estacionària. Es van recolectar i tractar amb NaOH a 0,2 M (Kushnirov 2000). Els extractes es van carregar en un gel SDS-PAGE al 10% d'acrilamida, que acoplada a una membrana de PVDF (Millipore) i es van incubar amb l'anticòs primari, anticòs anti-His₆ monoclonal de ratolí. Per visualitzar les bandes, el *blot* es va incubar amb el l'anticòs secundari anti-ratolí de cabra, amb peroxidasa (HRP). Les bandes es van detectar

per quimioluminiscència amb luminol i peròxid en el Bio-Rad Chemidoc XRS (González et al. 2010).

L'activitat butanodiol deshidrogenassa i alcohol deshidrogenasa dels diferents extractes es va visualitzar amb un isoelectroenfoc (González et al. 2010). Es va utilitzar el gel *precast (pH 3 to 9)* de Bio-Rad (Criterion). Un cop posat el tampó (al compartiment inferior 0.24 mL de H₃PO₄ + 500 mL d'aigua milliQ; al compartiment superior 292 mg de Lys i 348 mg de Arg en 100 mL d'aigua milliQ), i carregades les mostres, es posa en marxa el gel amb les condicions de:

1 hora a 100 V, 25 mA, 2 W

1 hora a 250 V, 25 mA, 2 W

½ hora a 500 V, 25 mA, 2 W

L'activitat BDH es visualitza en el gel amb 0.5 M de 2,3-butanodiol (una mescla dels diferents isomers), 2 mM de NAD, 0.08 mg/ml de *phenazine methosulfate* (PMS), i 0.8 mg/ml de *nitroblue tetrazolium* (NBT), en tampó fosfat sòdic 33 mM pH 7. L'activitat ADH es visualitza en el gel amb 25 mg de NAD⁺ (o NADP⁺), 15 mg NBT i 2 mL EtOH absolut, en tampó fosfat sòdic 33 mM pH 7.

Assajos de formació de productes

Amb els enzims purificats es van fer assajos de formació de productes per tal de determinar l'estereosepecificitat dels enzims.

Aquestes mescles de reacció van dur-se a terme en criotubs de 5 mL amb *O-ring* de Nirco (Barberà del Vallés, Spain), en agitació continua a temperatura ambient durant tota una nit. En general, totes les mescles porten el mateix, amb petites variacions segons si s'utilitza enzim pur, extracte o cèl·lules permeabilitzades; segons quin sigui l'enzim pur, o que està sobreexpressat en l'extracte o les cèl·lules permeabilitzades; i de quin tipus de reacció (oxidació/reducció) es

tracta. I en totes elles el tampó utilitzat és tampó NaPi a 33 mM i pH 7. Com que l'objectiu és maximitzar la formació dels productes d'estudi, per tal de que la reacció no s'aturés per manca de cofactor, també s'hi introduí un sistema regenerador d'aquest.

En el cas de les AKRs purificades les mescles consten de: substrat a 50 mM (dicetona), NADPH a 1 mM, glucosa-6-fosfat a 100 mM, 3 U. de l'enzim glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, i aproximadament 3 U. pels enzims de llevat i 0,2 U. pels humans, El sistema regenerador de coenzim en aquest cas, es basa en que l'enzim glucosa-6-fosfat deshidrogenasa du a terme la reacció de formació de 6-fosfogluconat a partir de la glucosa-6-fosfat, utilitzant el NADP⁺ format en la primera reacció per a reobtenir NADPH, essent aquesta reacció no tant “neta”, ja que n'obtenim un producte (Figura 26).

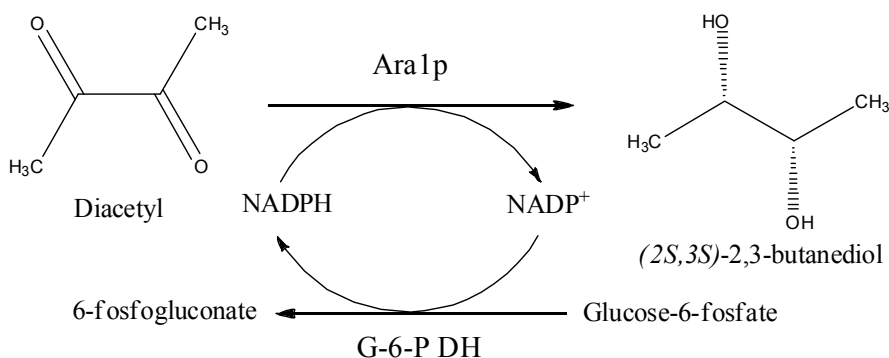


Figura 26. Sistema regenerador de NADPH introduït en les mescles de reacció de Bdh1p. Com s'observa, el NADPH consumit en la reacció principal torna a estar disponible després que la reacció secundària el regeneri

L'altre sistema de regeneració de cofactor es basa en l'activitat de l'enzim formiat deshidrogenasa de *Candida Boidinii* (Woodyer et al. 2006), que du a terme la reacció de formació de CO₂ a partir de formiat, utilitzant el NAD⁺ obtingut en la reacció anterior, tornant a generar NADH (Figura 27). Aquesta reacció és molt “neta”, ja que el producte que obté s'evapora i no pot interferir en res.

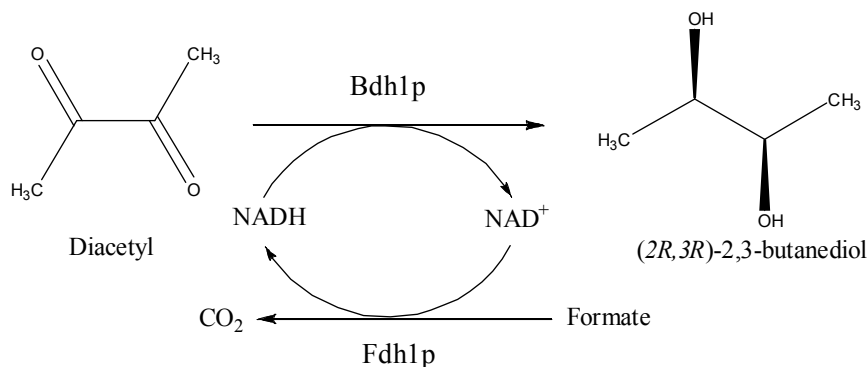


Figura 27. Sistema regenerador de NADH introduït en les mescles de reacció de Bdh1p. Com s'observa, el NADH consumit en la reacció principal torna a estar disponible després que la reacció secundària el regeneri

En les reaccions d'oxidació d'alcohols amb Bdh1p pura, el sistema regenerador consisteix en 50 mM de α -cetoglutarat, 100 mM de clorur d'amoni i 25 unitats de glutamat deshidrogenasa en tampó fosfat sòdic a 33 mM, pH 7 (Woodyer et al. 2006).

Quan es fan reaccions de reducció amb l'enzim Bdh1p pur, la composició inicial de les mescles és: substrat a 50 mM (dicetona o (R/S)-acetoina), 200 U de l'enzim Bdh1p, NADH a 1 mM, formiat sòdic a 100 mM i 4 U de l'enzim Fdh1p de *Candida Boidinii*.

La soca d'elecció a l'hora de fer les mateixes reaccions de reducció utilitzant extracte d'una soca que sobreexpressa Bdh1p, va ser la DP-BDH1 (WV36-405 *P_{GALI}-BDH1* [pYES2-*FDH1*]). Aquesta soca sobreexpressa el gen BDH1 en el genoma, i a més, sobreexpressa el gen FDH1 (que codifica per Fdh1p) en el plàsmid pYES2. El creixement de la soca es va dur a terme en medi mínim SC-Ura més galactosa al 2%, i les cèl·lules van créixer fins a l'inici de la fase estacionària. Posteriorment, les cèl·lules peletejades es van trencar mitjançant boletes de vidre. L'extracte obtingut contenia 150 U d'activitat Bdh1p i 3 U d'activitat Fdh1p endògena. La composició inicial de la mescla de reacció per aquest extracte és: substrat a 50 mM (dicetona o (R/S)-acetoina), NADH a 1mM, formiat a 100 mM i l'extracte.

Per a la permeabilització de les cèl·lules de llevat, feta amb un 0.1 % de digitonina (Cordeiro & Freire 1995), es van utilitzar cèl·lules de la mateixa soca que els extractes, DP-BDH1 (WV36-405 P_{GALI} -BDH1 [pYES2-FDH1]). La composició inicial de la mescla és: substrat a 50 mM (dicetona o (R/S)-acetoina), galactosa al 2%, NADH a 1 mM i formiat a 100 mM.

La proteïna de fusió Fdh1-Bdh1(His)₆p purificada, presentava 180 U d'activitat Bdh1p i 0.3 U d'activitat Fdh1p endògena. La composició inicial de les mescles amb aquesta proteïna de fusió és: substrat a 50 mM (dicetona o (R/S)-acetoina), NAD a 5 mM i formiat a 100 mM.

Posteriorment, es feia una extracció de les mescles utilitzant Cloroform per tal de recuperar les α -hidroxocetones, els possibles diols i el que pogués restar de les dicetones. Aquesta extracció consisteix en:

- Preparar *std intern*: Hexanol (Sigma, EUA). Es fa barrejant 1mL d'hexanol amb 1L d'etanol 10% (v/v). I l'etanol 10% (v/v) es fa mesclant 100 mL d'etanol absolut amb 900mL d'aigua MilliQ.
- En tubs cònics de 15 mL., posar a cada tub:
 - 4mL de Cloroform
 - 1mL de *std intern*
 - 1mL de mostra } en aquest ordre
- Agitar manualment durant 1 minut.
- Després del minut d'agitació, afegir 2,5 gr. de K₂CO₃ a cada tub, tancar i tornar a agitar com abans però durant 30 segons.
- Centrifugar durant 15 minuts a 4000 rpm i a 15°C.
- Preparar els microtubs de 1,5 mL amb tap de rosca necessaris, amb 200 mg de Na₂SO₄ a cada un.
- Afegir a cada microtub 1 mL del sobrenedant del cloroform corresponent.
- Agitar breument en el vórtex.

- Posar 200 µl de cada microtub a cada vialet de vidre, per tal de ser analitzats per CG-MS (Servei d'Anàlisi Química).

Cromatografia de gasos i espectrometria de masses (CG-MS)

Les hidroxiketones i diols d'estudi es recuperen de les mescles *over-night* mitjançant una extracció amb cloroform, tal com s'ha descrit anteriorment per. És important remarcar que a l'hora de fer l'extracció s'addiciona una quantitat coneguda de 1-hexanol com a *standard* intern. Així, en 1 mL total de mescla d'extracció, hi ha una concentració de 1-hexanol de 8 mM. Es fan dues extraccions successives amb cloroform, la primera amb 4 mL i la segona amb 2 mL, juntament amb 2,5 g de K₂CO₃. Aquesta sal s'utilitza per fer que la fase aquosa, on hi haurà la sal, sigui més densa i per tant quedi per sota de la fase orgànica, i en faciliti la presa. Finalment s'ajunten els volums recuperats d'ambdues extraccions. Es van resoldre els diferents estereoisomers de les hidroxiketones i dels diols gràcies a una columna quiral Supelco β-DEX™ 120, 30 m de llargada i 0.25 mm de diàmetre intern, acoplada a un cromatògraf de gasos Hewlett-Packard, equipat d'un espectòmetre de masses com a detector. Les condicions usades en el procés, descrites per González i cols. (Gonzalez et al, 2000).

Es van utilitzar estàndards per identificar els productes obtinguts, quan aquests estan comercialment disponibles, i espectrometria de masses.

Clonació de gens de llevat per tècniques d'auto-clonació (self-cloning)

Construcció de la soca que sobreexpressa Bdh1p i Fdh1p. *Delitto perfetto*

La sobreexpressió del gen *BDHI* s'aconseguí posant-lo sota el control del promotor *GALI*, que és un promotor fort, constitutiu. Per fer-ho, es va desenvolupar una modificació de la tècnica del *delitto perfetto* (Storici et al. 2001).

En primer lloc, s'obtenen fragments linears del doble marcador *URA3-natMX4* (el gen *URA3* prové de *Kluyveromyces lactis*, mentre que el gen *natMX4* prové de *Streptomyces noursei*), mitjançant PCR amb els plàsmids pUG72 i pAG25 (Euroscarf) com a *templates*. Aquests fragments contenen en els seus flancs dues regions idèntiques als locus -520→ -473 i +1→ +48 del gen *BDHI* i el seu promotor, introduïdes pels oligonucleòtids utilitzats en la PCR (Pbdh-ura-fw i Bdh-nat1-rv) (Taula 1). Tot seguit, amb aquests fragments es transforma la soca de llevat WV36-405, amb el mètode de l'acetat de liti (Ito et al. 1983), obtenint-se uns transformants en els que està delecionat el promotor de *BDHI*, així com una part de la regió codificant del propi gen, gràcies a la recombinació homòloga entre els flancs dels inserts lineals i les regions idèntiques del genoma del llevat (el promotor i part del propi gen *BDHI*). Aquests transformants es seleccionen en plaques d'agar de medi YPD, suplementat amb 100 µg/ml de clonNAT (Hans-Knöll Institute für Naturstoffforschung, Jena, Alemanya), que fa que no hi pugui créixer cap cèl·lula de llevat que no contingui una còpia del marcador *natMX4*. Tot i haver crescut en medi que contenia clonNAT, es va verificar que en els transformants el doble marcador estigués en el lloc correcte mitjançant PCR, obtenint així la soca de llevat WV36-405 *URA3-NAT1::P_{bdh1}-bdh1*.

o-FDH-fw	5' CGC <u>GGA TCC</u> AAT ATG TCG AAG GGA AAG G 3'
o-FDH-rv	5' CCG <u>GAA TTC</u> TTA TTT CTT CTG TCC ATA AGC TCT GG 3'
FPint-Rv	5' CAA AGC TCT CAT ACC TTG AAA ATA CAA ATT TTC TTT CTT CTG TCC ATA AGC TCT GG 3'
FPint-Fw	5' CAG AAG AAA GAA AAT TTG TAT TTT CAA GGT ATG AGA GCT TTG GCA TAT TTC AAG AAG 3'
bdh1-his	5' GCG <u>GAA TTC</u> TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG CTT CAT TTC ACC GTG ATT GTT AGG 3'
Pbdh-ura-fw	5' GAG CAG TCG GAA AGA TCA AGA AAG ACT ACG AGA ATC AAT AAA CGA GGC CAA TAC AAC AGA TCA CGT G 3'
Bdh-nat1-rv	5' ATT AGT GAA GTG AAT ATC ACC CTT CTT GAA ATA TGC CAA AGC TCT CAT TCG ACA CTG GAT GGC GGC G 3'
Pbdh-gal-Fw	5' GAG CAG TCG GAA AGA TCA AGA AAG ACT ACG AGA ATC AAT AAA CGA GGC ACG GAT TAG AAG CCG CCG AGC 3'
Bdh-gal-bis-rv	5' ATT AGT GAA GTG AAT ATC ACC CTT CTT GAA ATA TGC CAA AGC TCT CAT TAT CCG GGG TTT TTT CTC CTT GAC G 3'
o-gal1-fw	5' CCG ACG GAA GAC TCT CCT CCG 3'
o-bdh1-rv	5' GGT CCG CAC AAC TGC TGG CAG C 3'

Taula 1. Oligos utilitzats per a la formació de la soca que sobreexpressa BDH1 i FDH1, pel constructe Fdh1-Bdh1(His)6p. Les dianes de restricció estan subratllades, i en verd estan marcades les zones homòlogues per a la recombinació.

A continuació, un dels transformants correctes es va fer créixer en medi líquid SC-Ura, per tal de transformar-lo amb un fragment lineal que conté el promotor *GAL1* flanquejat per la seqüència -520→ -473 del promotor de *BDH1*, i per la

seqüència +1→+48 del propi gen *BDHI*. Aquest fragment s'havia obtingut mitjançant PCR amb els oligos: Pbdh-gal-Fw i Bdh-gal-bis-rv (Taula 1), i utilitzant el plàsmid pYES2-*BDHI* com a *template*. Després de la transformació amb el mateix mètode d'abans (acetat de liti), es van sembrar les cèl·lules en una placa de medi YPD i es van deixar créixer *overnight*.

L'important ara és obtenir cèl·lules que hagin perdut el doble marcador per recombinació homòloga del fragment amb *GALI*. Per a la selecció d'aquestes cèl·lules, l'endemà es fan una rèplica d'aquesta placa en medi SC que porta addicionat 5-FOA (àcid 5-fluoroorotic). Les colònies que creixen en aquesta placa no tenen teòricament l'insert amb el doble marcador, ja que el gen *URA3* codifica per l'enzim orotidina 5'-fosfat descarboxilasa, que converteix el 5-FOA en 5-fluorouracil, que és un compost tòxic que causa la mort celular. Per descartar el cas que les cèl·lules no hagi integrat el promotor *GALI*, i per tant encara tinguin el doble marcador, però hagin succeït mutacions espontànies en el gen *URA3* que permetessin viure a les cèl·lules en el medi amb 5-FOA, es fa una replica d'aquesta placa en una altra amb medi YPD amb clonNAT, on no hi podran créixer les cèl·lules que hagin perdut el marcador *natMX4*. La selecció dels transformants es fa per contra selecció, és a dir, les colònies que creixen en el medi amb 5-FOA, però no creixen en el medi amb clonNAT, són les que han integrat el fragment del promotor *GALI* (Figura 28).

Els diversos transformants es van verificar mitjançant PCR amb els oligos o-gal1-fw i o-bdh1-rv (Taula 1), i posteriorment un d'ells per seqüenciació.

Aquesta nova soca (WV36-405 *bdh1::P_{GALI}-BDHI*), va ser transformada finalment amb el plàsmid pYES2-*FDHI*, i seleccionada de plaques amb medi SC-Ura, obtenint així una nova soca de llevat anomenada DP-BDH1, que sobreexpressa Bdh1p (a nivell cromosòmic amb el nou promotor *GALI*), i Fdh1p (a nivell plasmídic amb el mateix promotor *GALI* que conté el plàsmid), si creix amb galactosa. Els extractes i les cèl·lules permeabilitzades utilitzades en aquest

estudi, provenen d'aquesta soca creixuda fins l'inici de la fase estacionària en medi SC-Ura amb el 2% de galactosa.

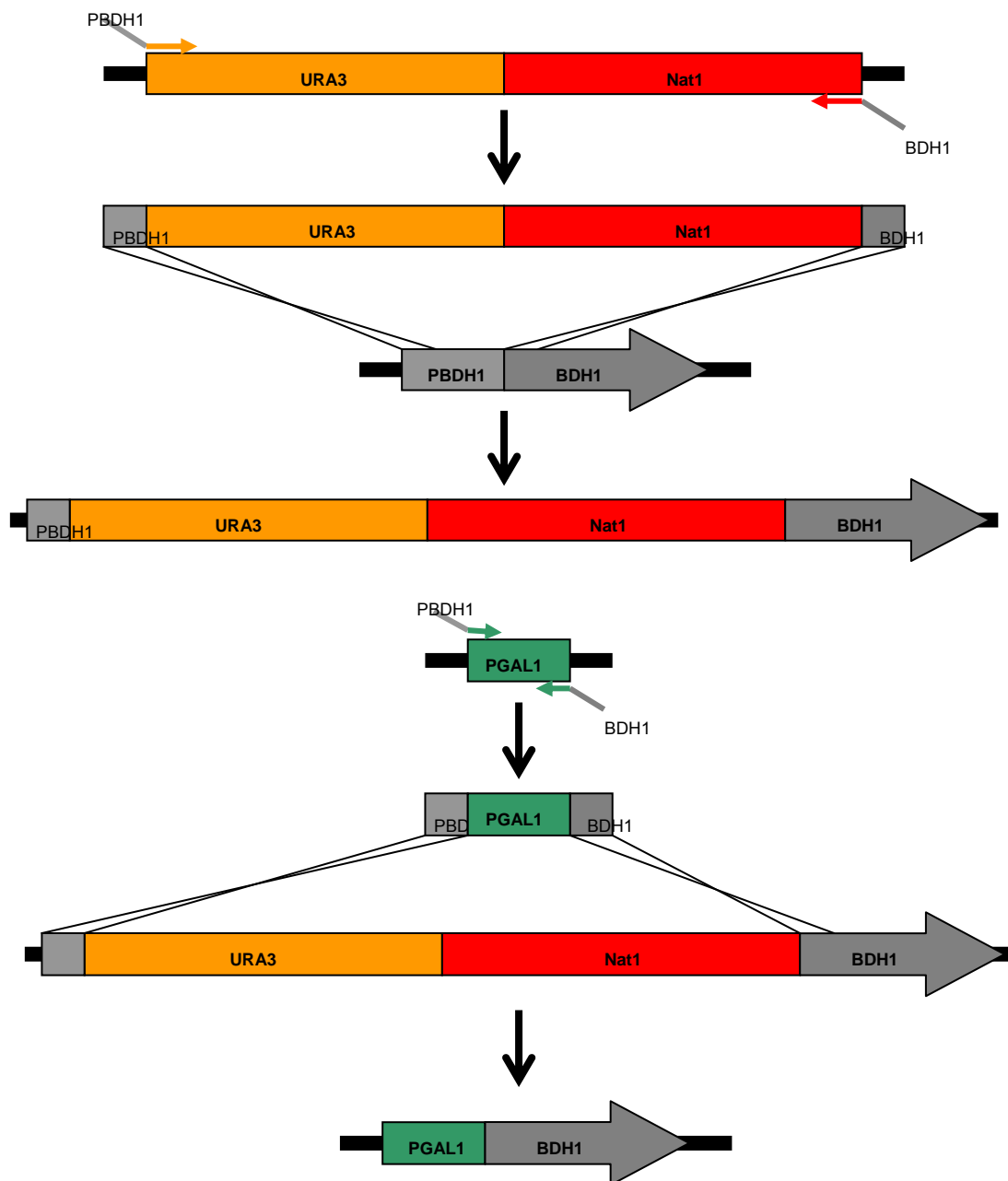


Figura 28. Procés total per l'auto-clonació. S'observa l'entrada del doble marcador en el lloc del PBDH1 en primer lloc, i la posterior curació amb l'insert PGAL1.

Formació de la proteïna de fusió (FDH1p-Bdh1-(His)₆p)

El gen de la formiat deshidrogenassa (*FDH1*) de *S. cerevisiae* va ser amplificat mitjançant PCR a partir de ADN genòmic del llevat, amb els oligonucleòtids o-FDH-fw i o-FDH-rv (Taula 1). S'utilitzà un gel d'agarosa per tal d'obtenir els

amplificats, que un cop recuperats del gel, van ser digerits amb els enzims de restricció *Bam*HI i *Eco*RI, juntament amb el plàsmid pYES2. Finalment, la lligació d'ambdós ens permet tenir el gen clonat en el vector, obtenint el constructe pYES2-*FDH1*. Aquest va ser seqüenciat per tal de verificar que durant la reacció de la PCR no s'haguessin introduït mutacions en la seqüència del gen. Per a l'obtenció de l'altre constructe necessari, pYES2-*BDH1*-6His, es va utilitzar el mateix mètode. Així, aquests dos constructes són el punt de partida per a l'obtenció del constructe d'interès pYES2-*FDH1*-*BDH1*-6His, que expressa la proteïna de fusió desitjada. Aquesta proteïna està formada per la Fdh1p en l'extrem N-terminal, i la Bdh1-(His)₆p en l'extrem C-terminal, unides pel pèptid ENLYFQG com a *linker*.

El constructe que codifica la proteïna de fusió (Figura 29), es va obtenir en tres passos, consistents en tres reaccions de PCR.

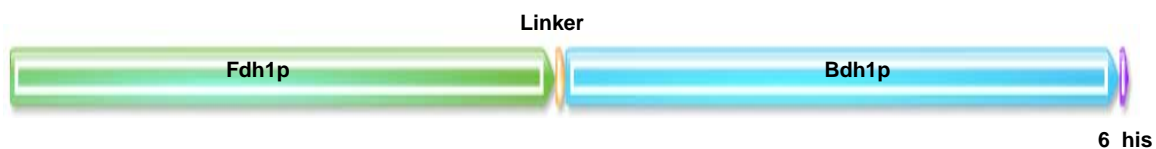


Figura 29. Constructe de la proteïna de fusió *FDH1*-*BDH1*-6His

En primer lloc, una PCR amb els oligonucleòtids o-FDH-fw i FPint-Rv (aquest és el que introdueix el *linker*) (Taula 1) juntament amb el constructe pYES2-*FDH1* com a *template*. Amb aquesta reacció s'obté un fragment que conté el gen *FDH1* fusionat amb el gen que codifica el pèptid *linker*.

En segon lloc, es duu a terme una PCR amb els oligonucleòtids FPint-Fw i bdh1-his, juntament amb el constructe pYES2-*BDH1*-6His com a *template*, de la que s'obté un fragment en el que hi ha fusionats els gens *BDH1*-6His i el que codifica pel ja anomenat *linker*.

Finalment, la darrera PCR en la que s'utilitza una mescla d'aquests dos fragments com a *template*, que contenen una regió complementària (en color verd en els oligos de la taula 1), juntament amb els oligonucleòtids externs o-FDH-fw i bdh1-his, de la que s'obté el gen complet que codifica per la proteïna de fusió Fdh1p-Bdh1(His)₆p.

Un cop obtinguts els amplificats de la última PCR, es carreguen en un gel d'agarosa per tal d'obtenir-los purs. Un cop retallada la banda del gel que els conté, i recuperats, es digereixen amb els enzims de restricció *Bam*HI i *Eco*RI, juntament amb el plàsmid. Un cop clonats, van ser verificats per seqüenciació. Els plàsmids amb el constructe correcte, s'introdüïren a la soca de llevat mitjançant el mètode de l'acetat de liti (Ito et al. 1983), i els transformants van ser seleccionats per auxotrofia en medi SC-Ura, gràcies al gen *URA3* del plàsmid.

Mutants de Adh1p i Adh3p

En aquesta part de la Tesi es pretén introduir mutacions puntuals en la seqüència aminoacídica d'Adh1p i d'Adh3p, amb la idea inicial d'aconseguir mutants depenents de NADPH (ambdós enzims són depenents de NADH), i mutants incapaços d'utilitzar cap dels 2 coenzims. Així, s'han introduït dos tipus de mutacions en els gens *ADH1* i *ADH3*: en una d'elles s'ha canviat una seqüència implicada en la unió al NAD(H) (D201S, G202R, G203S). S'ha triat aquesta seqüència perquè és un dels determinants de la preferència d'Adh6p per NADP(H) (Valencia et al. 2004). L'altra mutació ha introduït els aminoàcids D201A, K206A en aquesta mateixa posició.

Per a l'obtenció d'aquests mutants d'Adh1p i Adh3p, s'ha utilitzat una variant de la tècnica del *delitto perfetto* (Storici et al. 2001). desenvolupada al nostre laboratori (el doble cassette *URA3-natMX4*). A diferència dels altres exemples de la Tesi en els que es clonaven gens sencers, o trossos grans com promotors, en aquest cas només es varen introduir mutacions puntuals.

La tècnica consisteix, bàsicament, en dos passos: primer s'insereix el doble marcador *URA3-natMX4* en el lloc d'interès, que en aquest cas es una part de *ADH1* implicada en la unió a NAD(H). A continuació es "cura" la part mutada inserint-hi el gen *ADH1** amb la mutació desitjada (Figura 30). Després de la

selecció de transformants *adh1::URA3-natMX4*, es va amplificar un fragment de ADH1 amb la mutació desitjada: es dissenyen 4 oligonucleòtids, dels quals 2 seran “interns” i els altres 2 “externs”. Els interns hibriden a la seqüència del gen que flanqueja la zona que es vol mutar incorporant la mutació desitjada. Els externs, hibriden a l’exterior de la regió a mutar i permetran la recombinació posterior. Els oligos emprats pel procés amb *ADH1* estan a la taula 2, mentre que els utilitzats en el procés amb *ADH3* estan a la taula 3.

Les mutacions introduïdes es varen comprovar per seqüenciació dels gens *ADH1** mutats.

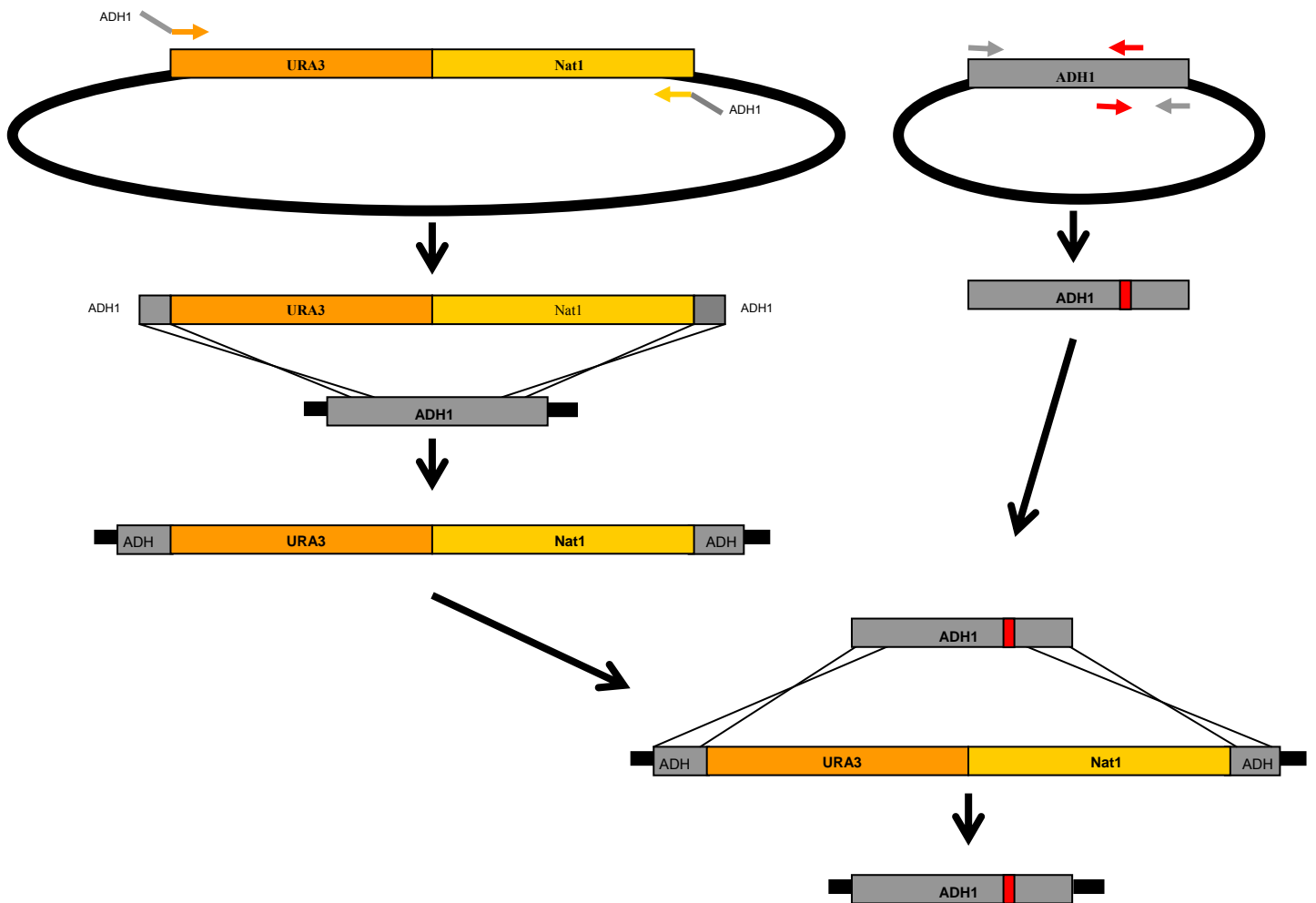


Figura 30. Obtenció d'un mutant d'ADH1. A la figura s'observa el procés global per a l'obtenció d'un mutant d'ADH1. Per un cantó es veu l'amplificació del doble marcador i posterior inserció al cromosoma en el lloc d'ADH1, gràcies a recombinació homòloga. Per l'altre, es veu l'introducció de la mutació al gen deguda a l'acció combinada dels 4 oligonucleòtids. I, finalment, l'inserció del gen mutat al lloc que ocupava inicialment en substitució del doble marcador.

Per amplificar [*URA3 nat1*] i substituïr el gen (*ADHI*)

ADHI-FOA-NAT fwd:

TCAAGCTATACCAAGCATACAATCAACTATCTCATATACA**CAATACAACAGATCACGTG**

ADHI-NAT-FOA rev:

CTTATTTAATAATAAAAATCATAAATCATAAGAAATTCGC

Per obtenir l'insert *ADHI* mutat

Externs per curació:

adh1-cur-fwd:

TCAAGCTATACCAAGCATACAATCAACTATCTCATATACA**ATGTCTATCCCAGAAACTCAAAAAG**

adh1-cur-rev:

CTTATTTAATAATAAAAATCATAAATCATAAGAAATTCGC**TTATTTAGAAGTGTCAACAACGTATCACC**

Interns per mutació SRS:

adh1-SRS1:

GTCTTGGGTATTTCTAGATCTGAAGGTAAGGAAG

adh1-SRS2:

CTTCCTTACCTTCAGATCTAGAAATACCCAAGAC

Interns per mutació NiNi:

adh1-NN: A1-AA1:

GAGTCTTGGGTATTGCCGGCGGTGAAGGTGCCGAAGAATTATTCAGATCC

adh1-NN: A1-AA2:

GGATCTGAATAATTCTTCGGCACCTTCACCGCCGCAATACCCAAGACTC

Taula 2. Oligos per a l'obtenció dels mutants d'*ADHI*. Tots els oligos estan posats en sentit 5'-3'

El primer parell s'utilitza per amplificar el doble marcador, la part marcada en vermell de l'oligo *ADHI-FOA-NAT fwd* és la que hibrida amb l'inici del gen *URA3*. El parell d'oligos externs, que serviran per la curació del marcador *URA3-Nat1*, són els mateixos per dur a terme ambdues mutacions i són l'inici i el final del gen, i també porten marcats amb vermell els nucleòtids que que duran a terme l'hibridació. Els altres dos parells són els específics per cada mutació, i en vermell s'hi observen les bases que s'han canviat.

Per amplificar [*URA3 nat1*] i substituir el gen (*ADH3*)

adh3-ura3-fw:

GAGAATAAGGGGAAGCTGCATTACAAAGATATCCCTGTCCCCG**CAATACAACAGATCACGTG**

adh3-nat1-rw:

GGACTTCACCACATGAGAGAATACCTCTGATTTAACGTAGGCG**TCGACACTGGATGGCGGCG**

Per obtenir l'insert *ADH3* mutat

Externs:

adh3-in-fw:

ATGTTGAGAACGTCAACATTG

adh3-fi-rv:

TTATTTACTAGTATCGACGACG

Interns per mutació SRS:

adh3-mut-fw:

GAGTTCTAGGTATT**TCTAGATCT**GAGGAAAAGGAAAAAC

adh3mut-rv:

GTTTTTCCTTTTCCTC**AGATCTAG**AAATACCTAGAACTC

Interns per mutació NiNi:

adh3-mut2-fw:

GAGTTCTAGGTATT**GCTAGATCAGAGGAAGCAG**AAAAAC

adh3mut2-rv:

GTTTTTC**TGCT**TTCCTCTGATCT**AGCA**AATACCTAGAACTC

Taula 3. Oligos per a l'obtenció dels mutants d'*ADH3*. Tots els oligos estan posats en sentit 5'-3'

El primer parell s'utilitza per amplificar el doble marcador, que són les parts marcades en vermell (en *adh3-ura3-fw* és l'inici del gen *URA3*, i en *adh3-nat1-rw* és el final de *NAT1*), mentre que l'altre part són les seqüències idèntiques al gen encarregades de la recombinació homòloga. El parell d'oligos externs, que serviran per la curació del marcador, són els mateixos per dur a terme ambdues mutacions i són l'inici i el final del gen. Els altres dos parells són els específics per cada mutació, i en vermell s'hi observen les bases que s'han canviat.

Resultats

Purificació de diverses AKRs de llevat i humanes. Determinació de les seves Mr.

L'enzim de llevat Ara1p (AKR3C1) es va purificar d'un extracte cru de cèl·lules de *S. cerevisiae* que sobreexpressaven la proteïna Ara1(His)6p. Es varen emprar dos passos de cromatografia: DEAE Sepharose i cromatografia d'afinitat (Affi-Gel Blue). L'activitat específica final va ser de 14.7 U/mg, mesurada en una mescla que contenia 100mM de diacetil i 0,2 mM de NADPH.

Els enzims de llevat Yjr096p (AKR5F) i Ydl124p (AKR5G) van ser purificats d'extractes crus de llevat que els sobreexpressaven en tres passos de cromatografia: cromatografia Ni²⁺-NTA (gràcies a la cua de 6 histidines que es van clonar a l'extrem carboxil d'ambdues proteïnes), cromatografia d'afinitat (Red-Sepharose) i cromatografia de gel filtració. Les activitats específiques finals en les mateixes condicions que Ara1p (100mM de diacetil i 0,2mM de NADPH), van ser de 4,7 U/mg per Yjr096p i de 44 U/mg per Ydl124p.

Les AKRs humanes, AKR1B i AKR1B10, van ser purificades d'un extracte cru de *E. Coli* en un pas cromatogràfic: cromatografia Ni²⁺-NTA (gràcies a la cua de 10 histidines que es van clonar a l'extrem amino d'ambdues proteïnes).

Les activitats específiques finals, mesurades en les condicions mencionades més amunt (100mM de diacetil i 0,2mM de NADPH), van ser 0.6 U/mg per AKR1B1 i 6.8 U/mg per a AKR1B10

Quan s'analitzen les preparacions amb els enzims purificats en un gel electroforètic SDS-PAGE, s'observa una banda per a cada un, excepte per a AKR3C1 (Figura 32, carril 2). En aquest cas, per sota de la banda esperada per

aquesta proteïna, s'hi veuen un seguit de bandes de menor Mr. Aquestes bandes responen a degradació natural de l'extrem N-terminal de la proteïna (Amako et al. 2006).

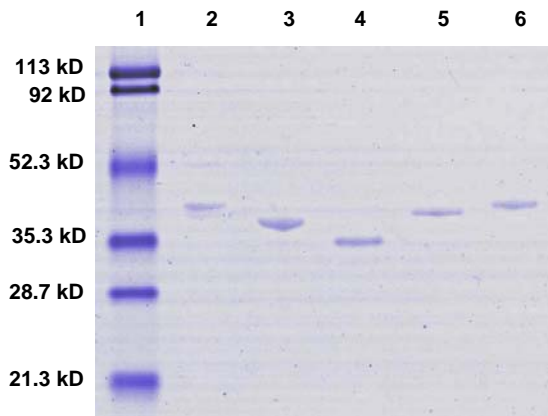


Figura 31. Gel SDS-PAGE de les AKRs purificades. Carril 1: marcador de pesos; carril 2: AKR3C1; carril 3: ; carril 4: , carril 5: AKR1B1; carril 6: AKR1B10.

. Per a la determinació de la Mr dels enzims de llevat, després de la purificació van ser carregats en una columna de gel-filtració SuperDex, calibrada amb proteïnes estàndard. Les Mr són: 85,000 per AKR3C1, 30,000 per AKR5F i 33,000 per AKR5G (Figura 32). Tenint en compte aquestes Mr, es conclou que AKR3C1 és un homodímer, mentre que AKR5G i AKR5F són monòmers, també en concordança amb el descrit prèviament per a AKR5G. Per contra, aquest estudi és el primer que conclou que AKR5F és un monòmer.

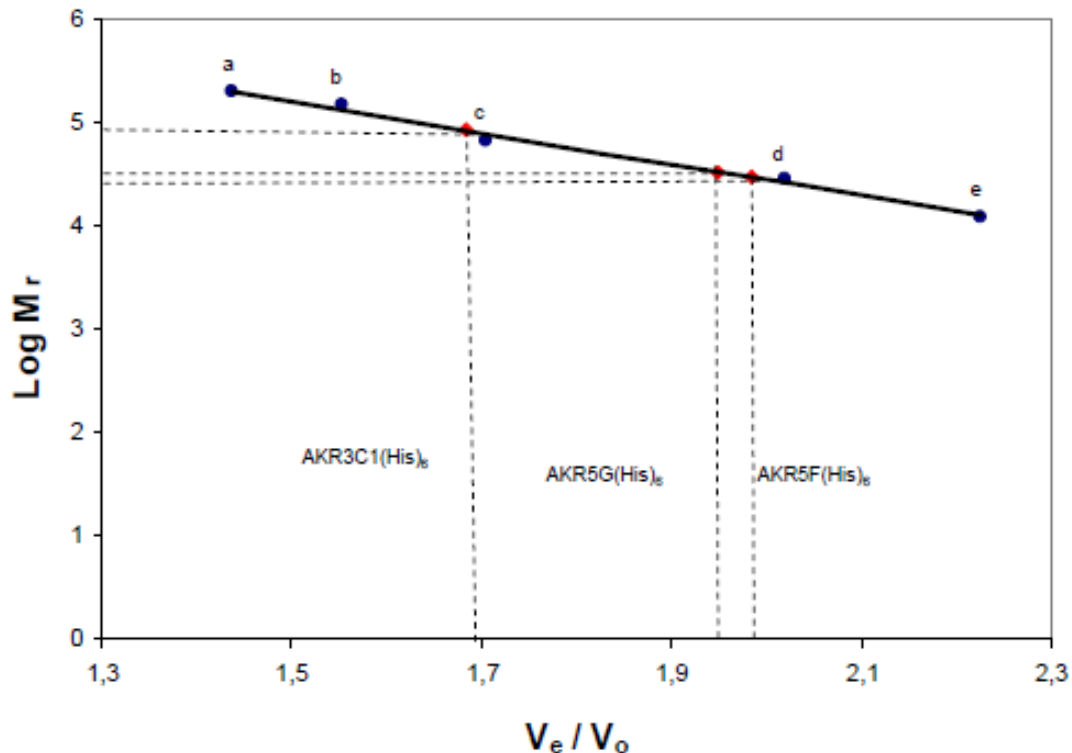


Figura 32. Recta per a la determinació dels pesos moleculars de les AKRs. a: β -amilasa ($M_r=200,000$); b: alcohol deshidrogenasa de llevat ($M_r=150,000$); c: albúmina de sèrum boví ($M_r=66,000$); d: anhidrasa carbònica ($M_r=29,000$) i citocrom C ($M_r=12,400$). Interpolant a la recta s'obtenen les M_r de AKR3C1 (85,000), AKR5F (30,000) i AKR5G (33,000)

Especificitat de substrat i paràmetres cinètics.

Per a l'estudi de l'eficàcia en la reducció de dicetones dels enzims humans i de llevat, es van determinar els paràmetres cinètics d'aquests enzims en la reducció del diacetil en presència de NADPH a 0.2 mM (Taula1).

Les AKRs més eficients alhora de reduir el diacetil són AKR5G i AKR1B10, com es pot veure a la (Taula 4), mentre que AKR5F no mostra saturació amb aquest substrat, i la seva activitat específica front diacetil és significativament més baixa que les de les altres AKRs de llevat (mesurades a la mateixa concentració de substrat). Si es comparen aquestes activitats específiques de les diferents AKRs de llevat, s'observa que la de AKR3C1 és 3 vegades superior a la de AKR5F, i la de AKR5G n'és 10 vegades superior.

	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)
AKR3C1 (Ara1p)	8.8	5.4	1600
AKR5F (Yjr096p)	NS	NS	25 ^a
AKR5G (Ydl124p)	26	1.2	22000
AKR1B1	0.39	0.11	3500
AKR1B10	4.3	0.54	8000

Taula 4: Paràmetres cinètics front diacetil de les AKRs

	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)
2,3-pentanodiona	6.4	2.2	2900
2,3-hexanedione	6.3	2.1	3000
3,4-hexanedione	3.1	19	160

Taula 5: Paràmetres cinètics front les dicetones vicinals de l'enzim de

Un fet destacable que es pot extreure a l'observar aquests valors d'activitat, és que AKR3C1 presenta una preferència lleugerament superior per les dicetones asimètriques (2,3 pentanodiona i 2,3-hexanodiona) que per les simètriques (diacetil i 3,4-hexanodiona) (Taula 5). Tot i això, tant aquesta proteïna com la resta de AKRs estudiades, mostren una major activitat específica front el substrat més petit (diacetil), excepte AKR5F, la qual mostra una activitat específica superior, i molt semblant a la del diacetil, per 2,3-hexanodiona (Taula 6).

	AKR3C1 (Ara1p)	AKR5F (Yjr096p)	AKR5G (Ydl124p)	AKR1B1	AKR1B10
2,3-pentanedione	73	78	20	49	27
2,3-hexanedione	72	110	20	15	18
3,4-hexanedione	35	48	31	24	13

Taula 6: Activitats relatives front les dicetones vicinals de les AKRs

Totes les AKRs utilitzades en aquest estudi, són, en principi, dependents de NADPH. Substituint el coenzim NADPH per NADH, les activitats específiques que es van obtenir són inferiors a l'1% de les que s'havien obtingut amb NADPH.

També es va voler comprovar la influència de la cua d'histidines en l'acció de les AKRs. Per fer-ho, es van agafar com a model les proteïnes AKR3C1 i AKR3C1(His)₆, i se'n van calcular els paràmetres cinètics *k*_{cat}, *K*_M i observar-ne l'enantioespecificitat front diacetil. La enantioespecificitat (donant configuració *S*) és la mateixa per les dues proteïnes i, els valors de *K*_M són idèntics (dintre de l'error experimental). L'única diferència és el valor de *k*_{cat} en que la *k*_{cat} de AKR3C1 és aproximadament el doble que la de AKR3C1(His)₆.

Regioselectivitat i estereoselectivitat de les AKRs.

El concepte de regioselectivitat fa referència “al grup funcional” de la molècula on actua l'enzim, d'entre d'altres grups funcionals idèntics de la mateixa molècula (al nostre cas, la preferència d'acció sobre un grup ceto concret dels dos possibles, o sobre un grup hidroxil si es duu a terme la reacció d'oxidació)). El concepte estereoselectivitat fa referència a “com” actua l'enzim, en el sentit de quina configuració (*R* o *S*) atorga al grup on hi fa la reacció, i quina configuració necessita que tingui el grup on ha d'actuar.

Alhora d'estudiar la regio i l'estereoselectivitat de les AKRs en la reducció de dicetones, es van fer barreges de reacció, en presència de sistemes de regeneració de NADPH i es varen analitzar els productes emprant un cromatògraf de gasos (provist d'una columna quiral) acoplat a un espectròmetre de masses.

A la figura 33 s'hi observa el comportament mostrat per l'enzim AKR5F en la reducció de les dicetones veïnes: tant la reducció de diacetil, 2,3-pentàdiona i 2,3-hexàdiona va donar majoritàriament (més del 95%) la corresponent α -hidroxicetona en configuració *S*. A part, va mostrar regioselectivitat, reduint el grup ceto més proper a l'extrem de la molècula. Una excepció a aquesta regla s'observa en la reducció de 3,4-hexàdiona, en la que AKR5F dona una mica de (4*R*)-hidroxi-3-hexanona (un 9% aproximadament).

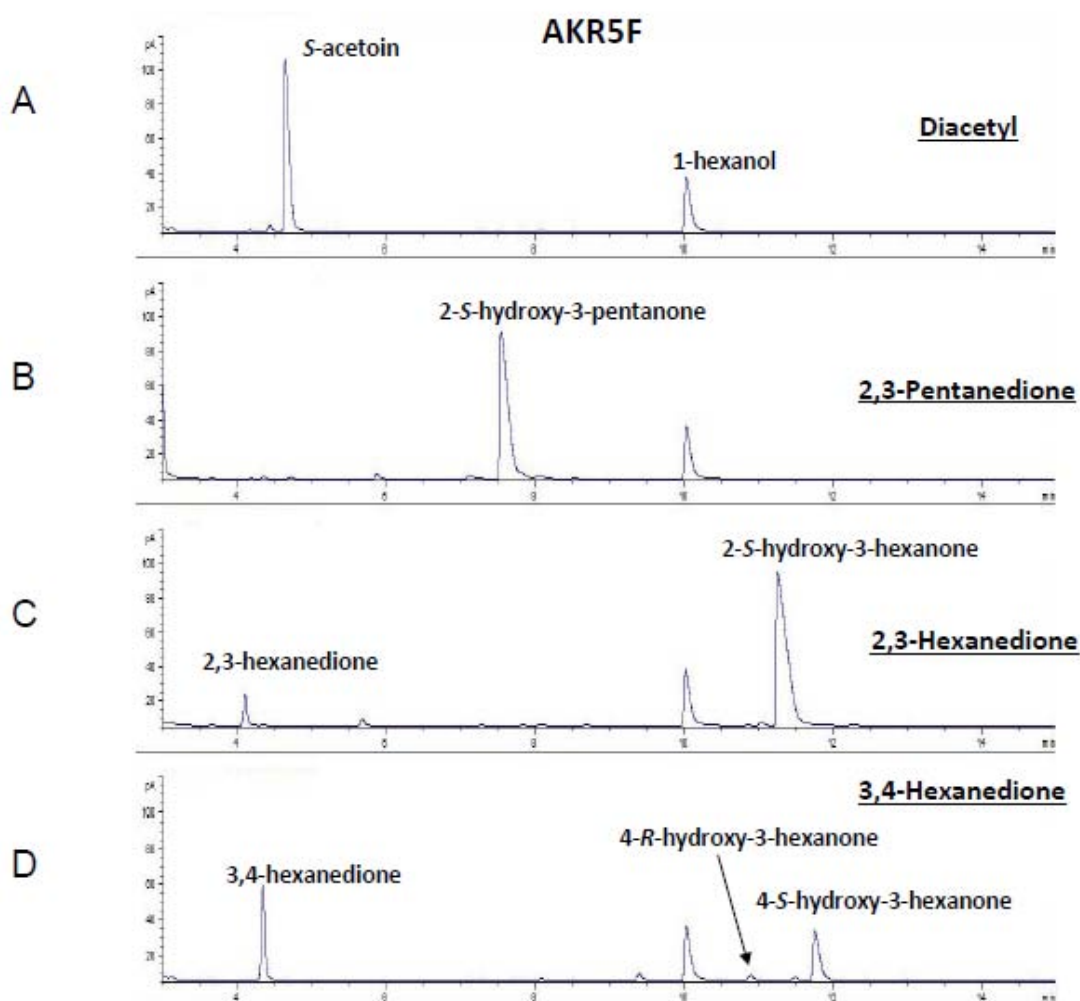


Figura 33. Cromatogrames de AKR5F. S'hi mostren els pics dels productes que s'obtenen quan s'utilitza AKR5F per reduir: A: diacetil; B: 2,3-pentanodiona; C: 2,3-hexanodiona; D: 3,4-hexandiona. El pic que apareix en tots els cromatogrames correspon al 1-hexanol, que és el marcador intern.

De les 5 AKRs estudiades, només la proteïna de llevat AKR5G mostra un comportament diferent de la resta. Les altres, AKR3C1 i AKR5F de llevat, i

AKR1B1 i AKR1B10 humanes, obtenen, en més d'un 96%, α -hidroxicetones en configuració *S*, comportant-se, per tant, com AKR5F.

Per altra banda, l'enzim AKR5G mostra un comportament diferent (Figura 34), donant hidroxicetones en configuració *R* principalment. Mostra a part regioselectivitat, envers el grup 3-oxo en la reducció de la 2,3-pentàdiona (donant (3*R*)-hidroxi-2-pentanona), però en el cas de la reducció de la 2,3-hexàdiona dona 22% de (2*R*)-hidroxi-3-hexanona i la resta (3*R*)-hidroxi-2-hexanona.

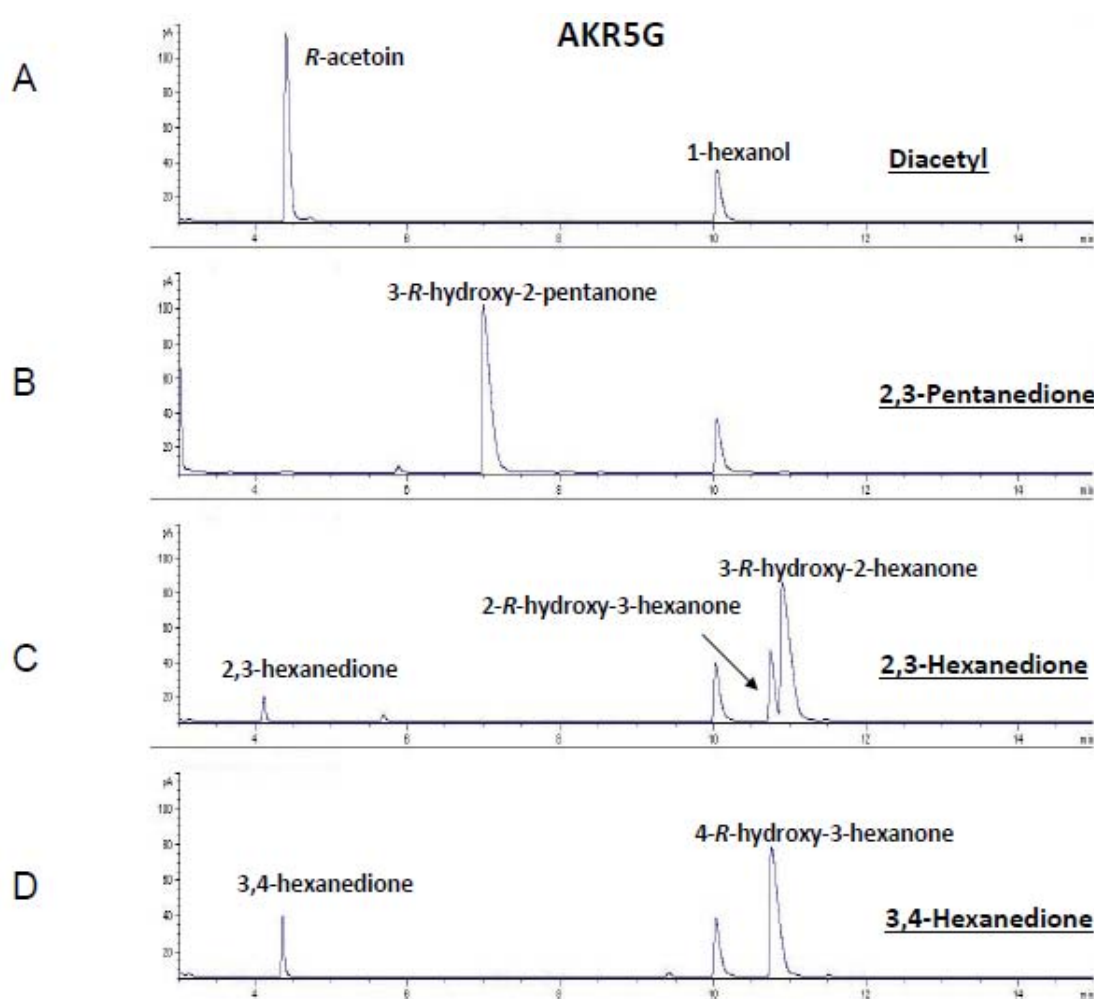


Figura 34. Cromatogrames de AKR5G. S'hi mostren els pics dels productes que s'obtenen quan s'utilitza AKR5G per reduir: A: diacetil; B: 2,3-pentanonidona; C: 2,3-hexanonidona; D: 3,4-hexanonidona. El pic que apareix en tots els cromatogrames correspon al 1-hexanol, que és el marcador intern.

La Figura 35 i taula 7 següents, resumeixen els comportaments de les AKRs estudiades envers les dicetones veïnes.

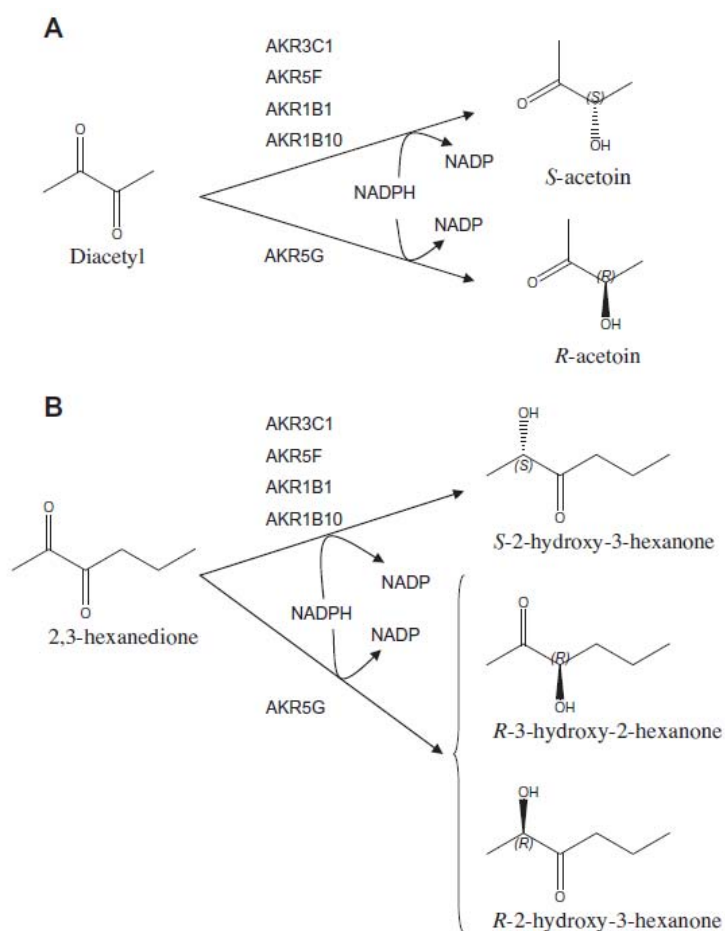


Figura 35. Resum de l'estereoespecificitat de les AKRs. S'hi observen els diferents productes i la seva configuració, que obtenen les diverses AKRs front: A: diacetil; B: 2,3-pentanodiona. Totes excepte AKR5G són estereoespecífiques per la configuració *S*, obtenint *S*-acetoïna i *S*-2-hidroxi-3-hexanona, mentre que AKR5G obté *R*-acetoïna, *R*-3-hidroxi-2-hexanona i *R*-2-hidroxi-hexanona, essent estereoespecífic per la configuració *R*.

A			
AKRs de llevat			
Substrat	AKR3C1	AKR5G	AKR5F
Diacetil	(S)-Acetoina (>97%)	(R)-Acetoina (>97%)	(S)-Acetoina (>97%)
2,3-pentanodiona	(S)-2-hidroxi-3-pentanona (>99%)	(R)-3-hidroxi-2-pentanona (>98%)	(S)-2-hidroxi-3-pentanona (>98%)
2,3-hexanodiona	(S)-2-hidroxi-3-hexanona (>99%)	(R)-2-hidroxi-3-hexanona (22%) (R)-3-hidroxi-2-hexanona (78%)	(S)-2-hidroxi-3-hexanona (>97%)
3,4-hexanodiona	(S)-4-hidroxi-3-hexanona (>96%)	(R)-4-hidroxi-3-hexanona (>99%)	(S)-4-hidroxi-3-hexanona (91%) (R)-4-hidroxi-3-hexanona (9%)
(R,S)-Acetoina	(S,S)-2,3-butanodiol (58%) (meso)-2,3-butanodiol(42%)	L.A.	L.A
B			
AKRs humanes			
Substrat	AKR1B1	AKR1B10	
Diacetil	(S)-Acetoina (>98%)	(S)-Acetoina (>98%)	
2,3-pentanodiona	(S)-2-hidroxi-3-pentanona (>99%)	(S)-2-hidroxi-3-pentanona (>99%)	
2,3-hexanodiona	(S)-2-hidroxi-3-hexanona (>98%)	(S)-2-hidroxi-3-hexanona (>97%)	
3,4-hexanodiona	(S)-4-hidroxi-3-hexanona (>99%) (S,S)-3,4-hexanodiol	(S)-4-hidroxi-3-hexanona (>99%)	
(R,S)-Acetoina	(S,S)-2,3-butanodiol (30%) (meso)-2,3-butanodiol(70%)	(S,S)-2,3-butanodiol 26%) (R,R)-2,3-butanodiol (16%) (meso)-2,3-butanodiol (58%)	

Taula 7. Estereoselectivitat de les AKRs humanes i de llevat en la reducció de les dicetones vicinals. S'hi mostren els percentatges de formació de cada producte obtingut en les reduccions de les dicetones vicinals i l'acetoina de: A: AKRs de llevat; B: AKRs humanes. Les reaccions que han tingut una activitat de l'enzim inferior al 5% de la que té el mateix enzim front diacetil, no s'han tingut en compte (L.A.).

Acció de les AKRs en la reducció d'acetoina.

Prèviament, ja s'havia descrit la capacitat de reduir diacetil de les dues AKRs humanes AKR1B1 i AKR1B10. En aquests estudi s'ha demostrat que també són capaces de reduir les altres dicetones vicinals emprades, essent usades com a biocatalitzadors. Ambdós enzims obtenen d'aquesta reducció les

corresponents (*S*)- σ -hidroxicetones (a l'igual que AKR3C1 i AKR5F), però amb matisos. A més, en la taula 7 s'hi pot observar que l'únic enzim capaç de reduir els dos grups cetònics, en el cas de la 3,4-hexanodiona, i obtenir (*3S,4S*)-3,4-hexanodiol, és AKR1B1.

També s'han identificat els productes obtinguts per les AKRs de llevat i humanes, partint d'acetoïna i en presència de NADPH i un sistema regenerador de NADPH. Només AKR3C1, AKR1B1 i AKR1B10 són actius front una mescla racèmica d'acetoïnes, obtenint-se en tots els casos una mescla de 2,3-butanodiols. Així, AKR3C1 i AKR1B1 obtenen una mescla de (*meso*)-2,3-butanodiol i (*2S,3S*)-2,3-butanodiol, mentre que AKR1B10 obté també (*2R,3R*)-2,3-butanodiol, aconseguint els tres estereoisòmers possibles (Figures 36 i 37).

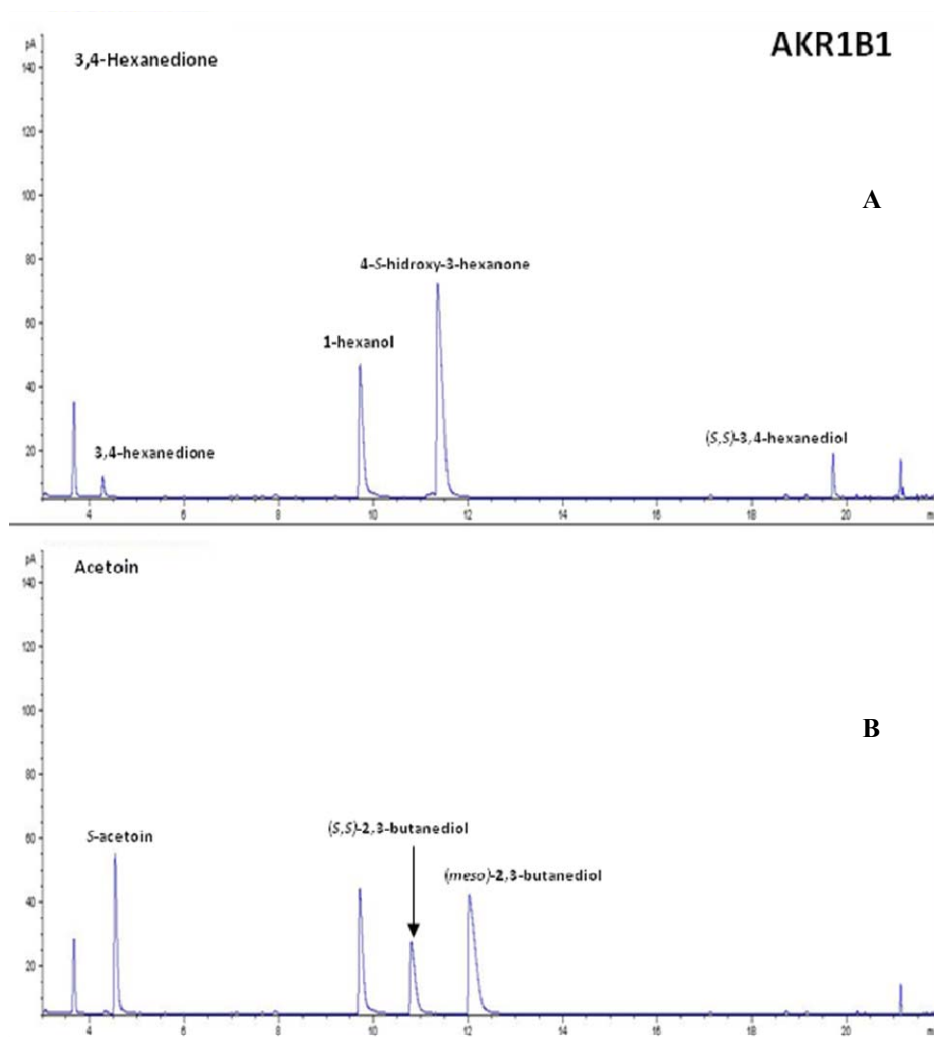


Figura 36. Cromatogrames de AKR1B1. S'hi mostren els pics dels productes que s'obtenen quan s'utilitza AKR1B1 per reduir 3,4-hexandioina i acetoina. El pic que apareix en els dos cromatogrames correspon al 1-hexanol, que és el marcador intern.

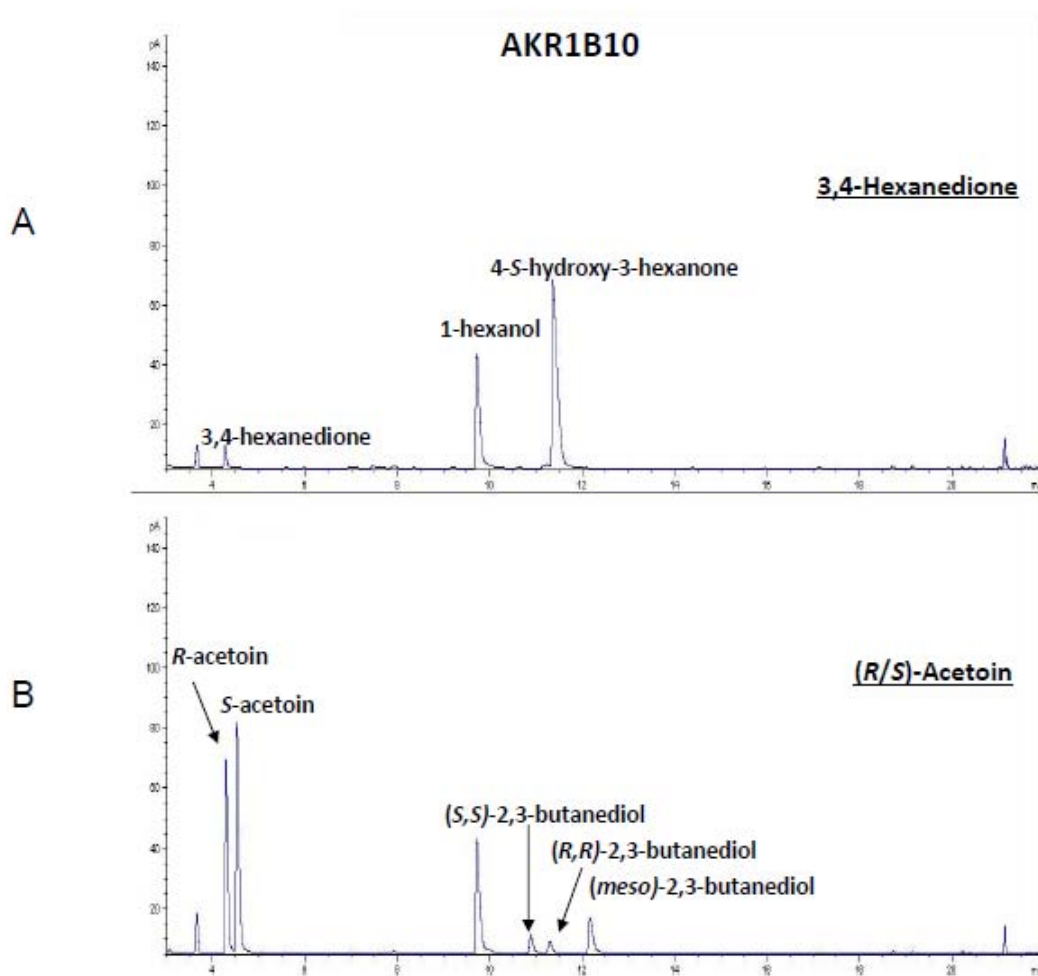


Figura 37. Cromatogrames de AKR1B10. S'hi mostren els pics dels productes que s'obtenen quan s'utilitza AKR1B10 per reduir: A: 3,4-hexanoïona; B: acetoina. El pic que apareix en els dos cromatogrames correspon al 1-hexanol, que és el marcador intern.

Els paràmetres cinètics i estereoselectivitat de Bdh1p envers dicetones veïnes

La Taula 8 mostra els paràmetres cinètics determinats per l'enzim Bdh1p envers acetoïna, diacetil, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona i 3,4-hexanodiona. La constant d'especificitat k_{cat} / K_M disminueix des de acetoïna a 2,3-hexanodiona i després torna a augmentar per 3,4-hexanodiona.

	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$)
(<i>R/S</i>)-acetoin	1,625±83	3±0.6	5.4x10 ⁵ ±1.3x10 ⁵
diacetyl	1,735±165	60±2	2.9x10 ⁴ ±0.4x10 ⁴
2,3-pentanedione	826±83	33±7	2.5x10 ⁴ ±0.8x10 ⁴
2,3-hexanedione	55±8	6±3	9x10 ³ ±6x10 ³
3,4-hexanedione	22±1	0.7±0.2	3x10 ⁴ ±1x10 ⁴

Taula 8. Paràmetres cinètics de l'enzim Bdh1p. Paràmetres cinètics determinats per l'enzim Bdh1p envers acetoina, diacetil, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona i 3,4-hexanodiona.

La reacció de Bdh1p pura amb diacetil produeix específicament (2R, 3R) - 2,3-butanodiol, amb un rendiment del 95%, i una quantitat molt menor de R-acetoina (Figura 38, panell A). La puresa de l'estereoisòmer (2R,3R)-2,3-butanodiol obtingut, s'ha determinat afegint una concentració coneguda de meso-2,3-butanodiol i (2S, 3S) -2,3-butanodiol a la meitat de la barreja de reacció obtinguda, mentre es va afegir un volum igual de tampó a l'altra meitat de la reacció. Un cop obtingut el cromatograma d'aquestes mostres, es comparen les àrees dels pics corresponents a les concentracions conegudes de meso-2,3-butanodiol i (2S, 3S)-2,3-butanodiol (0.1 mM ambdues) (Figura 39, panell B), i els pics de les corresponents a l'altre meitat de la mescla (Figura 39, panell A). Es va estimar una puresa estereoisomèrica de (2R, 3R) -2,3-butanodiol més gran que 99,6%

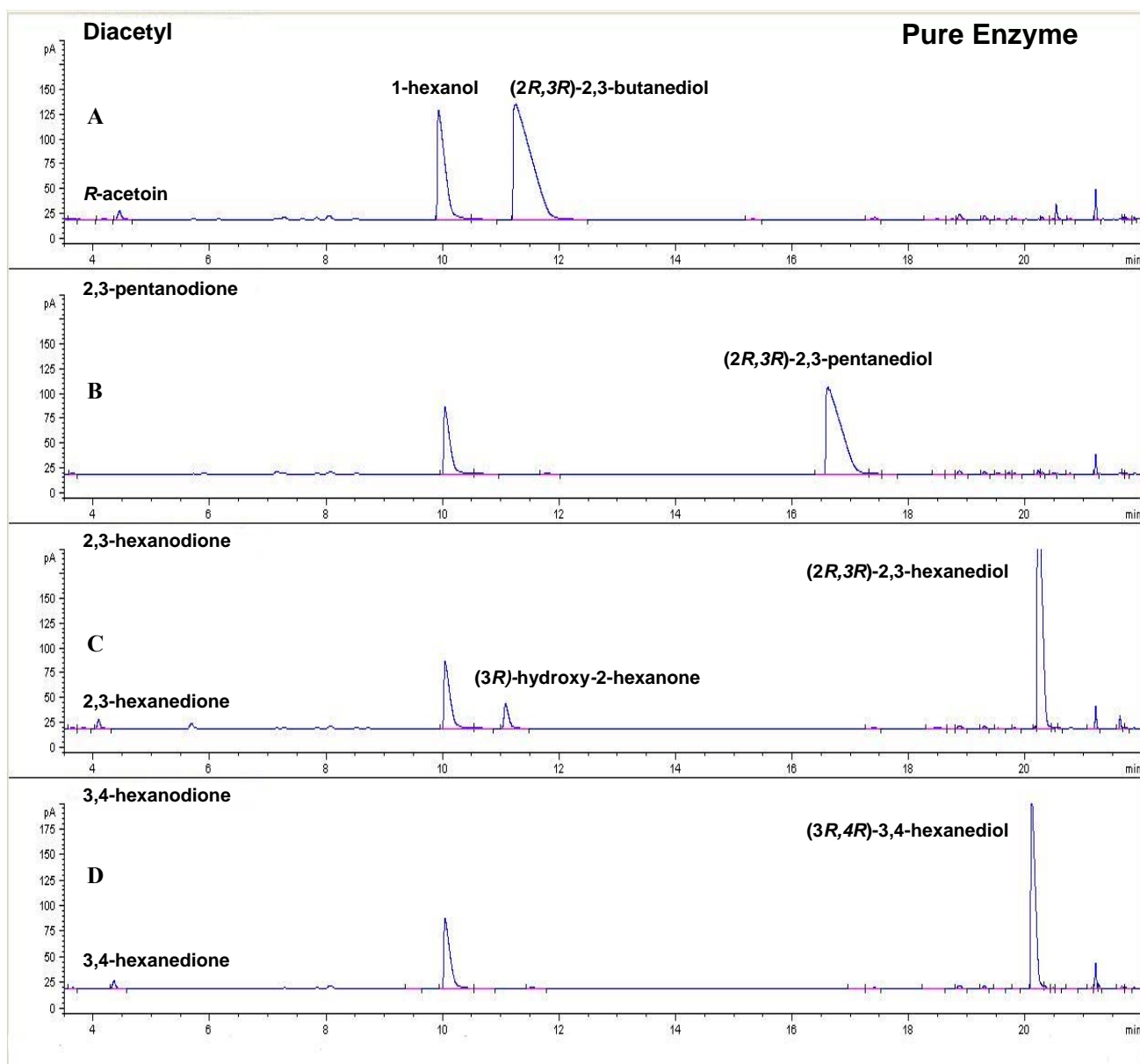


Figura 38. Cromatogrames de Bdh1p. S'hi mostren els pics dels productes que s'obtenen quan s'utilitza Bdh1p per reduir: diacetil, 2,3-pentanediona, 2,3-hexanediona i 3,4-hexanediona. El pic que apareix en tots els cromatogrames correspon al 1-hexanol, que és el marcador intern.

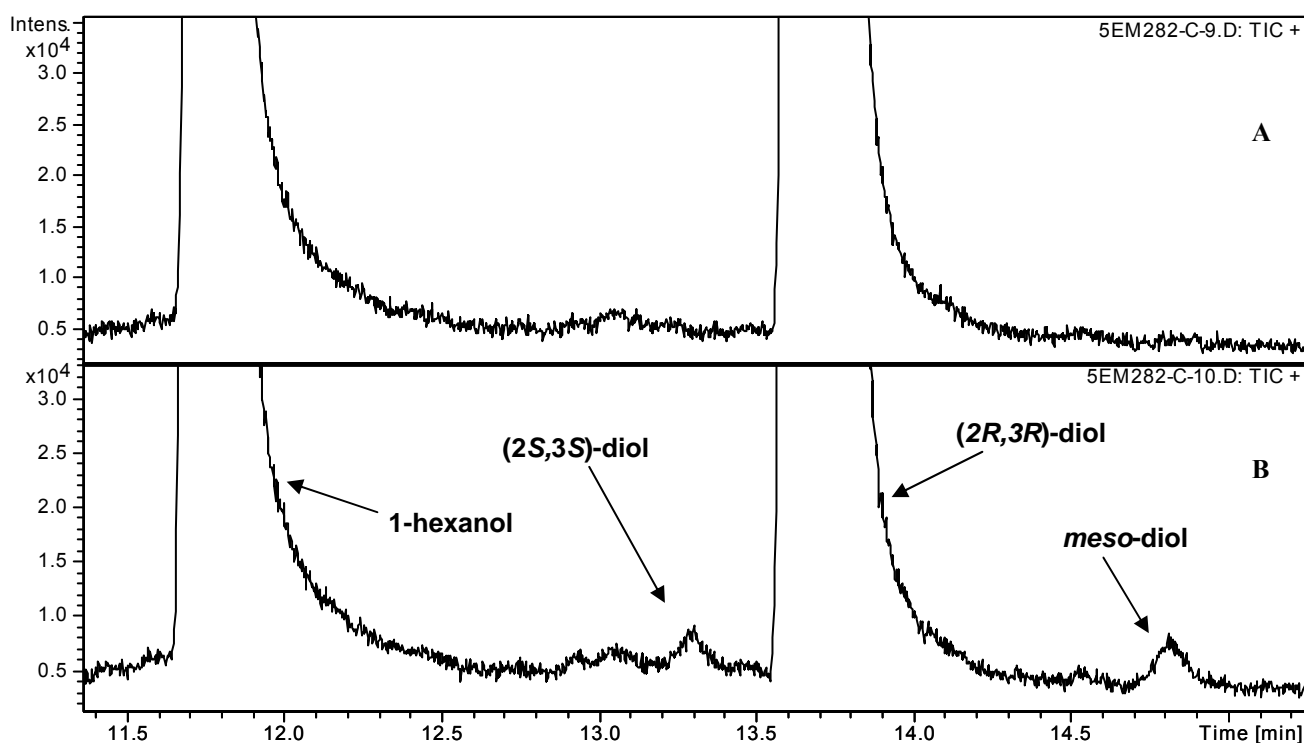


Figura 39. Determinació de la puresa de l'estereoisòmer (2R,3R)-2,3-butanodiol. En el panell A s'hi observa el cromatograma de la meitat de la mescla que no porta *meso*-2,3-butanodiol i (2S, 3S)-2,3-butanodiol a concentracions conegudes. En el panell B s'hi observen els pics de *meso*-2,3-butanodiol i (2S, 3S)-2,3-butanodiol.

Quan es fa la mateixa reacció però utilitzant 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona i 3,4-hexanodiona com a substrats enlloc de diacetil, només s'obté un diol (Fig 38, panells B, C i D). Aquests diols únics són identificats pel espectròmetre de masses com a 2,3-pentanodiol, 2,3-hexanodiol i 3,4-hexanodiol respectivament. Com que els diferents estereoisòmers d'aquests diols no es poden obtenir comercialment, no es tenen estàndards d'aquests i per tant no es pot concloure amb certesa absoluta quins estereoisòmers són. Malgrat tot, i tenint en compte la estereoselectivitat que mostra Bdh1p front diacetil, és fàcilment assumible que es tracta dels estereoisòmers (*R,R*); és a dir, es tracta de (2*R*,3*R*)-2,3-pentanodiol, (2*R*,3*R*)-2,3-hexanodiol i (3*R*,4*R*)-3,4-hexanodiol. També es va detectar un petit pic que correspon a 3-hidroxi-2-hexanona en la reducció de 2,3-hexanodiona (Figura 35).

Recerca d'altres diacetil reductases dependents de NADH.

L'enzim Bdh1p, com s'ha vist, té la capacitat de reduir tant el diacetil com l'acetoïna, obtenint en última instància 2,3-butanodiol. Anteriorment, (Gonzalez et al. 2000), ja s'ha visualitzat almenys una proteïna amb capacitat diacetil reductasa depenent de NADH. Partint d'un extracte de llevat d'una soca amb la Bdh1p delecionada anomenada EG2 (FY834α *TRP1::bdh1*), crescuda en YPG (amb galactosa), es va trobar una activitat diacetil reductasa de 0.73 U/mg (mesurada a una concentració de diacetil de 50 mM i una concentració de NADH de 0.2 mM). A priori aquesta activitat no pot ser deguda a Bdh1p, ja que *BDH1* està truncat en aquesta soca EG2.

Si prenem un extracte d'aquesta soca i la carreguem en un gel d'isoelectroenfoc, per visualitzar l'activitat en el propi gel incubat amb diacetil i NADH, s'observa una banda clara amb un punt isoelèctric inferior al pI de la Bdh1p. Aquesta banda ens indica que hi ha almenys un altre enzim capaç de reduir el diacetil en presència de NADH.

Es va desenvolupar un protocol per dur a terme la purificació d'aquesta diacetil reductasa partint de la soca EG2. El protocol consisteix en tres passos de purificació mitjançant cromatografia: DEAE-Sepharose, seguida de hidroxipatit, i finalment Cibachron Blue 3GA, com s'ha vist. La proteïna purificada obtinguda, va ser digerida amb tripsina i analitzada per MALDI-TOF MS i va ser reconeguda com a Adh2p. Aquesta proteïna tenia una Mr d'aproximadament 42000.

Quan s'analitza per GC-MS el producte obtingut en una mescla amb Adh2p, NADH, diacetil i el sistema regenerador de NADH, s'observa en el cromatograma un pic que és reconegut com a *S*-acetoïna (Figura 40).

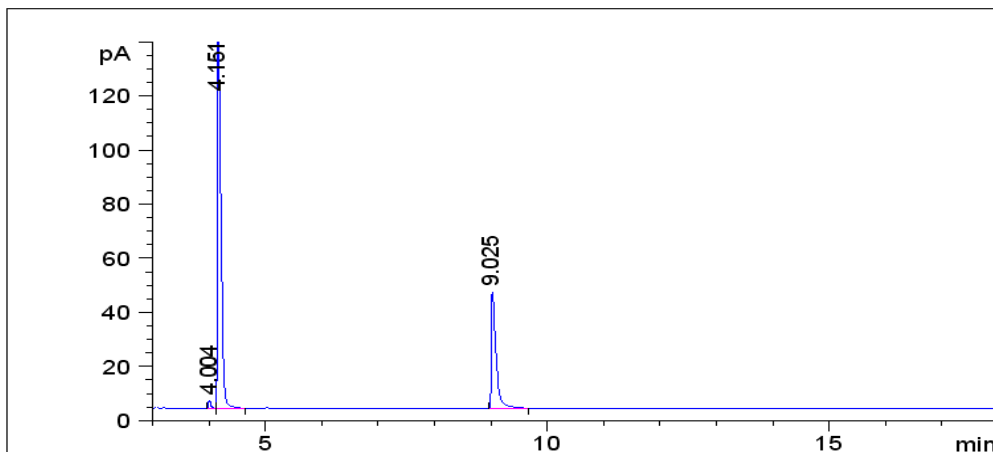


Figura 40. Cromatograma de Adh2p. Cromatograma obtingut de la reducció de diacetil per part de Adh2p. El pic a 9,025 min correspon a 1-hexanol, que és el marcador intern. El pic gran a 4,151 min correspon a *S*-acetoïna.

Tenint en compte la similitud de Adh1p i Adh3p amb Adh2p, es van clonar i sobreexpressar Adh1p i Adh3p en la soca WV36-405 (*adh1*Δ, *adh2* Δ, *adh3* Δ) per tal de comprovar si tenien activitat diacetil reductasa i, si mostraven la mateixa estereoselectivitat de Adh2p. També es va obtenir, amb ambdues proteïnes, *S*-acetoïna.

Es va decidir, doncs, emprar aquesta soca Adh⁻ (WV36-405), quan es treballa amb els extractes o les cèl·lules permeabilitzades que tenen sobreexpressades les activitats bdh i fdh, per evitar la formació del *meso*-2,3-butanodiol que seria el producte que es formaria en actuar Bdh1p sobre *S*-acetoïna.

Construcció d'una soca de llevat que sobreexpressa Bdh1p i Fdh1p.

En les reduccions de les dicetones veïnes d'estudi, l'enzim Bdh1p pur obté els diols corresponents enantiopurs. Per desplaçar la reacció fins al diol, però, li cal un sistema regenerador de NADH. Com s'ha vist, el sistema regenerador utilitzat en aquest cas és el mediat per l'enzim Fdh1p, que transforma el formiat en CO₂, amb consum de NAD i consegüent obtenció de

NADH. Aquesta constatació ens comporta la voluntat de crear una soca de llevat que sobreexpressi ambdós enzims, Bdh1p i Fdh1p, per tal de poder obtenir diols enantiopurs sense necessitat d'haver de purificar el primer i aportar-li l'activitat del segon de forma externa..

La construcció d'aquesta soca es va fer mitjançant una modificació de la tècnica del “delito perfetto” (Storici et al. 2001) desenvolupada en el nostre laboratori. Es va canviar el promotor del gen *BDHI* en el cromosoma pel promotor *GALI*, que és un promotor fort activable en presència de galactosa al medi. L'activitat Fdh1p se li va donar a través del plasmidi multicòpia pYES2 amb el gen *FDHI* clonat, subordinat també al control del promotor *GALI* del plasmidi, resultant així una nova soca de llevat (DP-BDH1 (WV36-405 P_{GALI} -*BDHI* [pYES2-*FDHI*]) que sobreexpressa ambdues activitats.

Per corroborar la sobreexpressió dels dos gens *BDHI* i *FDHI*, es van fer assajos de les activitats Bdh i Fdh en aquesta nova soca DP-BDH1. Amb aquesta finalitat es va fer créixer la soca DP-BDH1 i la soca parental (WV36-405 *BDHI* [pYES2]) com a control, en un medi amb galactosa (els dos gens estan sotmesos al promotor *GALI*). Es van obtenir els dos extractes per als assajos mitjançant trencament amb boletes de vidre de les cèl·lules crescudes fins a la fase logarítmica. Els resultats obtinguts al determinar les activitats Bdh i Fdh específiques per a la soca WV36-405 *BDHI* [pYES2]) van ser 0.26 i menys de 0.001 U/mg, respectivament, mentre que els valors corresponents per la soca DP-BDH1 van ser 1.22 i 0.13 U/mg, respectivament (les mescles d'activitat tenien NAD⁺ a 5 mM i (2R,3R)-butanodiol a 100 mM i formiat a 100 mM, respectivament). Aquests resultats demostren la sobreexpressió dels gens.

Un cop verificada la sobreexpressió d'ambdues activitats, el següent pas rau en l'observació dels productes formats en les reaccions que s'estan estudiant. Quan es fan les mescles, abans esmentades, amb extractes de cèl·lules de llevat provinents de la soca DP-BDH1, prèviament crescudes en medi amb presència de

galactosa, els productes que s'obtenen amb el diacetil com a substrat són (2*R*, 3*R*)-2,3-butanodiol i *meso*-2,3-butanodiol (Figura 41, panell A). Si es fa la mateixa mescla amb cèl·lules permeabilitzades (amb digitonina) de la mateixa soca, els productes obtinguts són (2*R*, 3*R*)-2,3-butanodiol, *meso*-2,3-butanodiol i (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol (Figura 42, panell A).

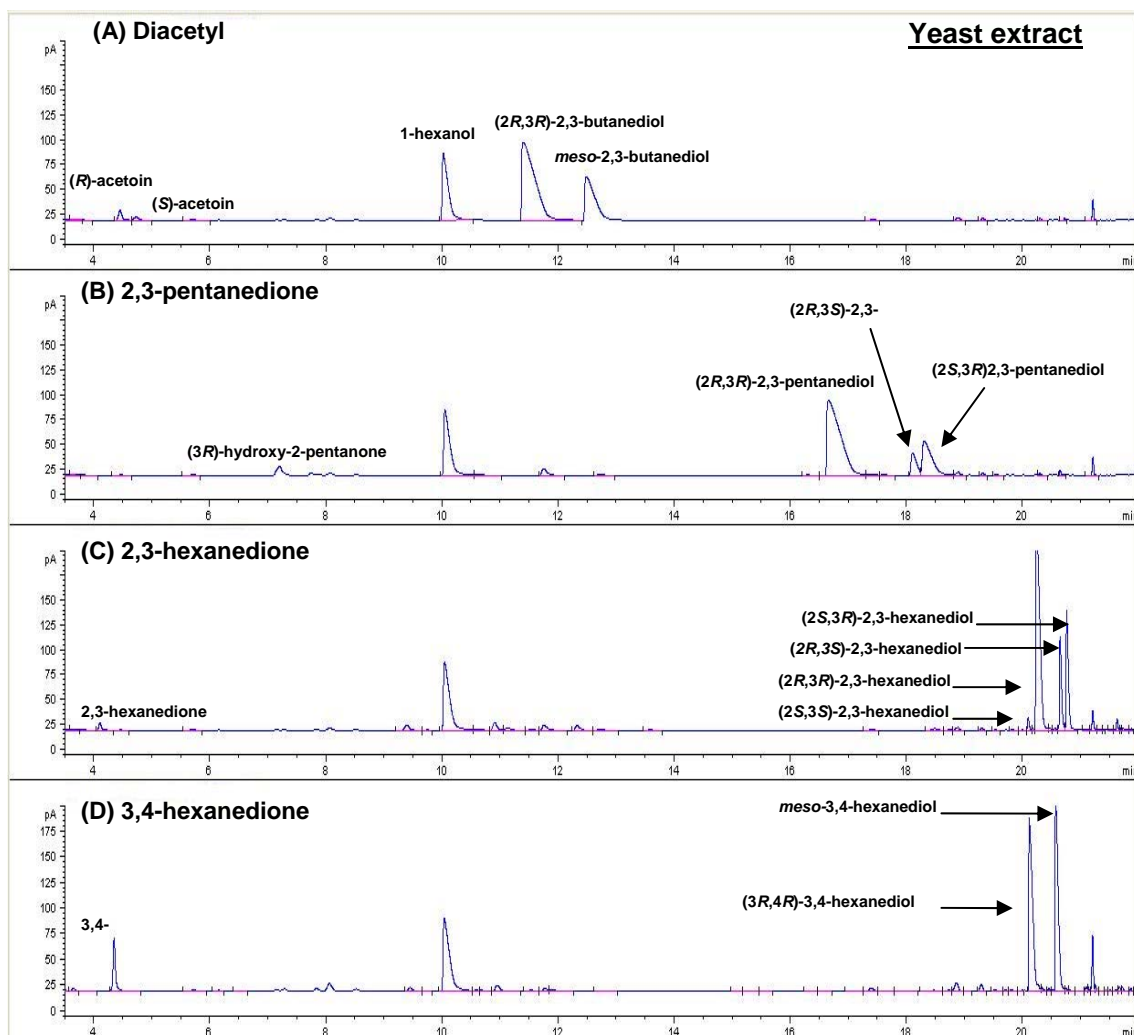


Figura 41. Cromatogrames dels extractes de la soca DP-BDH1. S'hi mostren els pics dels productes que s'obtenen quan s'utilitzen extractes de la soca DP-BDH1 per reduir: A) diacetil, B) 2,3-pentanodiona, C) 2,3-hexanodiona i D) 3,4-hexanodiona. El pic que apareix en tots els cromatogrames correspon al 1-hexanol, que és el marcador intern.

Quan es prenen les altres dicetones veïnes utilitzades, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona i 3,4-hexanodiona, i es fan els mateixos assajos de formació de productes amb els extractes i les cèl·lules permeabilitzades, s'obtenen diversos estereoisòmers de les hidroxiketones i dels diols. Així, s'observa que en la

reacció amb 2,3-hexanodiona tan els extractes com les cèl·lules permeabilitzades de la soca DP-BDH1 (Figures 41 i 42, panells C), s'obtenen els 4 estereoisòmers del 2,3-hexanodiol (coneguts pel seu espectre de masses). En canvi en les reaccions amb 2,3-pentanodiona o 3,4-hexanodiona no es detecten els possibles (*S,S*)-diols.

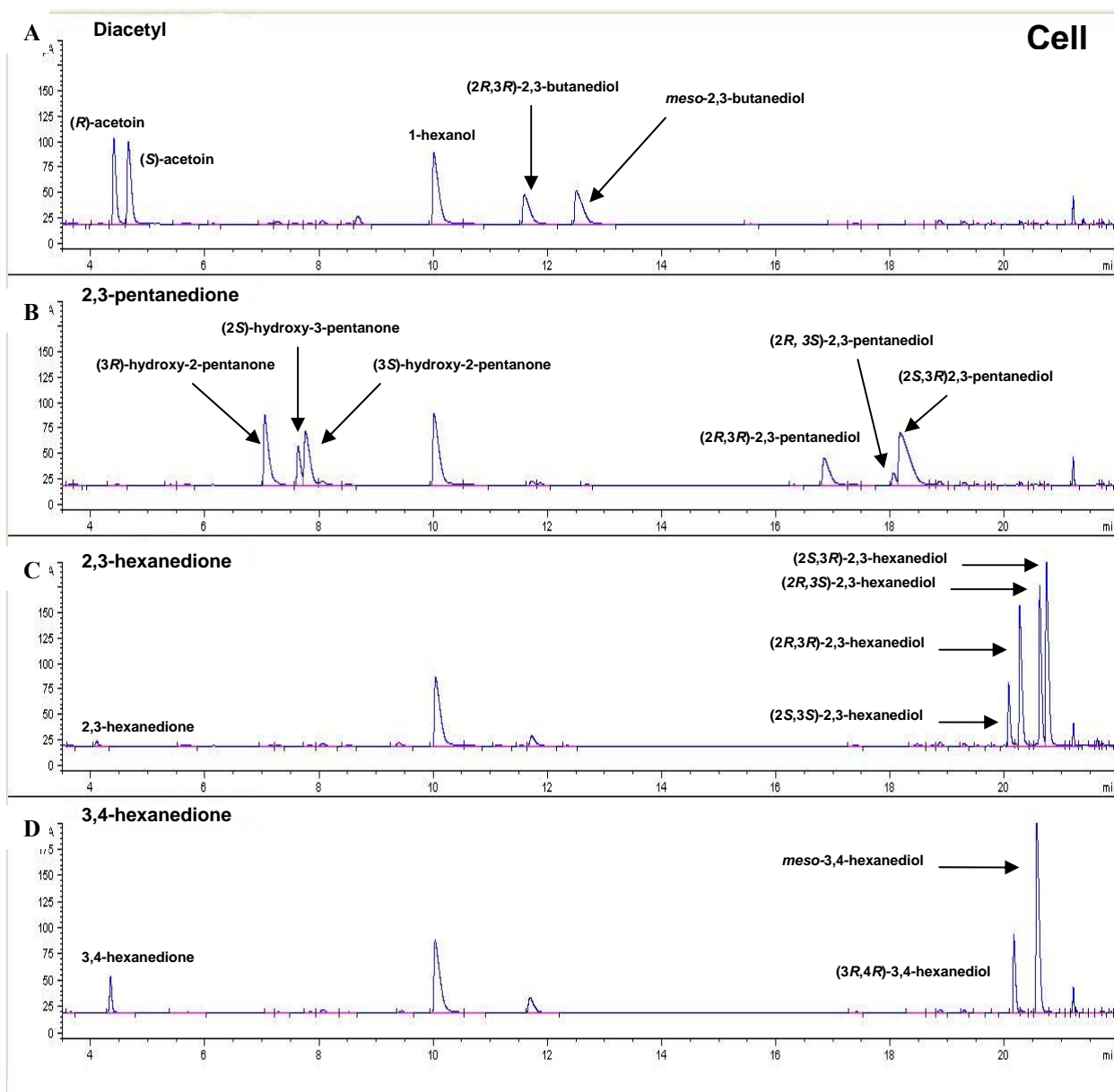


Figura 42. Cromatogrames de les cèl·lules permeabilitzades de la soca DP-BDH1. S'hi mostren els pics dels productes que s'obtenen quan s'utilitzen cèl·lules permeabilitzades de la soca DP-BDH1 per reduir: A) diacetil, B) 2,3-pentanodiona, C) 2,3-hexanodiona i D) 3,4-hexanodiona. El pic que apareix en tots els cromatogrames correspon al 1-hexanol, que és el marcador intern.

La assignació dels pics obtinguts per cromatografia de gasos a les corresponents formes estereoisomèriques del 2,3-butanodiol, es va fer per comparació amb els temps de retenció dels estereoisòmers del 2,3-butanodiol purs obtinguts comercialment. En el cas de les acetoïnes es van identificar gràcies a la reacció d'oxidació del (2*R*, 3*R*)-2,3-butanodiol pur, amb Bdh1p pura, que dona *R*-acetoïna (Gonzalez et al. 2000).

Pel que fa als diversos estereoisòmers de la 2,3-pentanodiona (Figures 41 i 42, panells B), els pics eluïts a t_r de 7.06 i 7.77 minuts (m/z de 59, 43 i 41, en % d'abundància decreixent) són identificats pel seu espectre de masses com a 3-hidroxi-2-pentanona, mentre que el pic eluït a 7.64 minuts (m/z de 45, 57 i 43, en % d'abundància decreixent) és identificat com a 2-hidroxi-3-pentanona (Höckelmann & Jüttner 2005). Tot i que el cromatògraf de gasos és capaç de separar els diferents estereoisòmers, amb l'espectre de masses no es pot dilucidar-ne la configuració. Per tal de saber quins dels dos pics, amb t_r 7.06 i 7.77, és la (3*R*)-hidroxi-2-pentanona, es va fer una mescla de reacció (d'una hora) amb Bdh1p pura i 2,3-pentanodiona. El producte d'aquesta reacció ha de ser 3*R*-hidroxi-2-pentanona degut a l'estereospecificitat de Bdh1p per la configuració *R*. D'aquesta manera es va dilucidar que el pic de 7.06 minuts és 3*R*-hidroxi-2-pentanona, per concordança de t_r amb el producte obtingut per Bdh1p pura, i el pic de 7.77 minuts ha de ser 3*S*-hidroxi-2-pentanona.

Per dilucidar l'estereoisòmer reconegut com a 2-hidroxi-3-pentanona (el pic eluït a 7.64 minuts) també es va fer per comparació, ja que el t_r de 7.64 minuts coincideix amb el del producte obtingut d'una reducció de 2,3-pentanodiona amb l'enzim Ara1p pur. Com s'ha vist, aquest enzim és estereoselectiu per la configuració *S*; conseqüentment, aquesta darrera molècula és 2*S*-hidroxi-3-pentanona.

L'assignació dels diferents estereoisòmers del 2,3-pentanodiol es va fer per comparació de temps de retenció de pics obtinguts en reaccions que es

coneixien els productes, o bé per deducció, ja que no existeixen estàndards comercials d'aquests. Per a l'obtenció d'aquests pics de productes coneguts, es van observar cromatogrames obtinguts al fer diferents assajos amb els enzims Bdh1p i Ara1p, dels que coneixem la seva estereospecificitat per a les configuracions *R* i *S* respectivament. Per determinar quin pic és el (2*R*, 3*R*)-2,3-pentanediol, es comparen els t_r dels tres pics obtinguts, tant amb extractes com amb cèl·lules permeabilitzades, amb el temps obtingut en una mescla amb 2,3-pentanodiona i Bdh1p pura. Aquesta mescla produirà un sol pic, un sol producte, que és (2*R*, 3*R*)-2,3-pentanodiol i té un t_r de 16.8 minuts aproximadament.

Com s'ha vist anteriorment, la mescla amb 2,3-pentanodiona i Ara1p pura obté el producte 2(*S*)-hidroxi-3-pentanona. Si es fa una nova mescla partint d'aquest producte com a substrat, i s'incuba amb Bdh1p pura s'obté (2*S*, 3*R*)-2,3-pentanodiol, ja que Ara1p redueix el carboni 2 al corresponent (*S*)-alcohol i, per tant podem assignar el pic (2*S*, 3*R*)-2,3-pentanodiol. L'assignació del darrer pic, el més petit, situat entre (2*R*, 3*R*)-2,3-pentanodiol i (2*S*, 3*R*)-2,3-pentanodiol, es va fer tenint en compte dues premisses. En primer lloc, per comparació amb la situació dels diferents estereoisòmers dels diols provinents del diacetil, en els que la configuració (*S,S*) surt abans de la (*R,R*). En aquest cas, amb els diols de 4 carbonis, l'ordre d'elució és configuració (*S/S*), configuració (*R/R*) i finalment configuració *meso*, i això seria coherent amb l'observat en el cas dels 2,3-pentanodiols, en el que el (2*S*, 3*S*)-2,3-pentanodiol hauria de sortir abans del (2*R*, 3*R*)-2,3-pentanodiol, amb el que el pic minoritari correspondria per eliminació a (2*R*, 3*S*)-2,3-pentanodiol.

D'altra banda, cal considerar que aquests assajos es duen a terme amb la soca DP-BDH1 (WV36-405 *P_{GALI}-BDHI* [pYES2-*FDHI*], que té sobreexpressada l'activitat Bdh, i tenint en compte l'enantioselectivitat que mostra l'enzim és fàcil pensar que la majoria de centres quirals seran transformats en grups carbonil en configuració *R*. Així doncs, la conclusió és que el pic de 18.07 minuts és (2*R*, 3*S*)-2,3-pentanodiol.

Els pics provinents de les reaccions amb 2,3-hexanodiona (Figures 41 i 42, panells C), es van assignar seguint la mateixa estratègia experimental i el mateix raonament que amb la 2,3-pentanodiona. Els 4 pics eluïts entre els t_R de 20 a 24 minuts van ser assignats com a 2,3-hexanodiol pel seu espectre de masses (m/z de 55, 73, 45 i 43, en % d'abundància decreixent), típic d'aquesta molècula. Com en el cas anterior, el pic del producte obtingut en una reacció amb 2,3-hexanodiona i Bdh1p pura, permet assignar l'enantiòmer (2*R*, 3*R*)-2,3-hexanodiol al pic amb $t_R=20.3$ minuts. I el producte de la reacció de 2,3-hexanodiona i Ara1p, seguit de Bdh1p, permet assignar quin pic correspon a (2*S*, 3*R*)-2,3-hexanodiol. Altre cop es suposa que el primer enantiòmer eluït és el (2*S*, 3*S*)-2,3-hexanodiol, i per tant el que resta és el (2*R*, 3*S*)-2,3-hexanodiol.

En el cas de les reaccions de reducció de la 3,4-hexanodiona (Figures 41 i 42, panells D), l'assignació es va dur a terme com en el cas del diacetil. El producte de la reacció de 3,4-hexanodiona amb Bdh1p pura ens permet saber quin pic és el (3*R*, 4*R*)-3,4-hexanodiol. Seguint el raonament emprat anteriorment, l'altre pic que s'observa és el *meso*-3,4-hexanodiol, perquè l'enantiòmer amb configuració (*S/S*) sortiria en primer lloc.

Propietats de la proteïna de fusió Fdh1-Bdh1(His)₆p

La proteïna de fusió Fdh1-Bdh1(His)₆p va ser purificada de la soca de llevat WV36-405 *ara1Δbdh1Δ*[pYES2-FDH1-BDHI-6His], a través d'una columna cromatogràfica de Ni²⁺-Sephrose, seguida d'una gel-filtració en una columna Hi Load SuperDex 200. Amb aquest darrer pas de cromatografia i emprant proteïnes estàndard de Mr, es va obtenir la seva Mr.

Aquesta Mr. és d'aproximadament 133,000 per a Fdh1-Bdh1(His)₆p, i d'aproximadament 70,500 per Bdh1(His)₆p (Figura 43). Tenint en compte les Mr de Fdh1p (Mr=41,700) i Bdh1p (Mr=41,500), la proteïna de fusió és un dímer.

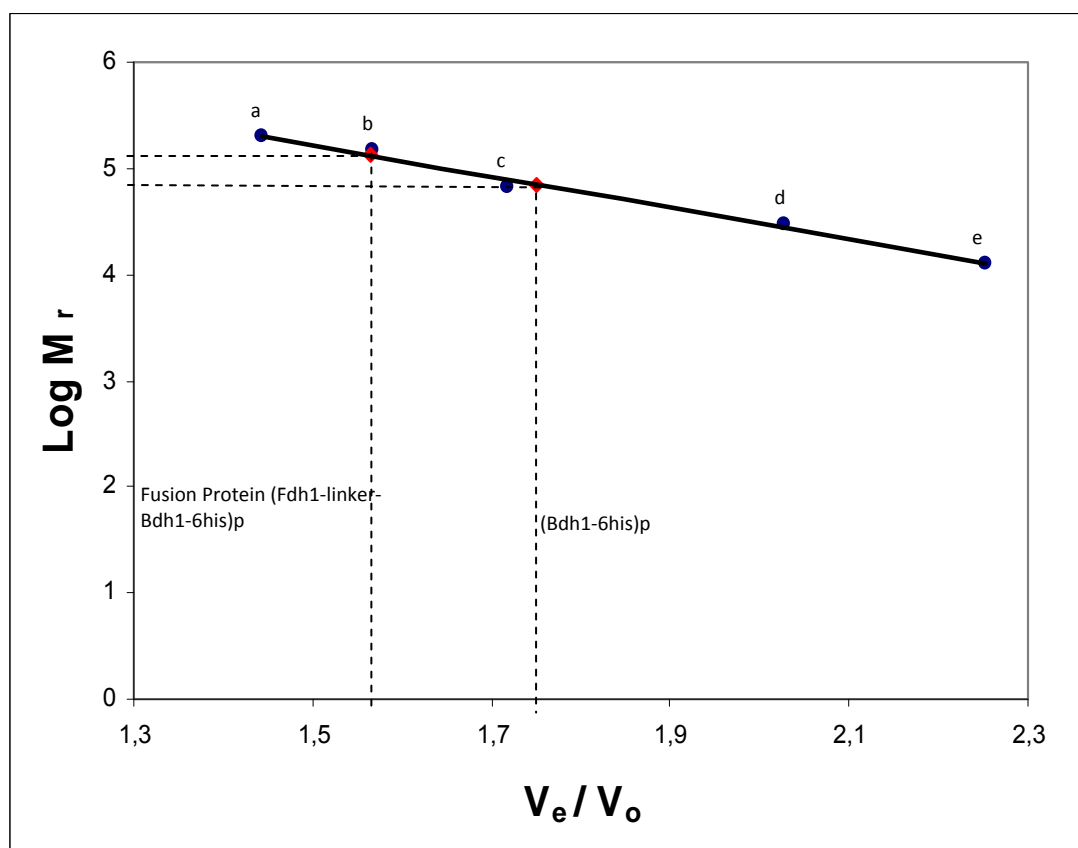


Figura 43. Recta per a la determinació dels pesos moleculars de Bdh1(His)₆p i Fdh1-Bdh1(His)₆p.
a: β -amilasa ($M_r=200,000$); b: alcohol deshidrogenasa de llevat ($M_r=150,000$); c: albúmina de sèrum boví ($M_r=66,000$); d: anhidrasa carbònica ($M_r=29,000$) i citocrom C ($M_r=12,400$). Interpolant a la recta s'obtenen les M_r de Fdh1-Bdh1(His)₆p (133,000) i de Bdh1(His)₆p (70,500).

La proteïna de fusió sembla ser inestable, pel que es pot observar en el *Western blot* revelat amb anticòs anti-His (Figura 44). En el carril 2 (Fdh1-Bdh1(His)₆p) d'aquesta figura, s'observen varies bandes que correspondrien a la proteïna de fusió i sota d'aquesta hi ha tot un seguit de bandes de M_r inferior, que correspondrien a productes de degradació de la proteïna. Sota les mateixes condicions, Bdh1(His)₆p es mostra estable com es veu als carrils 3 i 4 de la figura 41, on s'hi aprecia una sola banda de M_r correcte (propera a 50,000 degut a la cua de 6 histidines)

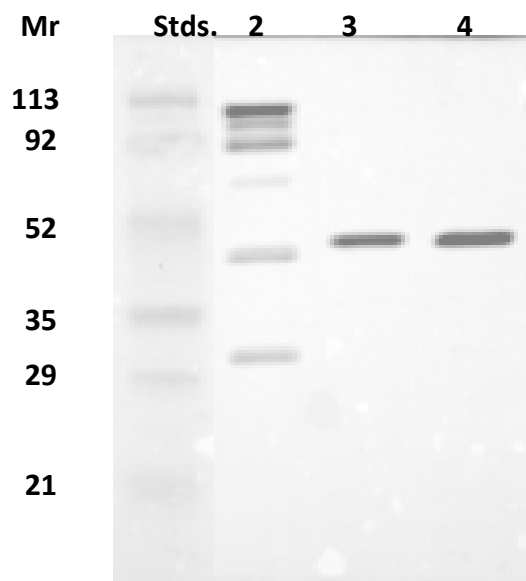
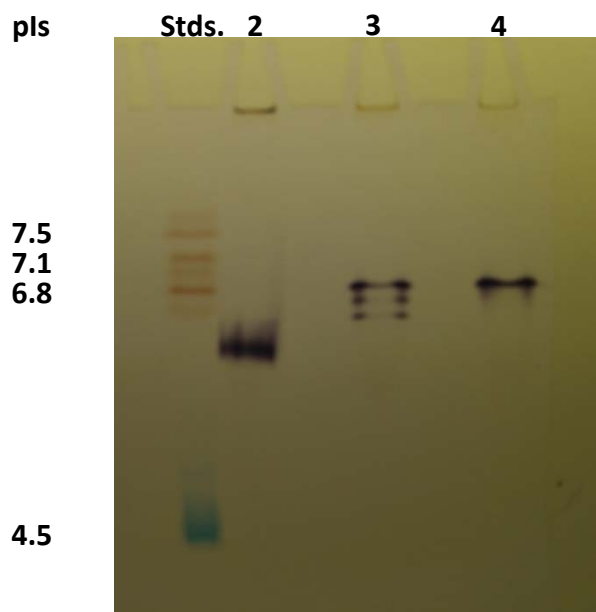


Figura 44. Western-Blot realitzat amb Fdh1-Bdh1(His)₆p i Bdh1(His)₆p. En el carril 1 hi ha els estàndards (amb els pesos corresponents posats al cantó). En el carril 2 hi ha Fdh1-Bdh1(His)₆p, i s'hi poden observar les diferents bandes de Mr. inferior, que correspondrien a degradació de la proteïna. En els carrils 3 i 4 hi ha Bdh1(His)₆p (dos *backgrounds* genètics diferents utilitzats: un amb Bdh1p endògena, i l'altre sense).

També es va realitzar un zimograma amb la proteïna de fusió (Figura 45). Suposadament, la presència de Fdh1p en la proteïna de fusió hauria de modificar el punt isoelèctric de Bdh1p (6,9) reportat anteriorment (Gonzalez et al. 2000).

Figura 45. IEF realitzat amb Fdh1-Bdh1(His)₆p i Bdh1(His)₆p. En el carril 1 hi ha els estàndards (amb els punts isoelèctrics corresponents posats al cantó). En el carril 2 hi ha Fdh1-Bdh1(His)₆p, i en els carrils 3 i 4 hi ha Bdh1(His)₆p (dos *backgrounds* genètics diferents utilitzats: un amb Bdh1p endògena, i l'altre sense). El pI de Fdh1-Bdh1(His)₆p és inferior al de Bdh1(His)₆p.



En el gel IEF també es van carregar dos extractes que sobreexpressaven Bdh1(His)₆p (carril 3 i 4), en dos soques amb diferent fons genètic: la del carril 3 era *BDHI*, mentre que la del carril 4 era *BDHIΔ*. En el gel IEF es veu que el pI de la Fdh1-Bdh1(His)₆p és inferior al de Bdh1p i Bdh1(His)₆p. Les bandes

d'activitat mostrades en el gel, confirmen que el pI de Bdh1(His)₆p és superior en els dos *backgrounds* genètics diferents utilitzats: un amb Bdh1p endògena, i l'altre sense.

Es van estudiar els paràmetres cinètics de Fdh1-Bdh1(His)₆p front (*R/S*)-acetoina: la K_M és de 2.2 mM (determinada a una concentració de NADH de 0.2 mM), i la k_{cat} de 2115.6 min⁻¹. Així, la k_{cat} de la proteïna de fusió és aproximadament 35 vegades inferior que la de Bdh1p, mentre que la K_M és pràcticament la mateixa (difereixen en un factor de dos).

Per a la determinació de les activitats formiat deshidrogenasa i butanodiol deshidrogenasa d'un extracte de llevat WV36-405 *ara1Δbdh1Δ*[pYES2-*FDHI-BDHI-6His*], es van utilitzar les concentracions següents: (2*R*, 3*R*)-2,3-butanodiol o formiat a 100 mM i NAD⁺ a 5 mM, amb 0.22 U/mg de butanodiol deshidrogenasa i 0.006 U/mg de formiat deshidrogenasa respectivament. En aquests assajos amb extracte, la *ratio* entre les dues activitats és aproximadament de 36. En canvi, quan es treballa amb l'enzim purificat (Fdh1-Bdh1(His)₆p), la *ratio* entre les dues activitats és molt major, aproximadament de 140. Dues de les possibles causes d'això poden ser el fet d'una activitat FDH addicional, donada per la *FDHI* endògena present en l'extracte; i la inestabilitat de la proteïna de fusió purificada (ja s'han comentat les bandes de Mr. inferior al de la PF que apareixen en el carril del gel de SDS-PAGE).

Finalment, els assajos de formació de productes a partir de les dicetones veïnals es van dur a terme amb la proteïna de fusió Fdh1-Bdh1(His)₆p purificada. En la reducció de diacetil (Figura 46, panell A), forma un sol producte, que és l'esperat (2*R*, 3*R*)-2,3-butanediol, ja que la proteïna ha de tenir la mateixa estereoespecificitat que Bdh1p. De la mateixa manera, s'observa un sol estereoisomer del diol en les reduccions de les altres dicetones 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona i 3,4-hexanodiona (Figura 46, panells B, C, D). Tots aquests

diols tenen el mateix temps de retenció que els seus corresponents obtinguts mitjançant Bdh1p pura, per tant són assignats com les formes en configuració (2*R*, 3*R*) dels diols. En els casos del diacetil, de la 2,3-pentanodiona i la 2,3-hexanodiona, s'hi observa, en els cromatogrames, també formació d'hidroxicetones. En la reducció del diacetil es forma també *R*-acetoïna; i en les reduccions 2,3-pentanodiona i 2,3-hexanodiona, es forma una hidroxicetona en cada cas, identificades pel seu espectre de masses com a 3-hidroxi-2-pentanona i 3-hidroxi-2-hexanona, respectivament. Ambdues van ser assignades com a l'estereoisomer en configuració *R*, per seguir amb la coherència de la estereoselectivitat mostrada amb diacetil.

Oxidació de diols veïns.

Les reaccions d'oxidació es van dur a terme de la mateixa manera que les de reducció, canviant el substrat (de diones a diols) i el sistema regenerador de NAD⁺ (consistent en α -cetoglutarat, clorur amònic i glutamat deshidrogenasa (GDH)), anteriorment explicat.

En primer lloc, es va estudiar l'oxidació del (2*R*, 3*R*)-2,3-butanodiol amb Bdh1p pura i en presència de NAD⁺. El producte obtingut d'aquesta reacció va ser *R*-acetoïna, com era d'esperar. A continuació, es van separar els productes de reacció obtinguts de les reduccions de 2,3-pentanodiona i 2,3-hexanodiona amb Bdh1p pura, que són presumptament (2*R*, 3*R*)-2,3-pentanodiol, (2*R*, 3*R*)-2,3-hexanodiol. Es van utilitzar com a substrats de les reaccions d'oxidació amb Bdh1p pura, NAD⁺ i el sistema regenerador de NAD⁺.

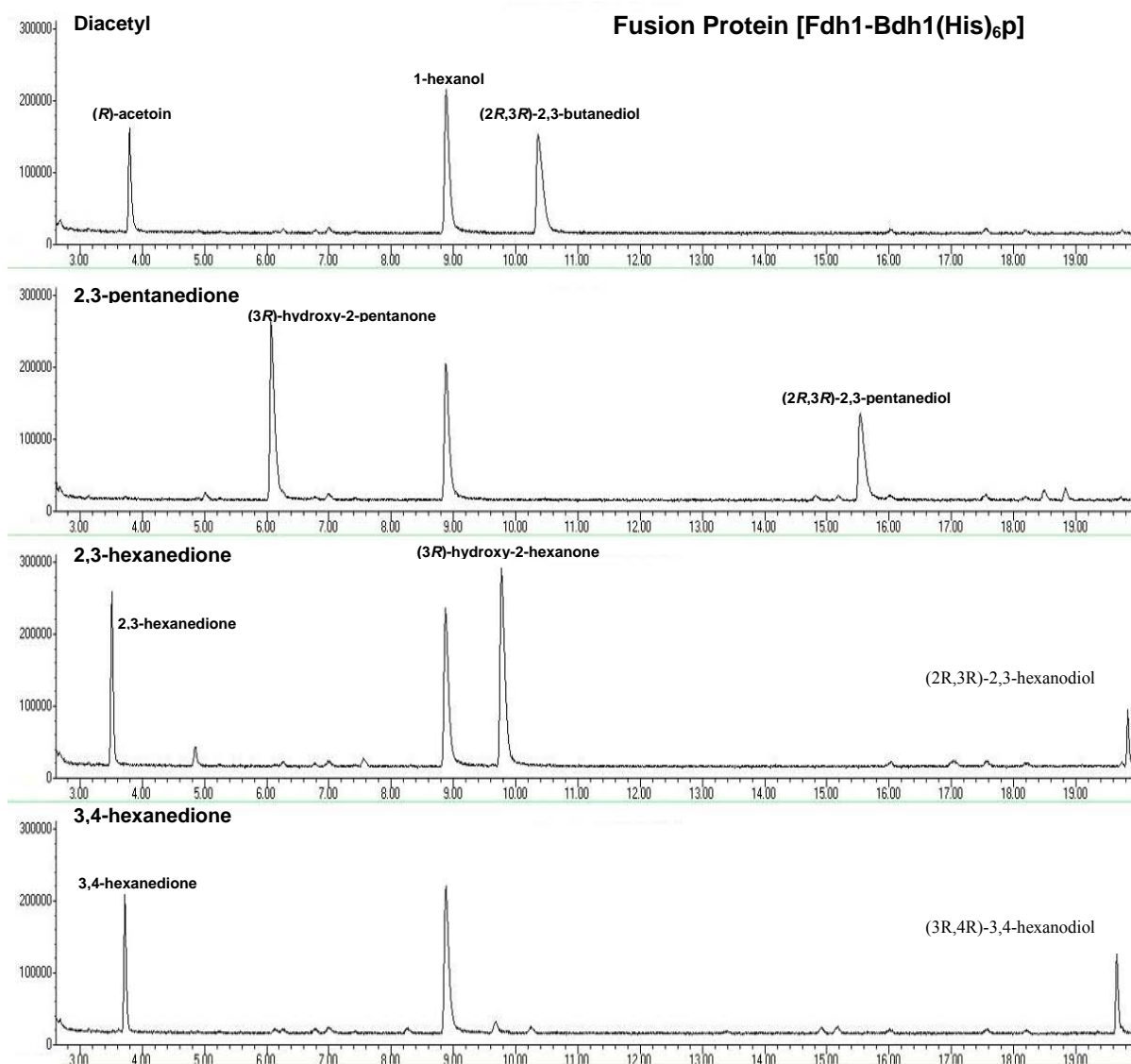


Figura 46. Cromatogrames de la proteïna de fusió. S'hi mostren els pics dels productes que s'obtenen quan s'utilitza Fdh1-Bdh1(His)₆p per reduir: A) diacetil, B) 2,3-pentanoïona, C) 2,3-hexanoïona i D) 3,4-hexanoïona. El pic que apareix en tots els cromatogrames correspon al 1-hexanol, que és el marcador intern.

Quan es fa la reacció amb (2R, 3R)-2,3-pentanoïol, NAD⁺ i l'enzim Bdh1p pur, al cromatograma obtingut de la separació amb la columna quiral acoblada al CG s'hi observa un sol pic (Figura 47). Aquest pic, però, mostra dos patrons de MS diferents. Un dels patrons, una part del pic, és compatible la R-3-hidroxi-2-pentanona, mentre que l'altre correspon a la R-2-hidroxi-3-pentanona. Per tal de separar els dos isòmers, es va carregar l'extracte de cloroform provinent de la mescla en una columna HP-5MS. En el cromatograma obtingut

s'hi observen els dos pics, corresponents a la *R*-3-hidroxi-2-pentanona i a la *R*-2-hidroxi-3-pentanona.

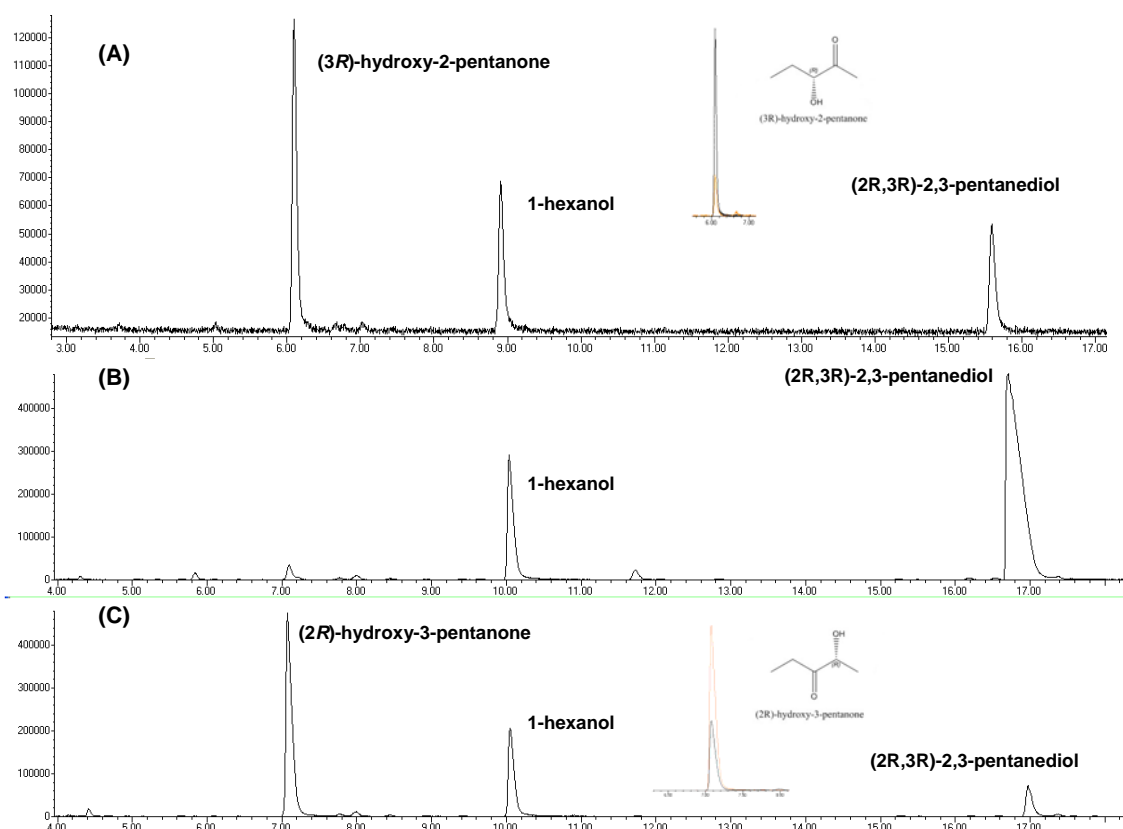


Figura 47. Cromatogrames obtinguts pel 2,3-pentandiol. S'hi mostren els pics obtinguts en reaccions amb Bdh1p. A) Reducció de la 2,3-pentanonidona. S'observa la formació de *R*-3-hidroxi-3-pentanona, i una petita formació de (2*R*, 3*R*)-2,3-pentandiol. B) Reducció quasi total de la *R*-3-hidroxi-3-pentanona. S'aconsegueix afegint Bdh1p a la mescla utilitzada per la reducció (A), i deixant-ho incubar més temps, per poder dur a terme la reacció d'oxidació del diol. C) Oxidació del diol. S'obté *R*-2-hidroxi-3-pentanona. Aquestes dues hidroxicetones surten en temps molt semblants, de tal manera que l'espectre de masses dona uns patrons d'abundància relativa dels ions específics que és una mescla dels dos. Es mostren els dos patrons el de *R*-3-hidroxi-3-pentanona en el panell A, i el de *R*-2-hidroxi-3-pentanona en el panell C (m/z de 59 en negre, i de 45 en vermell).

També es van analitzar els productes obtinguts de la reducció de 2,3-pentanonidona amb Bdh1p amb aquesta columna HP-5MS. En el cromatograma s'hi observen també els dos mateixos productes, però en aquest cas el majoritari és *R*-3-hidroxi-2-pentanona, mentre que el pic menor correspon a la *R*-2-hidroxi-3-pentanona.

Es va fer el mateix estudi amb (2*R*, 3*R*)-2,3-hexanodiol, i s'observa un comportament de l'enzim similar. En aquest cas, la columna quiral va ser capaç de separar els dos productes (Figura 48).

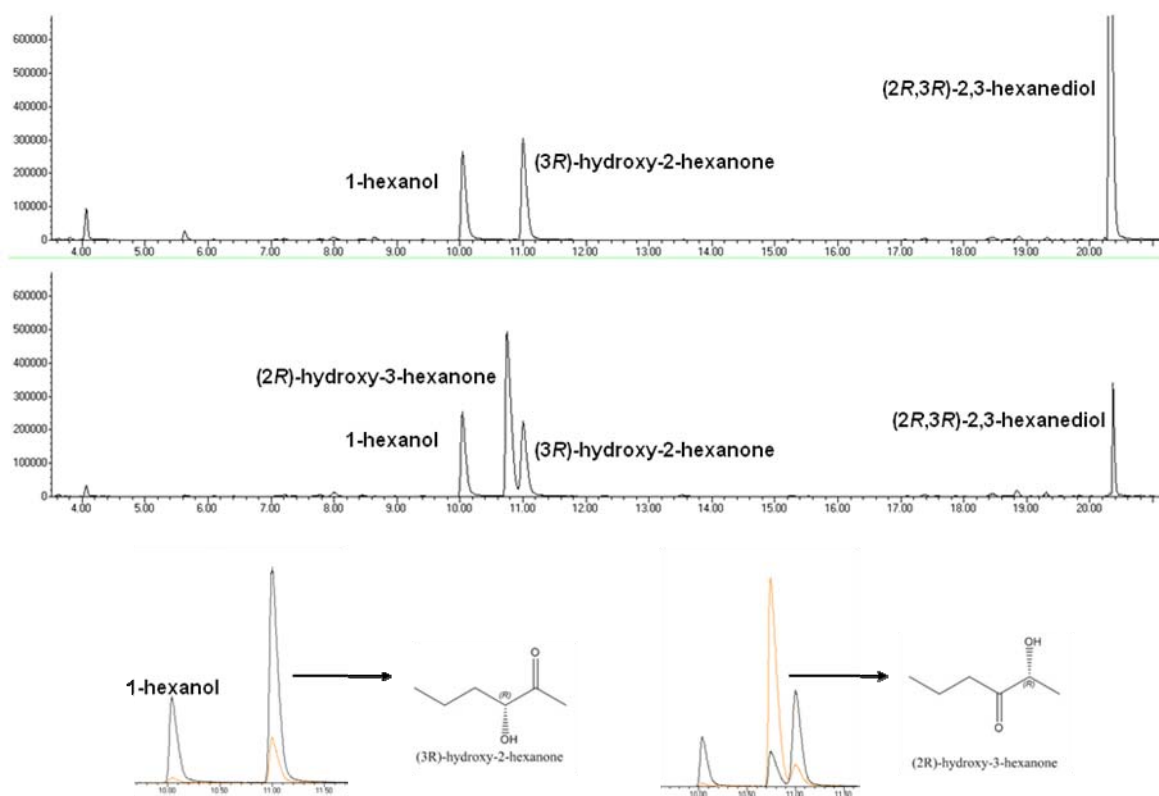


Figura 48. Cromatogrames obtinguts pel 2,3-hexanodiol. S'hi mostren els pics obtinguts en reaccions amb Bdh1p. A) Reducció de la 2,3-hexanodiona. S'observa la formació de *R*-3-hidroxi-2-hexanona i de (2*R*, 3*R*)-2,3-hexanodiol, per poder dur a terme la reacció d'oxidació del diol. B) Oxidació del diol. S'obté *R*-2-hidroxi-3-hexanona i, en menor quantitat, *R*-3-hidroxi-2-hexanona. En aquest cas, la columna quiral de ciclodextrines és capaç de separar-los clarament. A baix, es mostren els dos patrons d'abundància relativa dels ions específics dels dos isòmers (m/z de 55 en negre, i de 45 en vermell).

Tenint en compte totes aquestes dades obtingudes de l'oxidació de diols veïns amb Bdh1p pura, sembla ser que el carboni més reactiu, tant en l'oxidació (diol) com en la reducció (dicetona), és el més intern (marcat en vermell i blau a la figura 49).

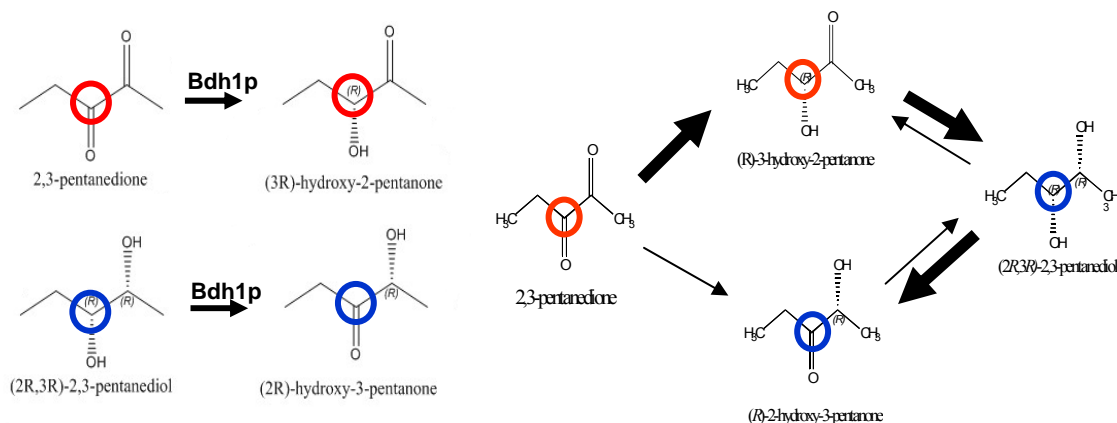


Figura 49. Esquema de les reaccions de reducció i d'oxidació. S'hi observen la reducció de la 2,3-pentanediona i l'oxidació del 2R, 3R)-2,3-pentanodiol dutes a terme per Bdh1p. Es marca el carboni reactiu, que és el més intern, en vermell per a la reducció i en blau per a l'oxidació.

A més, per tal de resoldre totes les formes estereoisomèriques de 2-hidroxipentanona i 3-hidroxipentanona (així com les hidroxihexanones corresponents), es va induir la racemització i la isomerització a través de les espècies enolat de les hidroxicetones mitjançant l'addició de NaOH als productes obtinguts després de l'oxidació de (2R, 3R) -2,3-pentanodiol i (2R, 3R) -2,3-hexanodiol (o la reducció de les dicetones). La Figura 50 mostra que la columna quiral resultà amb èxit tots els estereoisòmers.

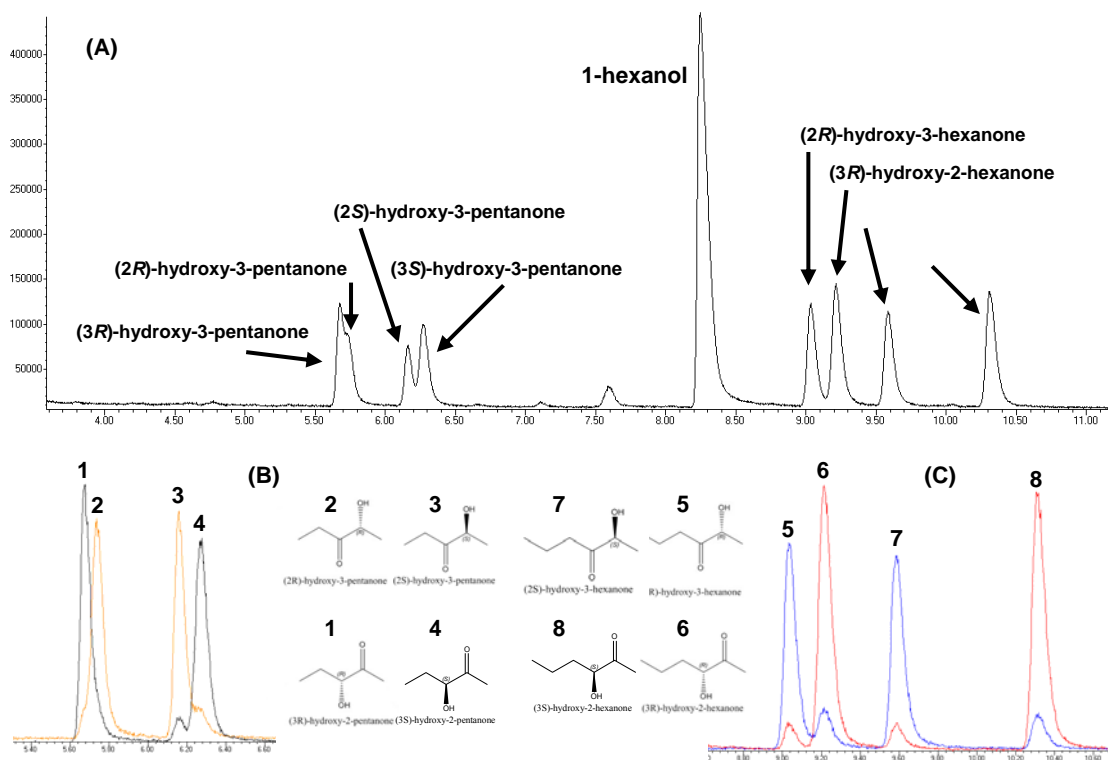


Figura 50. Separació de les 4 hidroxi-pentanones i les 4 hidroxi-hexanones obtingudes per racemització. A) S'hi observa un cromatograma en el que s'aprecia que la columna quiral és capaç de separar tots els 8 estereoisòmers. B) Les 4 hidroxi-pentanones amb els seus espectres de masses corresponents. C) Les 4 hidroxi-hexanones amb els seus espectres de masses corresponents.

Mutacions cromosomals als gens *ADH1* i *ADH3* seguint la metodologia del *delitto perfetto*.

Les soques obtingudes després de la aplicació de la metodologia del *delitto perfetto* són: (soca FY-SRS) = FY *ADH1* (D201S, G202R, G203S) que hauria de mostrar dependència de NADP(H) i (soca FY-NN) = FY *ADH1* (D201A, K206A) que no hauria de mostrar dependència ni de NAD(H) ni de (NADP(H)). Juntament amb les soques control FY *ADH1* i FY *adh1Δ* es van fer créixer en YPD Galactosa (galactosa 2%) O/N i després en YPD glucosa (glucosa 2%).

També es varen emprar les soques WV36-405 *adh1*, $\Delta adh2$, $\Delta adh3$, $\Delta adh4$, $\Delta ura3-52$ [pYES2], soca deficient en les *adh1-4*, la soca WV36-405 *adh1*, $\Delta adh2$, $\Delta adh3$, $\Delta adh4$, $\Delta ura3-52$ [pYES2-*ADH1*], que sobreexpressa Adh1p en

galactosa i serveix per a “marcar” la posició de l’enzim en el gel IEF, WV36-405 *adh1*, $\Delta adh2$, $\Delta adh3$, $\Delta adh4$, $\Delta ura3-52$ [pYES2-ADH2] i WV36-405 *adh1*, $\Delta adh2$, $\Delta adh3$, $\Delta adh4$, $\Delta ura3-52$ [pYES2-ADH3], que serviran per a “marcar” les posicions de Adh2p i Adh3p en el gel IEF. Mentre que les soques derivades de WV36-405 es van créixer en 2% galactosa per induir la expressió de Adh1p, Adh2p, Adh3p Adh1-SRSp i Adh1-NNp.

El gel de IEF de la Figura 51 es va revelar amb etanol i NAD⁺. Les mostres carregades als carrils 6, 7 i 8 (carril 6: WV-36 405[pYES2-ADH1], carril 7: WV-36 405[pYES2-ADH2] i carril 8: WV-36 405[pYES2-ADH3]), marquen les posicions de Adh1p, Adh2p i Adh3p. El pI més elevat correspon a Adh3p. La soca WV-36 405 [pYES2-ADH1-SRS], carregada al carril 9, no mostra gairebé activitat amb NAD⁺ i etanol, mentre que la soca WV-36 405[pYES2-ADH1-NN], carregada al carril 10 mostra activitat i pràcticament el mateix pI que Adh1p. Aquest darrer resultat va resultar sorprenent, doncs esperàvem que l’enzim mutat no fós actiu amb cap coenzim. La soca WV-36 405[pYES2], carregada al carril 3, no mostra cap activitat enzimàtica (la mica d’activitat corresponent a Adh3p seria provinent d’una petita contaminació provinent del carril adjacent 4 (o a alguna activitat d’un enzim no conegut).

Les soques derivades de la soca FY834 *ADH1,ADH2,ADH3,ADH4*, en la que s’havia aplicat la metodologia del *delitto perfetto* i crescut en glucosa al 2% van mostrar el següent comportament: la soca salvatge FY834, carregada al carril 2 mostra les bandes de Adh1p (molt prominent) i la banda corresponent a Adh3p. També mostra una “marca” molt dèbil corresponent a Adh2p. La soca que sobreexpressa Adh1-SRSp, carregada al carril 4, mostra una gran activitat corresponent a Adh3p i una més feble que correspondria a Adh1-SRSp: el seu pI és més elevat que Adh1p, degut a la presència de una Arg i la seva activitat és molt menor que la del carril 2, que expressa l’enzim Adh1p “salvatge”.

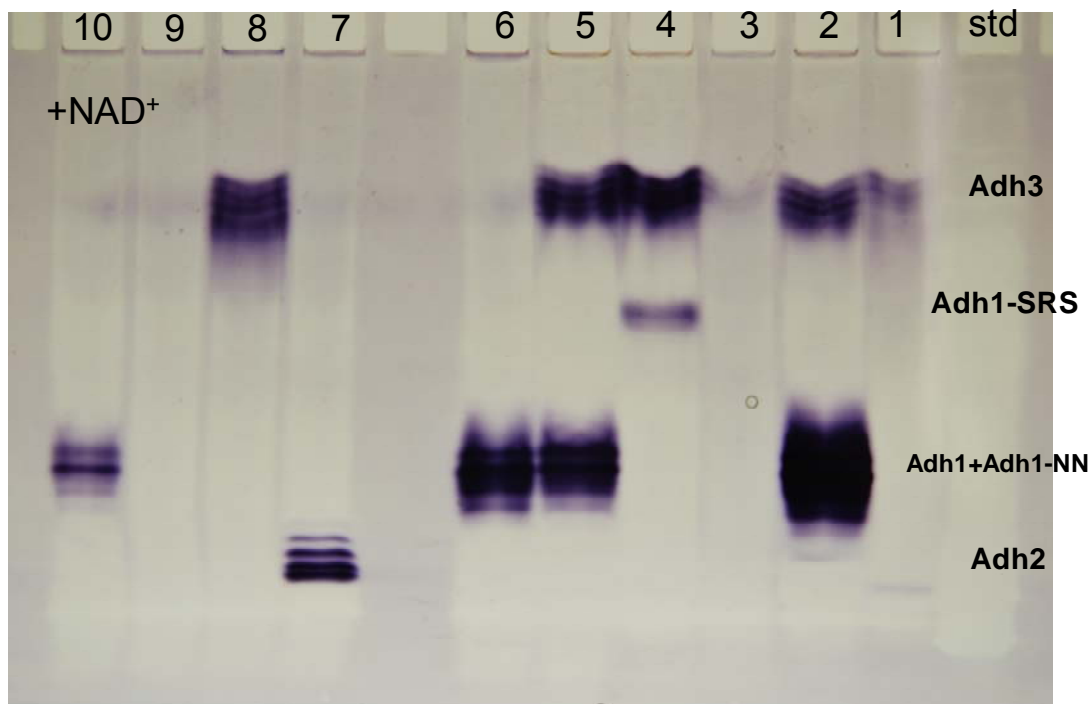


Figura 51. IEF amb els diferents mutants d'Adh1p, revelat amb NAD^+ . Carril 1: *FYADH1Δ*, carril 2: FY, carril 3: res, carril 4: *FYADH-SRS*, carril 5: *FYADH-NN*, 6: WV-36 405[pYES2-*ADH1*], carril 7: WV-36 405[pYES2-*ADH2*], carril 8: WV-36 405[pYES2-*ADH3*], carril 9: WV-36 405 [pYES2-*ADH1-SRS*], carril 10: WV-36 405[pYES2-*ADH1-NN*].

Per la seva part l'enzim Adh1-NNp, que estaria expressat a l'extracte proteic carregat al carril 5, mostra una banda intensa corresponent a Adh3p i una altra bastant intensa, que correspondria a Adh1-NNp. Corroborem amb aquest resultat que l'enzim Adh1-NNp mostra bastanta activitat amb NAD^+ . Finalment, l'extracte carregat al carril 1, que correspon a la soca *FYadh1Δ*, gairebé no mostra cap activitat enzimàtica adh. Aquesta soca va créixer molt poc en glucosa degut a tenir la deleció en *adh1*.

Paralel·lament es van carregar els mateixos volums dels extractes en un altre gel de IEF, que es va "revelar" amb etanol i NADP^+ . El resultat es mostra a la figura 52:

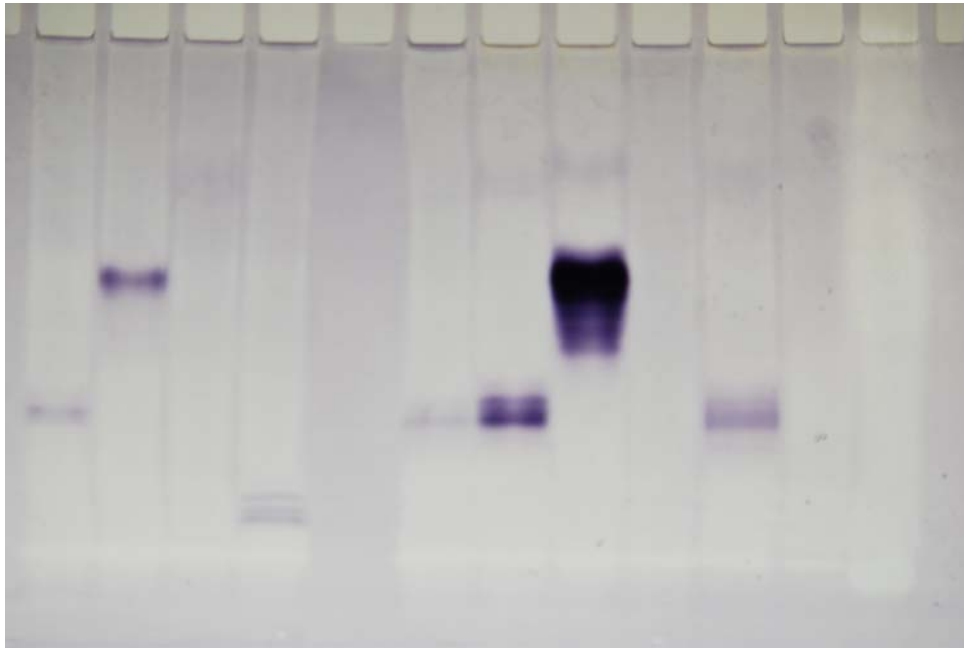


Figura 52. IEF amb els diferents mutants d'Adh1p, revelat amb NADP⁺. Carril 1: *FYADH1Δ*, carril 2: FY, carril 3: res, carril 4: *FYADH-SRS*, carril 5: *FYADH-NN*, 6: WV-36 405[pYES2-*ADH1*], carril 7: WV-36 405[pYES2-*ADH2*], carril 8: WV-36 405[pYES2-*ADH3*], carril 9: WV-36 405 [pYES2-*ADH1-SRS*], carril 10: WV-36 405[pYES2-*ADH1-NN*].

El carril 4, on està l'extracte de la soca que sobreexpressa Adh1-SRSp, mostra molta activitat etanol deshidrogenasa dependent de NADP⁺. També la soca WV-36 405 [pYES2-*ADH1-SRS*] que sobreexpressa Adh1-SRSp, carregada al carril 9, mostra activitat dependent de NADP⁺. Aquesta forma mutada Adh1-SRSp té un pI superior a Adh1p, donat que s'ha substituït el triplet d'aminoàcids DGG per SRS (amb pI superiors).

Per la seva part l'enzim Adh1-NNp, que estaria expressat a l'extracte proteic carregat al carril 5, mostra una banda intensa corresponent a activitat etanol deshidrogenasa dependent de NADP⁺, com també es veu una banda corresponent a Adh1-NNp (carril 10). Així, doncs, un resultat sorprenent és que aquest enzim pensat per a no tenir activitat etanol deshidrogenasa dependent ni de NAD(H), ni de NADP(H), finalment mostra activitat amb els dos coenzims.

L'avaluació de l'impacte que tenen les mutacions en *ADHI* en el creixement del llevat, es va dissenyar un assaig amb tres fonts de carboni diferents (glucosa, galactosa i rafinosa) en les quatre soques FY834 (soca "salvatge"), FY*adh1Δ* (soca amb *adh1* delecionada), FY-SRS (soca amb l'*ADHI* mutat, de forma que és dependent de NADP(H)) i FY-NN (soca amb l'*ADHI* mutat, de forma que és dependent de NAD(H) i NADP(H)), per sextuplicat. L'assaig es va fer en un lector de plaques termostatitzat (Victor 3), que ens va permetre seguir el creixement a 72 "pouets" durant 2-3 dies.

Com s'observa en la figura 51 , les soques salvatge i FY-NN mostren un comportament molt semblant en las tres fonts de carboni, mentre que la soca FY-SRS mostra un creixement més lent en les tres fonts de carboni i a més no arriba al nivell de creixement de la soca salvatge, ni de la soca FY-NN. Per la seva part, la soca FY*adh1Δ* creix més lentament que les altres tres i tampoc assoleix la densitat cel·lular a la que arriben les altres. L'efecte és molt pronunciat en glucosa, on la soca FY*adh1Δ* gairebé no creix.

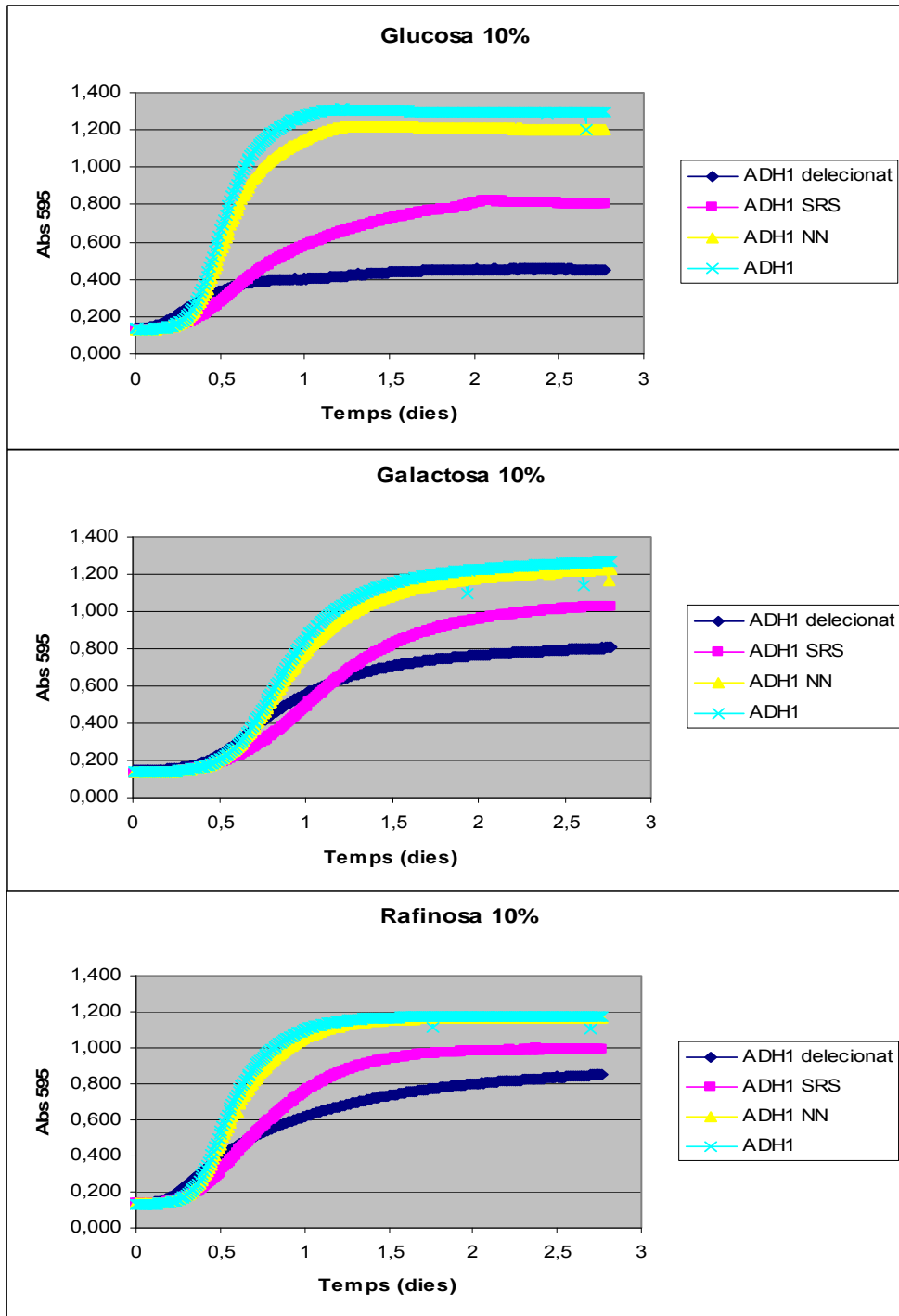


Figura 51. Corbes de creixement de les soques FY, FY-ADH1 Δ , FY-ADH1_SRS i FY-ADH1_NN, en 10% de glucosa, galactosa i rafinosa.

La presència de sis His als extrems carboxil de les proteïnes Adh1(His)6p i Adh1-NN(His)6p ens va permetre la seva ràpida purificació, com s'observa al gel de la figura 52. Com es veu al carril 3, la proteïna Adh1-NN(His)6p seria més susceptible a la degradació que la Adh1(His)6p.

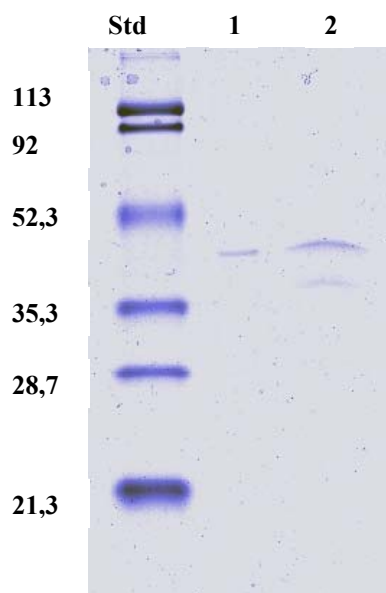


Figura 52. Gel amb Adh1(His)6p i Adh1-NN(His)6p. Carril 1: marcador de pesos moleculars, carril 2: Adh1(His)6p, carril 3: Adh1-NN(His)6p.

Discussió

Els dos objectius de la present Tesi són emprar enzims de llevat per a obtenir estereoisòmers purs (tan hidroxicetones com diols) procedents de dicetones veïnes, i desenvolupar noves tècniques “d’auto-clonació” que permetin introduir mutacions puntuals en els cromosomes de llevat sense introduir DNA forani.

En la primera part de l’estudi hem purificat tres enzims de llevat i dos humans (de la superfamília de les aldoceto-reductases) i hem determinat els seus paràmetres cinètics envers la reducció de diacetil, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona i 3,4-hexanodiona. Tots els enzims són dependents de NADP(H) i el que ha mostrat més especificitat enzimàtica en la reducció del diacetil ha estat AKR5G de llevat. A continuació han estat les AKRs humanes AKR1B10 i AKR1B1 i després les enzims AKR3C1 i AKR5F de llevat.

Els experiments de gel-filtració de les AKRs emprades ens han permès determinar les estructures quaternàries de Ara1p, que és un homodímer en concordança a com ja havia estat descrit prèviament Amako (Amako et al. 2006), mentre que AKR5G i AKR5F són monòmers, també en concordança amb el descrit prèviament per a AKR5G (Ishihara et al. 2004). En aquest estudi s’ha determinat per primera vegada, que AKR5F és un monòmer.

Dels resultats de les reaccions de reducció de les dicetones veïnes amb les AKRs (en presència d’un sistema de regeneració de NADPH), s’observen dos patrons diferents: un representat per AKR3C1 i AKR5F de llevat i AKR1B1 i AKR1B10 humanes, donen essencialment α -hidroxicetones en configuració *S* i a més mostren regioselectivitat en la reducció del grup ceto més proper a l’extrem de la molècula (grup 2-oxo). Malgrat això, una desviació en aquest comportament la mostra AKR5F que dona un 9% aproximadament d’hidroxicetona en configuració *R*. L’altre grup, representat per AKR5G, dona les hidroxicetones en configuració *R*. AKR5G mostra regioselectivitat envers la

reducció del grup 3-oxo de la 2,3-pentanodiona, mentre que mostra un comportament més relaxat alhora de reduir la 2,3-hexanodiona (on dona un 22% de reducció del grup 2-oxo) (Figures 33 i 34).

Altres estudis anteriors han obtingut resultats semblants als del nostre estudi: van Bergen i col·laboradors (van Bergen et al. 2006), van obtenir acetoina i hidroxipentanona partint de diacetil i 2,3-pentanodiona respectivament, emprant AKR3C1 pur. Obtenien un pic per a acetoina, sense concretar quin enantiòmer era (que hauria de ser, en principi, *S*-acetoina). En la reacció amb 2,3-pentanodiona, obtenien dos pics, però no arriben a dilucidar quin producte era, 2-hidroxí-3-pentanona o 3-hidroxí-2-pentanona. Estudis en els que es buscaven reductases de llevat, obtenien els estereoisòmers *S* en les reduccions de diacetil i 2,3-pentanodiona, des d'un extracte cru on s'havia sobreexpressat AKR3C1, en concordança amb els nostres resultats obtinguts amb l'enzim pur (Johanson et al. 2005) (Katz et al. 2003).

En un altre article (Kaluzna et al. 2004), estudien reaccions catalitzades per AKRs de llevat fusionades a la glutatió *S*-transferassa (GST), expresades en bacteria, front diversos α -ceto ésters. Encara que els substrats que utilitzen siguin diferents que els usats en el nostre estudi, els resultats són concordants. Utilitzant com a substrat el etil-3-oxobutanat, observen la producció de etil-(*S*)-3-hidroxibutanat en la reacció mediada per la proteïna de fusió GST-AKR3C1, i la producció de l'estereoisòmer en configuració *R* del mateix producte en la reacció mediada per GST-AKR5G. Així mateix, en la reacció mediada per GST-AKR5F davant del mateix substrat, etil-3-oxobutanat, obtenen una mescla de estereoisòmers en configuració *R* i *S*; el mateix s'obté en la reacció mediada per AKR5F davant 3,4-hexanodiona. Si bé la ratio entre les configuracions *S* i *R* són diferents, aquests resultats mostren una clara concordança qualitativa amb els nostres resultats. De la mateixa manera, Ishihara i col·laboradors (Ishihara et al. 2004), en unes reaccions mediades per AKR5G, obtenen els estereoisòmers en configuració *R*, quan redueixen els substrats etil-2-oxobutanat i etil-2-

oxopentanoat, en un excés enantiomèric superior a 98%. Tot i que amb uns altres substrats, altre cop hi ha concordança amb les nostres observacions pel que fa a l'estereoselectivitat de AKR5G.

Considerant que els enzims AKRs transfereixen el 4-pro-R-hidrur del NADPH al carbonil del substrat, les diferents configuracions obtingudes, provinents del mateix substrat (VDKs), semblen indicar que els diferents substrats tenen formes diferents d'unió al centre actiu. Una possible explicació podria venir donada per l'observació de l'alineament multi seqüència dut a terme per Petrash i col·laboradors (Petrash et al. 2001), amb les seqüències de AKR1B1, AKR2B6, AKR3A1, AKR3A2, AKR3C1, AKR5F i AKR5G. Aquest alineament mostra que la tètrada catalítica (Asp-43, Tyr-48, Lys-77 i His-110, numerada d'acord amb AKR1B1), està conservada. També s'hi observa que la principal diferència entre les AKRs humanes i les de llevat, amb l'excepció de la AKR3C1 de llevat, està en els anomenats *loops* A i B (Katz et al. 2003). Així, AKR1B1, AKR1B10 i AKR3C1 tenen un *loop* A d'una mida molt semblant, mentre que a AKR5F i AKR5G els hi manca aquest *loop* A. Pel que fa al *loop* B, les 5 AKRs estudiades, AKR1B1, AKR1B10, AKR3C1, AKR5F i AKR5G, presenten una mida molt similar d'aquest *loop*. En vista d'això, i tenint en compte les estereoselectivitats mostrades per aquests enzims, es pot concloure que la presència o absència d'aquests *loops* no pot explicar per si mateixa les diferències d'estereoselectivitat. Hi ha, com a mínim, dues proves clares: AKR1B1, AKR1B10, AKR3C1 i AKR5F mostren la mateixa estereoselectivitat en la producció de les α -hidroxicetones, però AKR5F no té el *loop* A; i, tant a AKR5F com a AKR5G els hi manca el *loop* A, però mostren una enantioespecificitat diferent. D'altra banda, a part, o en comptes, de la llargada del *loop*, potser influència més a la estereoselectivitat dels enzims, la seqüència aminoacídica d'aquests. En aquest sentit, Beers i col·laboradors (Beers et al. 2012), han mostrat que mutacions simples en el *loop* A de AKR5G provoquen un canvi en la estereoselectivitat d'aquest quan duu a terme la reducció del 2-chloro-3-phenylpropionic acid ethyl ester.

També s'ha observat la que AKR3C1, AKR1B1 i AKR1B10 són actives en la reducció de (*R/S*)-acetoïna, donant una barreja d'estereòmers: per acció de AKR3C1 i AKR1B1 s'obtenia una barreja de (*meso*)-2,3-butanodiol i (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol, i l'acció de AKR1B10 donava també (2*S*,3*S*)-2,3-butanodiol. AKR1B1 també aconseguix la reducció dels dos grups cetònics de la 3,4-hexanodiona donant (3*S*,4*S*)-3,4-hexanodiol (Figures 36 i 37).

En la segona part de la Tesi, hem mostrat que l'enzim Bdh1p pur redueix els dos grups carbonil del diacetil a (2*R*, 3*R*)-2,3-butanodiol òpticament pur (Figures 38 i 39). A més, quan s'usa 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona i 3,4-hexanodiona amb Bdh1p pur, només una forma estereoisomèrica dels diols corresponents s'identifica en les mescles de reacció. Donada la estereoselectivitat mostrada per Bdh1p cap el diacetil, els assignem tentativament les configuracions (*R*, *R*). La no existència comercial dels corresponents diols purs, dificulta la assignació absoluta de les configuracions.

Els estudis cinètics en estat estacionari realitzats amb Bdh1p pur i diverses dicetones veïnes mostren que la constant d'especificitat k_{cat} / K_M disminueix de diacetil a 2,3-hexanodiona i després augmenta per 3,4-hexanodiona (Taula 8). Bdh1p mostra les constants d'especificitat més altes cap als metabòlits de *Saccharomyces cerevisiae*, que es coneix que transforma: acetoïna, diacetil i 2,3-pentanodiona.

Si bé utilitzant Bdh1p pura s'aconsegueix obtenir una sola forma estereoisomèrica dels diols corresponents, hi ha l'inconvenient d'haver d'utilitzar formiat i FDH per tal de regenerar el NADH. Per evitar l'ús del sistema regenerador de NADH extern, es va pensar en obtenir i utilitzar una soca que sobreexpressi els gens *BDHI* i *FDHI* endògens. És important que la soca utilitzada tingui un *background* genètic convenient per a la finalitat desitjada. Així, en primer lloc, es va testar l'existència d'altres diacetil reductases diferents

de la Bdh1p en extractes de llevat provinents d'una soca derivada de la soca *wild type* FY834, en la que ja no hi ha activitat BDH. Es va escollir la soca EG2 (FY834a *TRP1::bdh1*), prèviament obtinguda en el laboratori (Gonzalez et al. 2000), i es va observar que l'enzim Adh2p té activitat diacetil reductasa depenent de NADH, formant l'estereoisomer *S*-acetoina en reduir el diacetil. A més, també s'ha mostrat que els enzims Adh1p i Adh3p tenen activitat diacetil reductasa depenent de NADH, i que també donen l'estereoisomer *S*-acetoïna quan redueixen el diacetil. En conseqüència amb l'observat, la soca escollida ha de tenir deletats els tres gens que codifiquen per aquests tres enzims; així, la soca d'elecció fou la WV36-405 (*adh1Δ, adh2Δ, adh3Δ*). D'aquesta manera, s'evita la producció del meso-2,3-butanediol, que seria el producte resultant de la reducció de la *S*-acetoina mediada per Bdh1p (Gonzalez et al. 2000).

Per a sobreexpressar *BDH1* en aquesta soca, hem desenvolupat una variació de la tècnica del *delitto perfetto* (Storici et al. 2001), per a posicionar el promotor *GAL1-10* davant de *BDH1*. El cassette de selecció porta els gens *URA3* i *natMX4*. Un dels marcadors de selecció utilitzats, *URA3* de *Kluyveromyces lactis*, sent diferent en seqüència a *URA3* de *S. cerevisiae*, minimitza els esdeveniments de recombinació homòloga amb el locus *URA3* endogen, mentre que l'altre, *natMX4*, dona menys mutants espontànies (resultats no mostrats) que amb el marcador *kanMX4* emprat a la metodologia original. Per a sobreexpressar *FDH1* es va clonar aquest gen en el vector multicòpia pYES2, que és induïble en presència de galactosa.

La soca de llevat modificada que sobreexpressa Bdh1p i Fdh1p en presència de galactosa es va denominar DP-BDH1. Es va verificar la correcció d'ambdós constructes per seqüenciació directa i es va mesurar un augment de 4,5 vegades en l'activitat específica envers (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol i de més de 100 vegades envers format en els extractes de proteïnes corresponents, en comparació amb els valors de la soca parental, transformada amb un plasmidi buit.

Quan es varen utilitzar extractes proteics de la soca DP-BDH1 (o bé, cèl·lules permeabilitzades de la mateixa soca) en la reducció de les dicetones sense afegir FDH exògena, els diols resultants eren una barreja de diferents estereoisòmers. Així, emprant diacetil com a precursor, es va identificar *meso*-2,3-butanodiol i (*2R*, *3R*)-2,3-butanodiol com a productes mitjançant l'ús d'extractes proteics de la soca DP-BDH1 i també una petita quantitat de (*2S*, *3S*)-2,3-butanodiol en emprar cèl·lules permeabilitzades (Figures 41 i 42). Una barreja de diferents formes estereoisòmeras de 2,3-pentanodiol, 2,3-hexanodiol i 3,4-hexanodiol es van obtenir en les reduccions de 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona i 3,4-hexanodiona, respectivament (Figures 41 i 42). Encara que era avantatjós utilitzar la soca DP-BDH1 sense necessitat d'enzim exògen per regenerar el coenzim, la composició diastereoisomèrica dels productes impedeix l'ús d'aquesta soca per obtenir diols purs amb configuració (*2R,3R*). Les diferents formes estereoisòmeres dels diols es formen a causa de la presència d'altres enzims que podrien convertir els mateixos substrats, però amb diferents estereoselectivitats. Per tant, les activitats d'altres dicetona reductases (dependents de NADH i/o NADPH en les cèl·lules permeabilitzades) en el llevat serien responsables de la producció de *S*-hidroxicetones i les diferents formes estereoisomèriques dels diols (González et al. 2010). De fet, la reducció de diacetil i 2,3-pentanodiona per només una hora, va permetre l'observació de *S*-acetoína, (*2S*)-hidroxi-3-pentanona i (*3S*)-hidroxi-2-pentanona (Figura 42, panells A i B). Llavors, Bdh1p i / o altres reductases reduirien aquestes barreges de hidroxicetones a la barreja corresponent de diols. Una barreja d'estereoisòmers d'alcohols derivats de la reducció de alfa- i beta-cetoésteres ja es va observar treballant amb cèl·lules de llevat (Kaluzna et al. 2004). Les AKRs de llevat AKR3C1 i AKR5F estudiades a la primera part d'aquesta Tesi podrien participar en les reduccions de les dicetones a les formes *S*-hidroxicetona.

Per evitar aquestes activitats que interfereixen, i l'ús exògen de FDH, es va construir una proteïna de fusió bifuncional amb activitats FDH i BDH amb una cua d'His en el seu extrem C-terminal que incorpora, a part dels dos enzims,

un linker per unir-les i una cua de 6 histidines en el seu extrem C-terminal per a la seva fàcil purificació: Fdh1-Bdh1(His)₆p.

Mitjançant l'ús d'aquesta proteïna es van obtenir (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol, (2*R*,3*R*)-2,3-pentanodiol, (2*R*,3*R*)-2,3-hexanodiol i (3*R*,4*R*)-3,4-hexanodiol purs (Figura 46) però amb menor rendiment (31% en el cas de (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol) que quan s'utilitza pur Bdh1p i formiat deshidrogenasa exogen (conversió del 95% de diacetil a (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol).

Es van analitzar diferents propietats de la proteïna de fusió Fdh1-Bdh1(His)₆p, com la seva estructura quaternària mitjançant una columna de gel-filtració. La proteïna es comporta com a dimer; el que és consistent amb que Bdh1p és un dimer (Gonzalez et al. 2000), i també Fdh1p de *Candida boidinii* és un dimer (Schirwitz et al. 2007).

A més, es va seguir l'expressió de la proteïna de fusió a través d'un *Western-blot* i d'un zimograma, consistent aquest darrer, en un gel d'isoelectroenfoc seguit d'un assaig d'activitat enzimàtica en el propi gel amb 2,3-butanodiol i NAD⁺ com a substrats. El *Western-blot* mostra que la proteïna de fusió pateix proteòlisi, però tot i així, mostra activitat en el zimograma. Tenint en compte que els anticossos utilitzats per al *Western-blot* són anticossos anti-his, es pot pensar que la proteòlisi afecta més, o comença afectant, l'extrem N-terminal de la proteïna, on hi ha la Fdh1p, i que per tant en aquests "trossos" que es poden visualitzar gràcies als anticossos anti-his, quedaria intacta la activitat Bdh1p, que és la que dóna de forma efectiva l'activitat butanodiol deshidrogenasa. Això podria ser una de les raons del baix rendiment de formació de diols emprant la proteïna de fusió Fdh1-Bdh1(His)₆p en comparació a la quantitat de diols obtinguda per l'enzim Bdh1p pur amb addició de Fdh1p exògena. Les activitats Bdh i Fdh de la proteïna de fusió són molt més baixes que les dels enzims no fusionats: els valors de kcat de les activitats BDH i FDH van ser 50 i 24 vegades inferior, respectivament, per a la proteïna de fusió que per els enzims individuals.

L'ús d'aquesta proteïna de fusió va permetre, doncs, la producció de (*R,R*) diols veïns pur a partir de dicetones, sense la necessitat d'afegir un sistema de regeneració de cofactor-extern, però amb un baix rendiment. No obstant, encara queda feina per fer, per augmentar l'estabilitat de la proteïna de fusió i el nivell d'expressió i/o la taxa de regeneració de Fdh1p. Un enfocament similar per a la regeneració de cofactor va ser utilitzat recentment per Hölsch i Weuster-Botz (Hölsch & Weuster-Botz 2010), per convertir una cetona proquiral a (*S*)-1-(pentafluorofenil)-etanol. Van utilitzar una proteïna bifuncional composta d'un enzim mutant format deshidrogenasa (dependent de NADP) lligat a un enzim amb activitat NADPH-reductasa, en la reducció de cèl·lules senceres de pentafluoroacetophenone. En aquest cas, però, la activitat dels enzims gairebé no es veu afectada per la fusió.

També es va estudiar l'especificitat de Bdh1p cap als dos grups hidroxil de (*2R,3R*)-2,3-pentanodiol i (*2R,3R*)-2,3-hexanodiol després de l'oxidació amb NAD⁺, així com per a la reacció inversa, la reducció de 2,3-pentanodiona i 2,3-hexanodiona amb NADH. La reducció de 2,3-pentanodiona després d'una hora de reacció va proporcionar (*3R*)-hidroxi-2-pentanona com a producte intermedi (Figura 47, panell A). Quan la reacció de reducció va ser completa (Figura 47, panell B), es va separar el producte (*2R,3R*)-2,3-pentanodiol i es va estudiar la selectivitat en la direcció d'oxidació, donant (*2R*)-hidroxi-3-pentanona. Un resultat consistent amb aquestes observacions es va obtenir quan s'estudia l'oxidació/reducció de (*2R,3R*)-2,3-hexanodiol/2,3-hexanodiona per Bdh1p. L'enzim va mostrar preferència pel grup funcional unit al carboni més intern, és a dir, C-3, en les reaccions d'oxidació i reducció (Figura 48). Per tant, 3-hidroxi-2-hexanona es va identificar en la direcció de reducció i 2-hidroxi-3-hexanona (mitjançant els seus espectres de masses) en la direcció d'oxidació. Amb la caracterització de tots aquests productes, es proposa el mecanisme que es mostra a la Figura 49, el que indica que el carboni més intern (C-3 de 2,3-pentàdiona i hexàdiona) és el més reactiu, ja que és el que reacciona predominantment en ambdues direccions. Encara que no detectem (*2R*) hidroxi-3-pentanona en la

direcció de reducció de 2,3-pentanodiona per Bdh1p (Figura 47, panell A), no es pot negar que no se'n produeixi gens (Figura 49, línia més fina). Per la mateixa raó una línia discontinua indica una oxidació minoritària de (2*R*,3*R*)-2,3-pentanodiol a (3*R*)-hidroxi-2-pentanona.

Donat que no s'ha publicat encara cap estructura 3D de qualsevol (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol deshidrogenasa, seria especulatiu donar una raó estructural per a aquesta preferència. Un article recent (Miao et al., 2013) informa de la cristal·lització d'un ortòleg de (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol deshidrogenasa de *Bacillus coagulans*; per tant, serem capaços de discutir més profundament la reactivitat diferencial dels dos centres estereogènics, una vegada que l'estructura 3D de l'enzim es resolgui.

Finalment, hem demostrat el poder de resolució de la columna de β -ciclodextrina que ha estat capaç de resoldre les quatre hidroxicetonas derivades de 2,3-pentàdiona i les quatre derivades de la 2,3-hexàdiona (Figura 50). Encara que *R*-3-hidroxi-2-pentanona i *R*-2-hidroxi-3-pentanona no estan completament resolts amb la columna quirals en les condicions utilitzades, es va obtenir una millor resolució i varem confirmar les seves identitats per l'ús d'una columna HP-5MS (resultats no mostrats).

La figura 53 il·lustra alguns dels compostos quirals que hem obtingut al laboratori a partir de compostos amb grups dicarbonílics veïns i la acció de Bdh1p y Ara1p pures.

Així per exemple, l'acció de Bdh1p pura rendeix (2*R*,3*R*)-2,3-pentanodiol a partir de 2,3-pentàdiona, mentre que la acció successiva d'Ara1p i Bdh1p donaria (2*S*,3*R*)-2,3-pentanodiol.

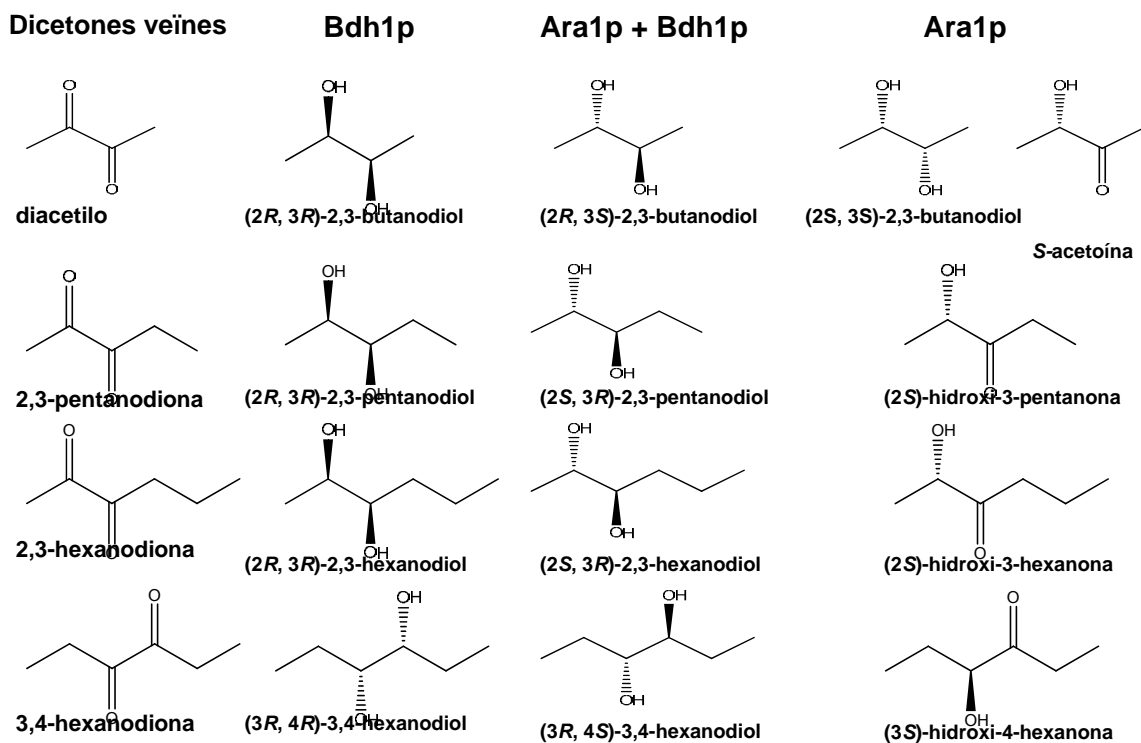


Figura 53. Compostos quirals obtinguts al laboratori amb Bdh1p i Ara1p. Aquests compostos s'han obtingut amb els enzims Bdh1p i Ara1p purificats en les mescles de reacció amb les dicetones veïnals.

Finalment, es va desenvolupar una variant de la tècnica del *delitto perfetto*, i es va aplicar en la generació de mutants cromosomals de ADH1: un dels mutants (ADH1-SRS) mostrava més activitat etanol deshidrogenasa en presència de NADP⁺, mentre que l'altra (ADH1-NN) va resultar actiu tant amb NAD⁺, com en NADP⁺. El creixement d'aquestes soques (juntament amb una soca "salvatge" FY-ADH1 i una soca delecionada *adh1Δ*) en diferents fonts de carboni va mostrar el gran impacte de les mutacions: així, la soca ADH1-SRS al restringir l'activitat *ADH1* a la disponibilitat de NADP⁺, a més de la disminució de l'eficiència enzimàtica de la reacció, li és més difícil metabolitzar el sucre i per tant créixer. La soca ADH1-NN, encara que sigui menys eficient que la soca FY-ADH1, pot compensar-ho en bona manera gràcies a poder utilitzar qualsevol dels dos cofactors, i tenir un creixement similar al de la soca salvatge.

Seria convenient mesurar els nivells intracel·lulars dels coenzims NAD(P) i NAD(H), per a determinar el *status* redox de les cèl·lules.

Conclusions

- L'enzim Bdh1p és capaç de reduir els dos grups carbonil del diacetil obtenint (2*R*, 3*R*)-2,3-butanodiol de forma enantiopura. A més, quan redueix 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona i 3,4-hexanodiona, només s'identifica una forma estereoisomèrica dels diols corresponents, que presumiblement seria la forma (*R,R*).
- Tant Bdh1p com la proteïna de fusió Fdh1-Bdh1(His)₆p, actuen com a dímers.
- La proteïna de fusió Fdh1-Bdh1(His)₆p obté de forma enantiopura (2*R*,3*R*)-2,3-butanodiol i presumiblement (2*R*,3*R*)-2,3-pentanodiol, (2*R*,3*R*)-2,3-hexanodiol i (3*R*,4*R*)-3,4-hexanodiol, de la mateixa manera que Bdh1p, però amb menor rendiment.
- Les activitats Bdh i Fdh de la proteïna de fusió són molt més baixes que les dels enzims no fusionats: els valors de kcat de les activitats BDH i FDH van ser 50 i 24 vegades inferior, respectivament, per a la proteïna de fusió que pels enzims individuals
- La proteïna de fusió Fdh1-Bdh1(His)₆p seria una molt bona candidata a dur a terme les reaccions per a la producció de diols i hidroxicetones per reacció enzimàtica a nivell industrial, si no fos per la seva inestabilitat aparent, ja que sembla que pateix proteòlisi. Això podria ser una de les raons del baix rendiment de formació de diols emprant la proteïna de fusió en comparació a la quantitat de diols obtinguda per l'enzim Bdh1p pur amb addició de Fdh1p exògena.

- Seria ventatjós l'ús de la proteïna de fusió Fdh1-Bdh1(His)₆p front la soca que sobreexpressa Bdh1p i Fdh1p és que, amb els extractes o cèl·lules permeabilitzades provinents d'aquesta darrera, s'obtenen configuracions *S* de les hidroxicetones i diols, encara que en poca mesura, i això fa que aquesta soca quedi descartada per a l'obtenció de diols enantiopurs en configuració *R*. Un altre avantatge front la soca que sobreexpressa les activitats BDH i FDH, és que és més fàcil treballar amb enzims que amb cèl·lules, i també ho seria davant de l'ús de Bdh1p pur en la mesura que no necessita sistema de regeneració de NADH.
- La soca de llevat que sobreexpressa les activitats BDH i FDH és una bona eina per a l'obtenció de totes les formes estereomèriques dels diols i hidroxicetones mitjançant cèl·lules senceres.
- Amb els enzims d'estudi, és possible obtenir tots els isomers de les hidroxicetones i diols provinents de les dicetones utilitzades. Alguns d'ells es poden obtenir de forma enantiopura, ja sigui amb un sol enzim o combinant diferents enzims, en funció de la selectivitat d'aquests.
- Els enzims són estereoselectius, pel que fa a les configuracions *R* o *S*, en les reduccions de les dicetones. En alguns casos, però, no mostren una regioselectivitat tant estricta alhora de reduir el grup ceto (com per exemple AKR5G davant de 2,3-pentanodiona o 2,3-hexanodiona).
- Dels enzims sobreexpressats (Bdh1p, Adh2p, AKR3C1 (Ara1p), AKR5F, AKR5G, AKR1B1 i AKR1B10), el millor candidat per a l'obtenció de diols i hidroxicetones de forma enantiopura és Bdh1p, tot i que queda restringit a configuracions *R*.

- AKR5F, AKR3C1 (Ara1p), AKR1B1 i AKR1B10 mostren estereoselectivitat per les configuracions *S*, mentre que AKR5G la mostra per les configuracions *R*.
- De les AKRs estudiades, la que ha mostrat més especificitat enzimàtica en la reducció del diacetil ha estat AKR5G de llevat, que té una estereoselectivitat elevada per a configuracions *R*, excepte en la 2,3-hexanodiona.
- AKR3C1 (Ara1p) és un homodímer, mentre que AKR5F i AKR5G són monòmers.
- La variació en la metodologia del *delitto perfetto* ha resultat ser una bona tècnica d'autoclonació per tal de fer manipulacions genètiques al llevat, sense introduir-hi material genètic forani i sense que quedi “rastre” de la manipulació feta.
- Mitjançant una variant de la metodologia del *delitto perfetto*, es van aconseguir mutants cromosomals de *ADH1* i *ADH3*. Un dels mutants (ADH1-SRS; ADH3-SRS) mostrava més activitat etanol deshidrogenasa en presència de NADP⁺, mentre que l'altra (ADH1-NN/ADH3-NN) va resultar actiu tant amb NAD⁺, com en NADP⁺.
- En la comparació dels creixements dels mutants *ADH1*^{*}, front *ADH1* “salvatge”, s'observa clarament l'influència de la mutació, que dificulta el creixement de les cèl·lules amb ambdues mutacions.

BIBLIOGRAFIA

- Akada, R., 2002. Genetically modified industrial yeast ready for application. *Journal of bioscience and bioengineering*, 94(6), pp.536–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233347>.
- Amako, K. et al., 2006. NADP(+)-dependent D-arabinose dehydrogenase shows a limited contribution to erythroascorbic acid biosynthesis and oxidative stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(12), pp.3004–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17151466>.
- Beers, M. et al., 2012. Using biocatalysis to integrate organic chemistry into a molecular biology laboratory course. *Biochem Mol Biol Educ*, 40, pp.130–137.
- Van Bergen, B. et al., 2006. α,β -dicarbonyl reduction by *Saccharomyces d-arabinose* dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760, pp.1636–1645.
- Boulton, C. & Quain, D., 2001. Brewing yeast and fermentation | Nguyen Hongdiep - Academia.edu. Ed. By Blackwell, London. Available at: http://www.academia.edu/6545837/Brewing_yeast_and_fermentation.
- Celińska, E. & Grajek, W., 2009. Biotechnological production of 2,3-butanediol- Current state and prospects. *Biotechnology Advances*, 27, pp.715–725.
- Chang, Q. & Petrash, J.M., 2008. Disruption of aldo-keto reductase genes leads to elevated markers of oxidative stress and inositol auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783, pp.237–245.
- Chen, G.C. & Jordan, F., 1984. Brewers' yeast pyruvate decarboxylase produces acetoin from acetaldehyde: a novel tool to study the mechanism of steps subsequent to carbon dioxide loss. *Biochemistry*, 23(16), pp.3576–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6383467>.
- Ciriacy, M., 1976. Cis-dominant regulatory mutations affecting the formation of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADHII) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & general genetics* □: MGG, 145, pp.327–333.
- Ciriacy, M., 1975. Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II. *Molecular & general genetics* □: MGG, 138(2), pp.157–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1105150>.
- Ciriacy, M. 1997. In Yeast sugar metabolism. Ed F.K.Zimmermann y K.D.Entian. pps. 218-220).

- Cordeiro, C. & Freire, A.P., 1995. Digitonin permeabilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells for in situ enzyme assay. *Analytical biochemistry*, 229(1), pp.145–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8533887>.
- Crosas, E. et al., 2015. The yeast ζ -crystallin/NADPH:quinone oxidoreductase (Zta1p) is under nutritional control by the target of rapamycin pathway and is involved in the regulation of argininosuccinate lyase mRNA half-life. *The FEBS journal*, 282(10), pp.1953–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25715111>.
- Delneri, D., Gardner, D.C.J. & Oliver, S.G., 1999. Analysis of the seven-member AAD gene set demonstrates that genetic redundancy in yeast may be more apparent than real. *Genetics*, 153, pp.1591–1600.
- Denis, C.L. & Audino, D.C., 1991. The CCR1 (SNF1) and SCH9 protein kinases act independently of cAMP-dependent protein kinase and the transcriptional activator ADR1 in controlling yeast ADH2 expression. *Molecular & general genetics*: *MGG*, 229, pp.395–399.
- Denis, C.L., Ferguson, J. & Young, E.T., 1983. mRNA levels for the fermentative alcohol dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* decrease upon growth on a nonfermentable carbon source. *The Journal of biological chemistry*, 258, pp.1165–1171.
- Dickinson, F.M. & Dack, S., 2001. The activity of yeast ADH I and ADH II with long-chain alcohols and diols. *Chemico-biological interactions*, 130-132(1-3), pp.417–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306063>.
- Van Dijken JP et al., 2000. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme and microbial technology*, 26(9-10), pp.706–714. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10862876>.
- Donoviel, M.S., Kacherovsky, N. & Young, E.T., 1995. Synergistic activation of ADH2 expression is sensitive to upstream activation sequence 2 (UAS2) orientation, copy number and UAS1-UAS2 helical phasing. *Molecular and cellular biology*, 15, pp.3442–3449.
- Drewke, C., Thielen, J. & Ciriacy, M., 1990. Ethanol formation in *adh0* mutants reveals the existence of a novel acetaldehyde-reducing activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 172, pp.3909–3917.
- Ehsani, M. et al., 2009. Engineering of 2,3-butanediol dehydrogenase to reduce acetoin formation by glycerol-overproducing, low-alcohol *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 75(10), pp.3196–205. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2681661&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Eva González. Tesis Doctoral, 2004.

- Feske, B.D., Kaluzna, I.A. & Stewart, J.D., 2005. Enantiodivergent, biocatalytic routes to both taxol side chain antipodes. *Journal of Organic Chemistry*, 70, pp.9654–9657.
- Fujii, T. et al., 1990. Application of a ribosomal DNA integration vector in the construction of a Brewer's yeast having α -acetolactate decarboxylase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, pp.997–1003.
- Gallego, O. et al., 2007. Structural basis for the high all-trans-retinaldehyde reductase activity of the tumor marker AKR1B10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, pp.20764–20769.
- Gancedo, C., Gancedo, R. 1987. *Yeast Biotechnology*. Ed. by D.R.Berry, I. Russell & G.G. Stewart. London. Allen & Unwin.
- Ganzhorn, A.J. et al., 1987. Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases. Amino acid residue 294 and substrate specificity. *The Journal of biological chemistry*, 262, pp.3754–3761.
- Gerlt, J.A. & Babbitt, P.C., 2001. Divergent evolution of enzymatic function: mechanistically diverse superfamilies and functionally distinct suprafamilies. *Annual review of biochemistry*, 70, pp.209–46. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.biochem.70.1.209>.
- Gjermansen, C. et al., 1988. Towards diacetyl-less brewers' yeast. Influence of *ilv2* and *ilv5* mutations. *Journal of basic microbiology*, 28, pp.175–183.
- Goldstein, A.L. & McCusker, J.H., 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15, pp.1541–1553.
- Gommers, P.J. et al., 1988. Biochemical limits to microbial growth yields: An analysis of mixed substrate utilization. *Biotechnology and bioengineering*, 32, pp.86–94.
- Gonzalez, E. et al., 2000. Characterization of a (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* YAL060W gene product: Disruption and induction of the gene. *Journal of Biological Chemistry*, 275, pp.35876–35885.
- González, E. et al., 2010. Role of *Saccharomyces cerevisiae* oxidoreductases Bdh1p and Ara1p in the metabolism of acetoin and 2,3-butanediol. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), pp.670–679. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19966022>.
- Güldener, U. et al., 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic acids research*, 24(13), pp.2519–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=145975&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hahn-Hägerdal, B. et al., 2001. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 73, pp.53–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11816812>.

- Hedlund, J., Jörnvall, H. & Persson, B., 2010. Subdivision of the MDR superfamily of medium-chain dehydrogenases/reductases through iterative hidden Markov model refinement. *BMC bioinformatics*, 11(1), p.534. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/534>.
- Hirosawa, I. et al., 2004. Construction of a self-cloning sake yeast that overexpresses alcohol acetyltransferase gene by a two-step gene replacement protocol. *Applied microbiology and biotechnology*, 65, pp.68–73.
- Hisanaga Y, Ago H, Nakagawa N, Hamada K, Ida K, Yamamoto M, Hori T, Arii Y, Sugahara M, Kuramitsu S, Yokoyama S, M.M., 2004. Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer. *J Biol Chem* 279(30), pp.31717–31726. Available at: <http://www.jbc.org/content/279/30/31717.full.pdf>.
- Höckelmann, C. & Jüttner, F., 2005. Off-flavours in water: Hydroxyketones and β -ionone derivatives as new odour compounds of freshwater cyanobacteria. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, pp.387–394.
- Hölsch, K. & Weuster-Botz, D., 2010. Enantioselective reduction of prochiral ketones by engineered bifunctional fusion proteins. *Biotechnology and applied biochemistry*, 56, pp.131–140.
- Hoyos, P. et al., 2010. Biocatalytic strategies for the asymmetric synthesis of α -hydroxy ketones. *Accounts of chemical research*, 43, pp.288–299.
- Hu, X.Q. et al., 2013. Structures of *Saccharomyces cerevisiae* d-arabinose dehydrogenase Ara1 and its complex with NADPH: Implications for cofactor-assisted substrate recognition. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69, pp.1190–1195.
- Hudlicky, T., 2011. Introduction to enzymes in synthesis. *Chemical reviews*, 111(7), pp.3995–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21671674>.
- Ishihara, K. et al., 2004. Purification and characterization of α -keto amide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68, pp.2306–2312.
- Ito, H. et al., 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, 153, pp.163–168.
- Jackson, J.F. & Linskens, H.F. eds., 2002. *Analysis of Taste and Aroma*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-04857-3>.
- Jagow, G. & Klingenberg, M., 1970. Pathways of Hydrogen in Mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *European Journal of Biochemistry*, 12(3), pp.583–592. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1970.tb00890.x>.

- James, L.C. & Tawfik, D.S., 2001. Catalytic and binding poly-reactivities shared by two unrelated proteins: The potential role of promiscuity in enzyme evolution. *Protein science*: a publication of the Protein Society, 10(12), pp.2600–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2374036&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jeffery, J., Cederlund, E. & Jörnvall, H., 1984. Sorbitol dehydrogenase. The primary structure of the sheep-liver enzyme. *European journal of biochemistry / FEBS*, 140, pp.7–16.
- Ji, X.J., Huang, H. & Ouyang, P.K., 2011. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*, 29, pp.351–364.
- Jin, Y. & Penning, T.M., 2007. Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47, pp.263–292.
- Johanson, T., Katz, M. & Gorwa-Grauslund, M.F., 2005. Strain engineering for stereoselective bioreduction of dicarbonyl compounds by yeast reductases. In *FEMS Yeast Research*. pp. 513–525.
- Johnston, M., 1999. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends in genetics*: TIG, 15(1), pp.29–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10087931>.
- Jörnvall, H., 1970. Horse liver alcohol dehydrogenase. The primary structure of the protein chain of the ethanol *European journal of biochemistry / FEBS*.
- Jörnvall, H., Persson, B. & Jeffery, J., 1987. Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases. *European journal of biochemistry / FEBS*, 167, pp.195–201.
- Jörnvall, H., Persson, M. & Jeffery, J., 1981. Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, pp.4226–4230.
- Kaluzna, I.A. et al., 2004. Systematic investigation of *Saccharomyces cerevisiae* enzymes catalyzing carbonyl reductions. *Journal of the American Chemical Society*, 126, pp.12827–12832.
- Katz M., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund M.F. (2003). Screening of two complementary collections of *Saccharomyces cerevisiae* to identify enzymes involved in stereo-selective reduction of specific carbonyl compounds: an alternative to protein purification. *Enzyme Microb. Technol.* 33 163–172
- Kavanagh, K.L. et al., 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: The SDR superfamily: Functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, pp.3895–3906.

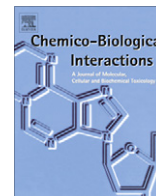
- De Koning, W. & van Dam, K., 1992. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Analytical biochemistry*, 204, pp.118–123.
- Kratzer, R., Wilson, D.K. & Nidetzky, B., 2006. Catalytic mechanism and substrate selectivity of aldo-keto reductases: insights from structure-function studies of *Candida tenuis* xylose reductase. *IUBMB life*, 58, pp.499–507.
- Kurtzman, C. p., Fell, J.W. & Boekhout, T., 2011. *The Yeasts*,
- Kushnirov, V. V., 2000. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast*, 16, pp.857–860.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, pp.680–685.
- Laffin, B. & Petrash, J.M., 2012. Expression of the Aldo-Ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in Human Cancers. *Frontiers in pharmacology*, 3, p.104. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3368246&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Larroy, C. et al., 2002. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. *The Biochemical journal*, 361, pp.163–172.
- Li, X., Yang R., Ma M. et al., 2015. A novel aldehyde reductase encoded by YML131W from *saccharomyces cerevisiae* confers tolerance to furfural derived from biomass conversion. *Bioenerg. Res.* 8:119-129).
- Magonet, E. et al., 1992. Importance of the structural zinc atom for the stability of yeast alcohol dehydrogenase. *The Biochemical journal*, 287 (Pt 2), pp.361–365.
- Mindnich, R.D. & Penning, T.M., 2009. Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation. *Human genomics*, 3(4), pp.362–70. Available at: <http://www.humgenomics.com/content/3/4/362>.
- Mithieux, S.M. & Weiss, A.S., 1995. Tandem integration of multiple ILV5 copies and elevated transcription in polyploid yeast. *Yeast*, 11, pp.311–316.
- Monti, D. et al., 2011. Redox reactions catalyzed by isolated enzymes. *Chemical Reviews*, 111, pp.4111–4140.
- Morgan, D.L. et al., 2012. Bronchial and bronchiolar fibrosis in rats exposed to 2,3-pentanedione vapors: implications for bronchiolitis obliterans in humans. *Toxicologic pathology*, 40(3), pp.448–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22215510>.
- Nordling, E., Jörnvall, H. & Persson, B., 2002. Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). *European Journal of Biochemistry*, 269(17),

pp.4267–4276. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1033.2002.03114.x>.

- O'Brien, P.J. & Herschlag, D., 1999. Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chemistry & biology*, 6(4), pp.R91–R105. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552199800337>.
- Oka, A., Sugisaki, H. & Takanami, M., 1981. Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *Journal of molecular biology*, 147, pp.217–226.
- Oya, T. et al., 1999. Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *The Journal of biological chemistry*, 274(26), pp.18492–502. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10373458>.
- Peralba, J.M. et al., 1999. Structural and enzymatic properties of a gastric NADP(H)-dependent and retinal-active alcohol dehydrogenase. *The Journal of biological chemistry*, 274(37), pp.26021–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473548>.
- Persson, B., Zigler, J.S. & Jörnvall, H., 1994. A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Sub-lines including zeta-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductase enoyl reductases, VAT-1 and other proteins. *European journal of biochemistry / FEBS*, 226(1), pp.15–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7957243>.
- Petrash, J.M. et al., 2001. Functional genomic studies of aldo-keto reductases. In *Chemico-Biological Interactions*. pp. 673–683.
- Raj, S.B., Ramaswamy, S. & Plapp, B. V, 2014. Yeast alcohol dehydrogenase structure and catalysis. *Biochemistry*, 53(36), pp.5791–803. Available at: http://www.researchgate.net/publication/265057183_Yeast_Alcohol_Dehydrogenase_Structure_and_Catalysis.
- Reid, M. & Fewson, C., 1994. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Critical reviews in microbiology*.
- Richter-Ruoff, B., 1994. Degradation of the yeast MAT² transcriptional regulator is mediated by the proteasome. *FEBS Letters*, 354, pp.50–52.
- Riveros-Rosas, H. et al., 2003. Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *European Journal of Biochemistry*, 270, pp.3309–3334.
- Riveros-Rosas, H. & Julián-Sánchez, A., 2005. Deshidrogenasas/reductasas de cadena media: un mismo andamio para múltiples funciones. *Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.* Available at: http://www.smb.org.mx/smb-anterior/Memorias_Bioener2005/Posters/C01A.pdf.

- Romano, P. et al., 1996. Determination of 2,3-butanediol in high and low acetoin producers of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts by automated multiple development (AMD). *Letters in applied microbiology*, 22(4), pp.299–302. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8934790>
- Sambrook, J. & W Russell, D., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, p.999.
- Samuel, D., 1996. Investigation of Ancient Egyptian Baking and Brewing Methods by Correlative Microscopy. *Science*, pp.237:488–490. Available at: <http://www.ancientgrains.org/samuel1996science.pdf>.
- Scherrer, T. et al., 2010. A screen for RNA-binding proteins in yeast indicates dual functions for many enzymes. *PLoS ONE*, 5.
- Schirwitz, K., Schmidt, A. & Lamzin, V.S., 2007. High-resolution structures of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Protein science*: a publication of the Protein Society, 16(6), pp.1146–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2206666&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sponholz, W.R., Dittrich, H.H. & Muno, H. 1993. Diols in wine. *Viticultural and Enological Science* 49, 23-26
- Stewart, G.G. & Russell, I., 1986. One hundred years of yeast research and development in the brewing industry. *Journal of the Institute of Brewing*, 92(6), pp.537–558. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04453.x>.
- Storici, F., Lewis, L.K. & Resnick, M.A., 2001. In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nature biotechnology*, 19, pp.773–776.
- Träff, K.L. et al., 2001. Deletion of the GRE3 Aldose Reductase Gene and Its Influence on Xylose Metabolism in Recombinant Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Expressing the xylA and XKS1 Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, pp.5668–5674.
- Tsvetanova, N.G. et al., 2010. Proteome-wide search reveals unexpected RNA-binding proteins in *saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 5, pp.1–12.
- Turner, N.J., 2003. Controlling chirality. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), pp.401–406. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166903000934>.
- Valencia, E. et al., 2004. Apo and Holo structures of an NADPH-dependent cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular biology*, 341(4), pp.1049–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289102>.

- Visser, W. et al., 1995. Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, pp.243–253.
- Wills, C. & Jornvall, H., 1979. The Two Major Isozymes of Yeast Alcohol Dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, 99(2), pp.323–332. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1979.tb13260.x>.
- Wills, M. & Hannedouche, J., 2002. New methodology for the asymmetric reduction of ketones. *Current opinion in drug discovery & development*, 5, pp.881–891.
- Wilson, D.K. et al., 2003. The xylose reductase (AKR2B5) structure: Homology and divergence from other aldo-keto reductases and opportunities for protein engineering. In *Chemico-Biological Interactions*. pp. 515–521.
- Winston, F., Dollard, C. & Ricupero-Hovasse, S.L., 1995. Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast (Chichester, England)*, 11(1), pp.53–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7762301>.
- Wolf, Y.I., Grishin, N. V & Koonin, E. V, 2000. Estimating the number of protein folds and families from complete genome data. *Journal of molecular biology*, 299(4), pp.897–905. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843846>.
- Woodyer, R., van der Donk, W.A. & Zhao, H., 2006. Optimizing a biocatalyst for improved NAD(P)H regeneration: directed evolution of phosphite dehydrogenase. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 9(4), pp.237–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16724915>.
- Zeng, A.P. & Sabra, W., 2011. Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, pp.749–757.
- Zhang, L. et al., 2013. Inhibitor selectivity between aldo-keto reductase superfamily members AKR1B10 and AKR1B1: Role of Trp112 (Trp111). *FEBS Letters*, 587, pp.3681–3686.



Biocatalytic production of alpha-hydroxy ketones and vicinal diols by yeast and human aldo–keto reductases

Eduard Calam, Sergio Porté, M. Rosario Fernández, Jaume Farrés, Xavier Parés, Josep A. Biosca*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 4 January 2013

Keyword:

Aldo-keto reductases

α -hydroxy ketones and diols

Stereoselectivity of yeast and human AKRs

ABSTRACT

The α -hydroxy ketones are used as building blocks for compounds of pharmaceutical interest (such as antidepressants, HIV-protease inhibitors and antitumorals). They can be obtained by the action of enzymes or whole cells on selected substrates, such as diketones. We have studied the enantiospecificities of several fungal (AKR3C1, AKR5F and AKR5G) and human (AKR1B1 and AKR1B10) aldo–keto reductases in the production of α -hydroxy ketones and diols from vicinal diketones. The reactions have been carried out with pure enzymes and with an NADPH-regenerating system consisting of glucose-6-phosphate and glucose-6-phosphate dehydrogenase. To ascertain the regio and stereoselectivity of the reduction reactions catalyzed by the AKRs, we have separated and characterized the reaction products by means of a gas chromatograph equipped with a chiral column and coupled to a mass spectrometer as a detector. According to the regioselectivity and stereoselectivity, the AKRs studied can be divided in two groups: one of them showed preference for the reduction of the proximal keto group, resulting in the *S*-enantiomer of the corresponding α -hydroxy ketones. The other group favored the reduction of the distal keto group and yielded the corresponding *R*-enantiomer. Three of the AKRs used (AKR1B1, AKR1B10 and AKR3C1) could produce 2,3-butanediol from acetoin. We have explored the structure/function relationships in the reactivity between several yeast and human AKRs and various diketones and acetoin. In addition, we have demonstrated the utility of these AKRs in the synthesis of selected α -hydroxy ketones and diols.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The Brenda database (www.brenda-enzymes.org) lists 560 different oxidoreductase activities that are carried out by more than 300 different proteins in *Saccharomyces cerevisiae* (SGD, www.yeastgenome.org). Ten of these enzymes belong to the aldo–keto reductase (AKR, www.med.upenn.edu/akr) superfamily, namely AKR2B6 (Gre3p), AKR3A1 (Gcy1p), AKR3A2 (Ypr1p), AKR3C1 (Ara1p), AKR5F (Yjr096p), AKR5G (Ydl124p), AKR9B1 (Aad14p), AKR9B2 (Aad3p), AKR9B3 (Aad4p) and AKR9B4 (Aad10p) [1,2]. The AKRs have been identified in many organisms, prokaryotes and eukaryotes, and are active towards a vast range of substrates, such as aldehydes, ketones, monosaccharides and steroids. Based on their sequence identity, AKRs fall into 15 different families (AKR1–AKR15) where some of them contain multiple subfamilies (e.g., AKR1A–AKR1E) [3]. Most AKRs are NADPH-dependent carbonyl reductases involved in drug detoxification and xenobiotic metabolism. In yeast, they have been implicated in several physiological roles such as oxidative defense and

transcriptional regulation [4,5], and in xylose, arabinose and 2,3-butanediol metabolism [6,7]. Moreover, in a recent proteome-wide search, AKR3A1 and AKR5G have been identified as RNA-binding proteins [8]. Although much interest behind the study of AKRs relies on their implication in the development of human diseases, there is also a considerable interest in their use as biocatalysts. Thus, chiral alcohols obtained from the stereoselective reduction of carbonyl compounds are used as building blocks in the synthesis of antitumor agents, such as taxol [9], antidepressants and inhibitors of amyloid- β protein production [10]. Biotechnological applications of AKRs have been described, such as the conversion of xylose to ethanol [11,12] and the enantioselective reduction of prochiral carbonyl groups [13]. Consequently, these enzymes have been screened by several research groups with the aim to find new synthetic routes towards intermediates for the production of fine chemicals and pharmaceuticals [14–16].

In the present work we have studied the biotechnological potential of purified AKRs from human (AKR1B1 and AKR1B10) and yeast (AKR3C1, AKR5F and AKR5G), by characterizing the α -hydroxy ketones and diols produced in the reduction of several vicinal diketones and determining the steady-state kinetic parameters of these reactions.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 5813070; fax: +34 93 5811264.

E-mail address: josep.biosca@uab.es (J.A. Biosca).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Restriction enzymes, T4 DNA ligase, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase and the cocktail of protease inhibitors (EDTA-free) were obtained from Roche. KOD DNA polymerase was purchased from Merck. DNA oligomers were synthesized and purified by Sigma–Genosys. Chemicals were purchased from Fluka, Aldrich or Sigma and were of the highest available quality.

2.2. Yeast and bacterial strains, and molecular biology techniques

Escherichia coli XL-1 blue (Stratagene) was used for cloning experiments and was grown at 37 °C in Luria–Bertani medium supplemented with 50 µg/ml ampicillin to select for the desired plasmid constructs. *S. cerevisiae* strains were derived from the Adh deficient strain WV36-405 (*MATa*, *ura3-52*, *trp1*, *adh1Δ*, *adh2Δ*, *adh3*, *adh4::TRP1*) constructed by Dr. Wolfgang Vogel (Neuherberg, Germany). To avoid interfering reactions in the reduction of diketones, we used WV36-405 *bdh1::kanMX4*, *ara1::natMX4*, as a recipient strain to over-express the yeast AKRs.

Plasmid pYES2 (Invitrogen) containing the *URA3* gene as a selectable marker was used to overexpress the *AKR* genes in the presence of galactose. All DNA manipulations were performed under standard conditions as described [17]. The oligonucleotides ARA1- Fw: 5' CCG GAT CCA TGT CTT CTT CAG TAG CC 3' containing a *Bam*HI site (underlined) and ARA1- Rv: 5' CTA GTC TAG AAA AGT GAA AAT AAA GTC G 3' with an *Xba*I site were used to amplify *ARA1* (*AKR3C1*) by KOD DNA polymerase in a PCR. The amplified fragment and the pYES2 vector were digested with *Bam*HI and *Xba*I and the recombinant construct was introduced into yeast by the lithium acetate method [18], selecting the transformants on SC-Ura medium. The *YDL124W* (*AKR5G*) gene was amplified with the following oligonucleotides: *YDL124-fw*: 5' CGC AAG CTT CAG ATG TCA TTT CAC CAA CAG TTC TTT ACC 3' and *YDL124-his-rv*: 5' GCC GGA ICC TTA ATG ATG ATG ATG ATG TAC TTT TTG AGC AGC GTA GTT GTA TTT ACC G 3'. To amplify *YJR096W* (*AKR5F*), we used the following oligonucleotides: *YJR096-fw*: 5' CGC AAG CTT AAC ATG GTT CCT AAG TTT TAC AAA CTT TCA AAC GG 3' and *YJR096-his-rv*: 5' GCC GGA ICC TTA ATG ATG ATG ATG ATG TGG CGC GTC TGT GCA TTC CC 3'. The oligonucleotides used to hybridize to the 3' ends of *YDL124W* and *YJR096W* were designed to add six His residues at the carboxyl ends of the corresponding proteins to facilitate their purification. Both genes were cloned in the shuttle vector pYES2 and the resulting constructs were used to transform WV36-405 *bdh1::kanMX4*, *ara1::natMX4* to uracil prototrophy. The correct constructs were checked by sequencing.

2.3. Purification of yeast *AKR3C1*, *AKR5G(His)₆* and *AKR5F(His)₆*. Determination of *Mr*

AKR3C1 (*Ara1p*) was purified from a culture of WV36-405 *bdh1::kanMX4*, *ara1::natMX4* [pYES2-*ARA1*] grown in SC-Ura plus 2% (w/v) galactose and collected at the end of the logarithmic phase. A total yeast extract was obtained by disrupting the cells with glass beads in a Bead Beater from Biospec (Bartlesville, OK) in 50 mM Tris–Cl, 1 mM EDTA and 1 mM DTT, pH 7.4 (buffer A), containing protease inhibitors, followed by centrifugation at 16,000g. The supernatant was loaded onto a DEAE-Sepharose (2.5 × 10 cm) column, washed with buffer A and eluted with a 100-mL NaCl gradient (0–0.5 M) in buffer A. The fractions with diacetyl activity were pooled and loaded onto an Affi-Gel Blue

(2.5 × 5 cm) column which was washed extensively with buffer A. *AKR3C1* was eluted with a 100-mL NaCl gradient (0–0.75 M).

AKR5G(His)₆ and *AKR5F(His)₆* were purified from yeast cultures WV36-405 *bdh1::kanMX4*, *ara1::natMX4* [pYES2-*YDL124(His)₆*] and WV36-405 *bdh1::kanMX4*, *ara1::natMX4* [pYES2-*YJR096(His)₆*] grown until the end of their logarithmic phase in SC-Ura plus 2% galactose. Each yeast pellet was collected and solubilized with detergent Y-Per (Pierce) containing protease inhibitors. The insoluble debris was removed by centrifugation at 10,000g. The clear supernatant was loaded into a Ni²⁺-NTA metal affinity column (GE Healthcare) which was extensively washed with 50 mM sodium phosphate, pH 7.4, 150 mM NaCl and 20 mM imidazole. *AKR5G(His)₆* and *AKR5F(His)₆* were eluted with 0.5 M imidazole. The active fractions were pooled and loaded onto a Red-Sepharose (Sigma) column that was washed with 33 mM sodium phosphate pH 7.0. The proteins were eluted with a 100-mL NaCl gradient (0–5 M) in sodium phosphate, pH 7.0. The active fractions were loaded onto a Hi-load (26/60) SuperDex 200 prep grade column and eluted with 33 mM sodium phosphate, pH 7.0. The *Mr* of the purified yeast enzymes were determined by gel filtration

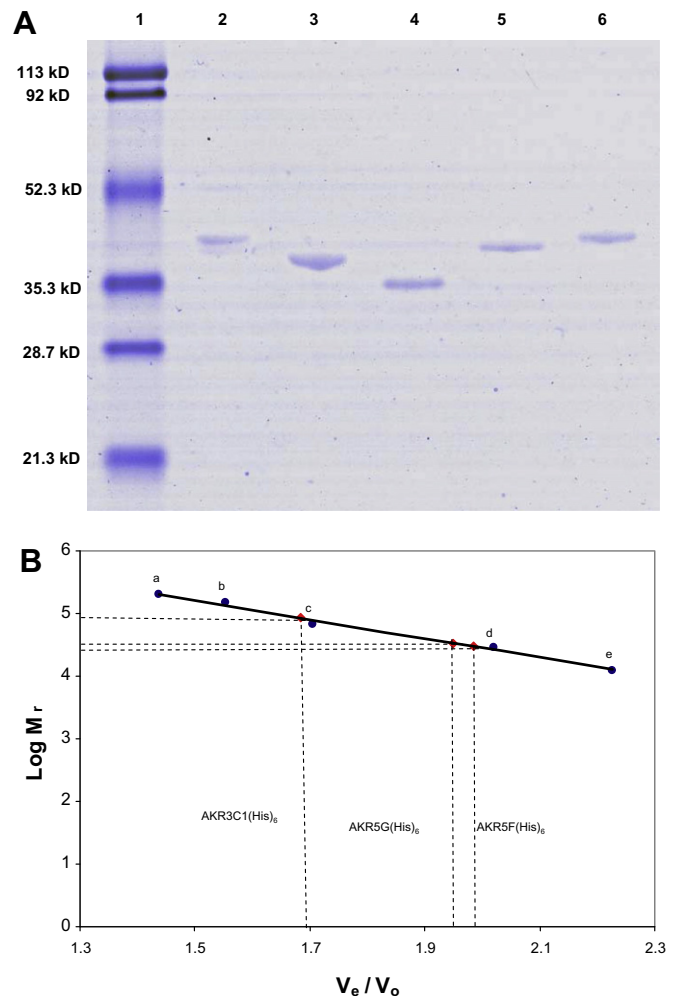


Fig. 1. Analysis of purified yeast and human AKRs. (A) 12% SDS–PAGE of purified AKRs (2 µg). Lane 1: Mr. markers, Lane 2: *AKR3C1(His)₆*, Lane 3: *AKR5G(His)₆*, Lane 4: *AKR5F(His)₆*, Lane 5: *(His)₁₀AKR1B1* and Lane 6: *(His)₁₀AKR1B10*. (B) Size-exclusion chromatography on a SuperDex 200 column connected to an HPLC system. The Mr. standards used were (a) β-amylase, 200,000, (b) yeast alcohol dehydrogenase, 150,000, (c) bovine serum albumin, 66,000, (d) carbonic anhydrase, 29,000 and (e) cytochrome c, 12,400.

Table 1
Kinetic parameters of yeast and human AKRs towards diacetyl.

	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)
AKR3C1 (Ara1p)	8.8	5.4	1600
AKR5F (Yjr096p)	NS	NS	^a 25
AKR5G (Ydl124p)	26	1.2	22000
AKR1B1	0.39	0.11	3500
AKR1B10	4.3	0.54	8000

NS: The Michaelis–Menten curve did not show saturation up to 600 mM diacetyl.

^a The k_{cat}/K_M value was calculated from the slope of the curve at diacetyl concentrations up to 100 mM. The [NADPH] was kept at 0.2 mM.

Table 2
Kinetic parameters of yeast AKR3C1 (Ara1p) towards diketones.

	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)
2,3-pentanedione	6.4	2.2	2900
2,3-hexanedione	6.3	2.1	3000
3,4-hexanedione	3.1	19	160

The [NADPH] was kept at 0.2 mM.

Table 3
Relative activities of yeast and human AKRs towards vicinal diketones.

	AKR3C1 (Ara1p)	AKR5F (Yjr096p)	AKR5G (Ydl124p)	AKR1B1	AKR1B10
2,3-pentanedione	73	78	20	49	27
2,3-hexanedione	72	110	20	15	18
3,4-hexanedione	35	48	31	24	13

The percentage activities were calculated by comparing the specific activities at 100 mM of each diketone and 0.2 mM NADPH, taking the respective specific activity towards diacetyl as 100%.

chromatography on the SuperDex 200 column calibrated with standard Mr markers obtained from Sigma.

2.4. Expression and purification of human AKR1B enzymes

AKR1B1 and AKR1B10 were purified as described previously for AKR1B10 [19]. Briefly, the *E. coli* BL21 strain transformed with the plasmid pET16b, encoding each protein with an N-terminal (His)₁₀ tag, was grown in 2 × YT medium at 23 °C for 8 h. Protein expression was induced by the addition of 1 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG, Amersham Biosciences). Proteins were purified using a Ni²⁺-NTA metal affinity column (GE Healthcare). The enzymes were eluted by a 0.06–1.0 M imidazole gradient in 50 mM Tris–HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0. Fractions containing AKR were collected and dialyzed twice against 10 mM sodium phosphate, 1 mM EDTA, pH 8.0.

2.5. Enzymatic activities and chemical transformations

Enzyme activities were determined spectrophotometrically by measuring the change of absorbance at 340 nm and 25 °C, corresponding to the oxidation of NADPH ($\epsilon_{340} = 6220 M^{-1} cm^{-1}$). One unit of activity (U) corresponds to 1 μmol of NADP⁺ formed per min. The specific activities were measured in 33 mM sodium phosphate, pH 7.0, in the presence of 100 mM diacetyl and 0.2 mM NADPH. Kinetic constants were obtained with the non-linear regression (Michaelis–Menten Equation) program Graft 5.0 (Erithacus Software Ltd, Horley, UK). The standard errors of the fits were less than 10% of the values. The concentration of enzymes (for calculation of k_{cat} values) was determined by a commercial Bradford reagent, according to manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) and using bovine serum albumin as standard. The

Table 4
Stereoselectivity of yeast and human AKRs in the reduction of vicinal diketones.

Substrate	Yeast AKR		Human AKR	
	AKR3C1	AKR5G	AKR1B1	AKR1B10
Diacetyl	(S)-Acetoin (>97%)	(R)-Acetoin (>97%)	(S)-Acetoin (>98%)	(S)-Acetoin (>98%)
2,3-Pentanedione	(S)-2-hydroxy-3-pentanone (>99%)	(R)-3-hydroxy-2-pentanone (>98%)	(S)-2-hydroxy-3-pentanone (>99%)	(S)-2-hydroxy-3-pentanone (>99%)
2,3-Hexanedione	(S)-2-hydroxy-3-hexanone (>99%)	(R)-2-hydroxy-3-one (22%)	(S)-2-hydroxy-3-hexanone (>98%)	(S)-2-hydroxy-3-hexanone (>97%)
3,4-Hexanedione	(S)-4-hydroxy-3-hexanone (>96%)	(R)-3-hydroxy-2-one (78%)	(S)-4-hydroxy-3-hexanone (>99%)	(S)-4-hydroxy-3-hexanone (>99%)
(R,S)-Acetoin	(S,S)-2,3-butanediol (58%) (meso)-2,3-butanediol (42%)	L.A.	(S,S)-3,4-hexanediol (S,S)-2,3-butanediol (30%) (meso)-2,3-butanediol (70%)	(S,S)-2,3-butanediol 26% (R,R)-2,3-butanediol (16%) (meso)-2,3-butanediol (58%)

The major reaction products are indicated with their percentage abundance at the end of the reaction. Hydroxyketone products are displayed at the top, while diol products are shown at the bottom of the table. L.A., the activity towards acetoin was <5% of the activity towards diacetyl.

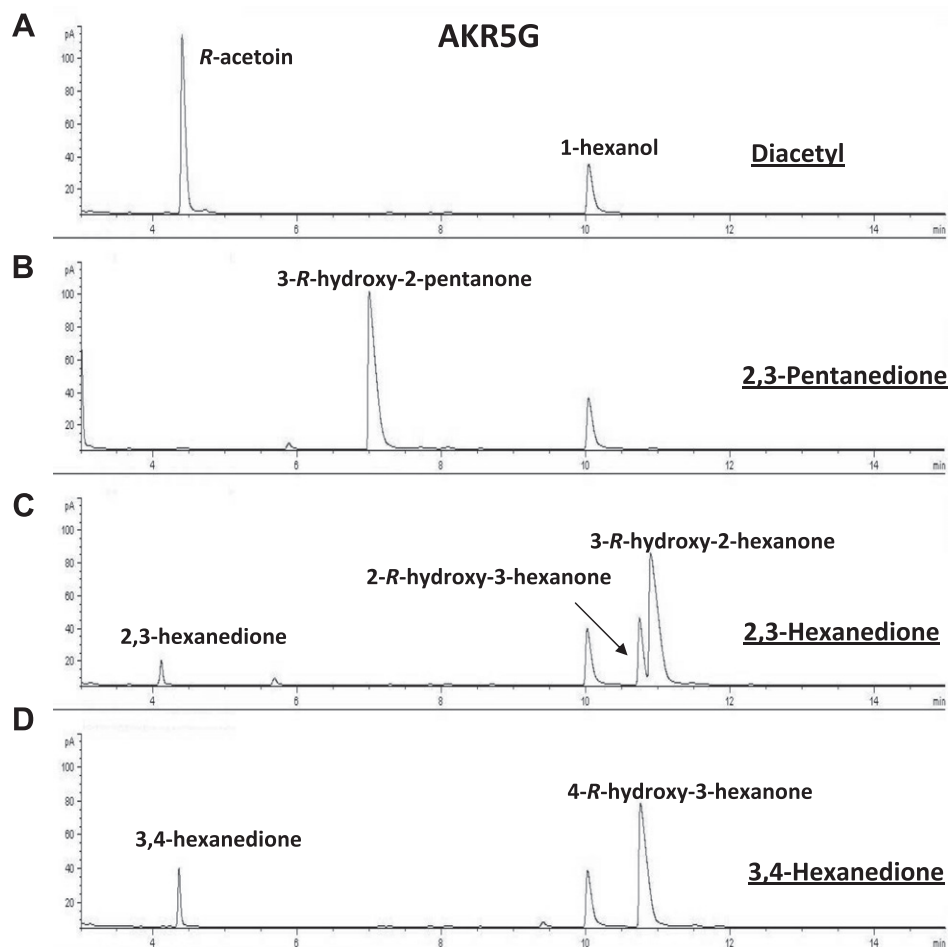


Fig. 2. Gas-chromatography analysis of AKR5G reaction products from vicinal diketones. Elution profiles for the reactions containing 50 mM substrate, 1 mM NADPH in 33 mM sodium phosphate, pH 7, and an NADPH-regenerating system, containing 100 mM glucose-6-phosphate and 3 U glucose-6-phosphate dehydrogenase. The reaction mixtures contained 8 mM 1-hexanol as an internal standard. A: diacetyl, B: 2,3-pentanedione, C: 2,3-hexanedione, D: 3,4-hexanedione.

chemical transformations of the diketones in α -hydroxy ketones and diols were carried out through overnight reactions prepared in 2-mL tubes from Sarstedt with continuous agitation at room temperature. The initial composition of the reactions was 50 mM diketone (diacetyl, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione or 3,4-hexanedione), 1 mM NADPH in 33 mM sodium phosphate, pH 7.0, and an NADPH-regenerating system containing 100 mM glucose-6-phosphate and 3 U glucose-6-phosphate dehydrogenase. The reaction mixtures contained approximately 3 U of yeast AKR and 0.2 U of human enzymes (measured with 100 mM diacetyl and 0.2 mM NADPH).

2.6. Analytical methods

The reaction mixtures were extracted with chloroform as previously described [20], to recover the α -hydroxy ketones and diols, together with an internal standard (1-hexanol). The different stereoisomers were resolved on a chiral column Supelco β -DEX™120, 30 m length, 0.25 mm inner diameter, coupled to a Hewlett–Packard gas chromatograph equipped with a mass spectrophotometer as a detector, by using conditions described previously [21]. The identity of the products was verified by known standards (when available) and by mass spectrometry. The stereoisomer identity of the products was elucidated by comparison with the products obtained under the same conditions with yeast butanediol dehydrogenase (Bdh1p), known to yield the corresponding *R*-stereoisomers (unpublished results).

drogenase (Bdh1p), known to yield the corresponding *R*-stereoisomers (unpublished results).

3. Results and discussion

3.1. Purification of yeast and human AKRs. Mr of the yeast AKRs

Yeast AKR3C1 (Ara1p) was purified from the crude extract of *S. cerevisiae* cells via two chromatographic procedures, namely DEAE-Sepharose and an affinity (Affi-Gel Blue) column. The final specific activity in the presence of 100 mM diacetyl and 0.2 mM NADPH was 14.7 U/mg. Yeast AKR5F (Yjr096p) and AKR5G (Ydl124p) were expressed with a (His)₆ tag at their carboxyl termini and purified by Ni²⁺-NTA chromatography, followed by an affinity (Red-Sepharose) and gel-filtration chromatography. The final specific activities in the presence of 100 mM diacetyl and 0.2 mM NADPH were 4.7 U/mg for AKR5F and 44 U/mg for AKR5G. Human AKR1B1 and AKR1B10 were purified with a (His)₁₀ tag at their amino termini from *E. coli* by Ni²⁺-NTA chromatography and their final specific activities under the conditions described above were 0.6 U/mg and 6.8 U/mg, respectively. All preparations gave essentially a single band on an SDS-PAGE (Fig. 1A), except AKR3C1 that showed a main band and a faint lower Mr band, which was already reported as a naturally occurring degradation product at its N-terminus [23]. The pure proteins were loaded on the SuperDex gel filtration

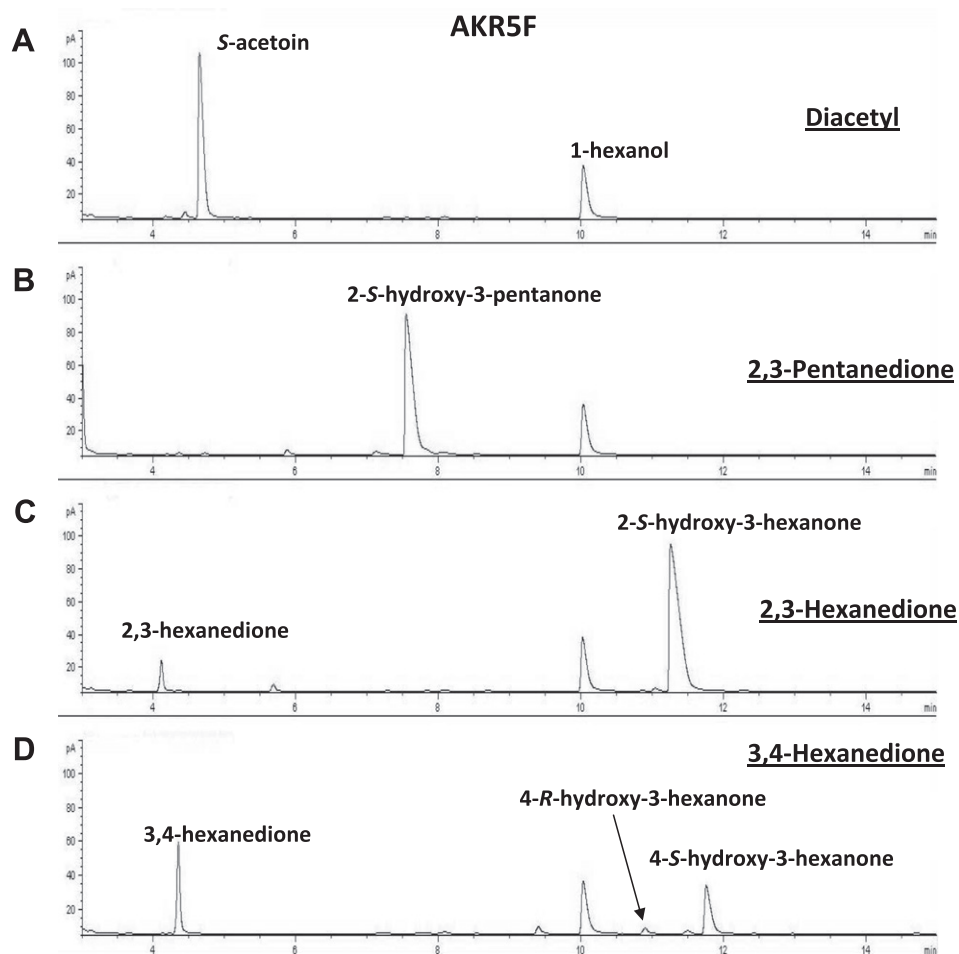


Fig. 3. Gas-chromatography analysis of AKR5F reaction products from vicinal diketones. Elution profiles for the reactions under the same conditions as described in Fig. 2 legend. A: diacetyl, B: 2,3-pentanedione, C: 2,3-hexanedione, D: 3,4-hexanedione.

column and yielded the following Mr estimates: 85,000 for AKR3C1, 30,000 for AKR5F and 33,000 for AKR5G. Thus, AKR3C1 would be a homodimer (in agreement with Amako et al. [23]) and AKR5G and AKR5F monomers. While AKR5G has already been described as a monomer [22], to our knowledge this would be the first report on AKR5F as being a monomer.

3.2. Substrate specificity and steady-state kinetic parameters

To assess the efficiency of the human and yeast AKRs in the reduction of diketones, we determined their kinetic parameters towards the reduction of diacetyl in the presence of 0.2 mM NADPH (Table 1). The kinetic constants determined here for AKR3C1 towards diacetyl (Table 1) and 2,3-pentanedione (Table 2) are similar to those previously reported [24]. As can be seen in Table 1, the most efficient AKRs in the reduction of diacetyl are AKR5G and AKR1B10, while AKR5F did not show saturation kinetics with this substrate. Remarkably, the specific activity of AKR5F towards diacetyl was significantly lower than those of the other yeast AKRs: 3-fold lower than that of AKR3C1 and 10-fold lower than that of AKR5G. AKR3C1 presented a slightly higher preference for asymmetrical ketones, such as 2,3-pentanedione and 2,3-hexanedione, rather than for symmetrical ones such as diacetyl or 3,4-hexanedione (Table 2). All the AKRs studied, except AKR5F, displayed their highest specific activity towards the smallest substrate, diacetyl (Table 3). In fact, the specific activity shown by AKR5F towards 2,3-hexanedione was similar to that determined for diacetyl.

The kinetic constants for AKR5G towards various α -keto amide substrates have been reported by Ishihara et al. [22]. They measured a k_{cat} value of 114 s^{-1} and a k_{cat}/K_M of $7.3 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ for *m*-chlorobenzoylformamide, the best of the substrates studied. They reported similar values for the *o*-chlorobenzoylformamide and *p*-chlorobenzoylformamide isomers. These values, significantly higher than those presented in our study, suggest that AKR5G shows higher specificity towards substrates with an aromatic side chain flanking the keto group.

All the AKRs here studied were NADPH-dependent, since the specific activities measured in the presence of 0.2 mM NADH were less than 1% of those determined with NADPH, under the same conditions.

We tested the influence of the histidine tag in the steady-state kinetic parameters and enantiospecificities of the AKRs, by determining the k_{cat} , K_M and enantiospecificity of AKR3C1 and AKR3C1(His)₆ towards diacetyl. The main difference was in their k_{cat} values, being the k_{cat} of AKR3C1 approximately twice the value of AKR3C1(His)₆. However, their K_M values were identical within experimental error and their stereospecificities were the same.

3.3. Regioselectivity and stereoselectivity

The stereoselectivity of the AKRs in the reduction of diketones was investigated by the use of a chiral column coupled to a mass spectrometer. The presence of a NADPH-regenerating system allowed accumulation of product in amounts suitable for determining

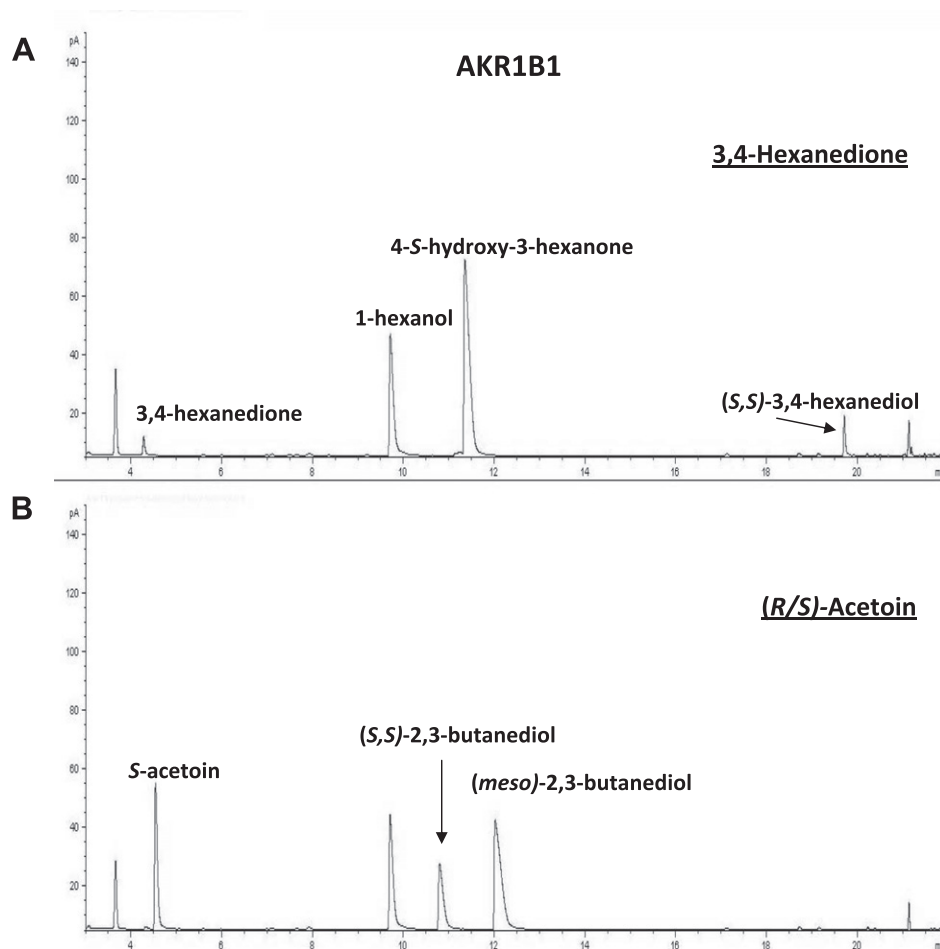


Fig. 4. Gas-chromatography analysis of AKR1B1 reaction products from 3,4-hexanedione and racemic acetoin. Elution profiles for the reactions under the same conditions described in Fig. 2 legend. A: 3,4-hexanedione, B: (R/S)-acetoin.

the *regio* and stereoselectivity of the reactions. The AKRs studied showed two completely different behaviors in the reduction of diketones. One group represented by yeast AKR3C1 and AKR5F, and human AKR1B1 and AKR1B10, yielded essentially (more than 96%) α -hydroxy ketones in *S* configuration (Table 4 and Fig. 6). Moreover, all these enzymes showed regioselectivity in reducing the proximal keto group (closer to the end of the molecule). Thus, they reduced preferentially the 2-oxo group of 2,3-pentanedione and 2,3-hexanedione, yielding (*S*)-2-hydroxy pentanone and (*S*)-2-hydroxy hexanone respectively (Fig. 3). However, one exception to this general behavior was observed in the reduction of 3,4-hexanedione: AKR5F yielded 91% of the expected (*S*)-4-hydroxy-3-hexanone, but 9% of (*R*)-4-hydroxy-3-hexanone. This made the enantiomeric excess towards the *S* stereoisomer for AKR5F to be the lowest among the enzymes and reactions from this group (Table 4). The other group, represented by AKR5G, gave the α -hydroxy ketones in *R* configuration. The enzyme showed strict regioselectivity in the reduction of 2,3-pentanedione, where the keto group reduced by the enzyme was the 3-oxo (Fig. 2B), yielding more than 98% of (*R*)-3-hydroxy-pentanone. However, AKR5G produced 22% of (*R*)-2-hydroxy-3-hexanone (Fig. 2C), reflecting that in the case of 2,3-hexanedione this enzyme can reduce both keto groups (Table 4 and Fig. 6).

Previous reports described the reactions of diacetyl and 2,3-pentanedione with purified AKR3C1. Thus, van Bergen et al. [24] showed that the products of the reactions were acetoin in the reduction of diacetyl, and hydroxypentanone in the reduction of 2,3-pentanedione. In this last reaction they observed the appear-

ance of two peaks, but they neither elucidated whether the main product was 2-hydroxy-3-pentanone or 3-hydroxy-2-pentanone, nor did they ascertain the stereoisomers produced. In another report, Kaluzna et al. [15] studied the reactions catalyzed by yeast AKRs fused to glutathione *S*-transferase (GST) (expressed in bacteria) on several α -keto esters. Although with different substrates, they also observed that GST-AKR3C1 and GST-AKR5G had opposite enantioselectivities: while GST-AKR3C1 produced ethyl (*S*)-3-hydroxybutanoate, GST-AKR5G produced the corresponding *R* stereoisomer, with ethyl 2-oxobutanoate as a substrate [15]. They also observed that the reaction between GST-AKR5F and ethyl 3-oxobutanoate yielded a mixture of *R* and *S* stereoisomers. These data are qualitatively in accordance with our results, although we obtained a different ratio between the *R* and *S* stereoisomers in the reduction of 3,4-hexanedione. Ishihara et al. [22] used pure AKR5G in the reduction of ethyl 2-oxobutanoate and ethyl 2-oxopentanoate, obtaining in both cases the *R* stereoisomers with an enantiomeric excess >98%. Again, these results agree with ours regarding the stereoselectivity of AKR5G, although the substrates used were not identical. Other studies screening for yeast reductases observed that AKR3C1 in crude homogenate yielded the *S* stereoisomers in the reduction of diacetyl and 2,3-pentanedione [14,25], in agreement with our results with pure enzyme.

Given the fact that AKRs transfer the 4-pro-*R*-hydride from NADPH to the carbonyl substrate [3], the different configurations of the reaction products arising from the same substrates (shown above) indicate different ways of substrate binding to the active

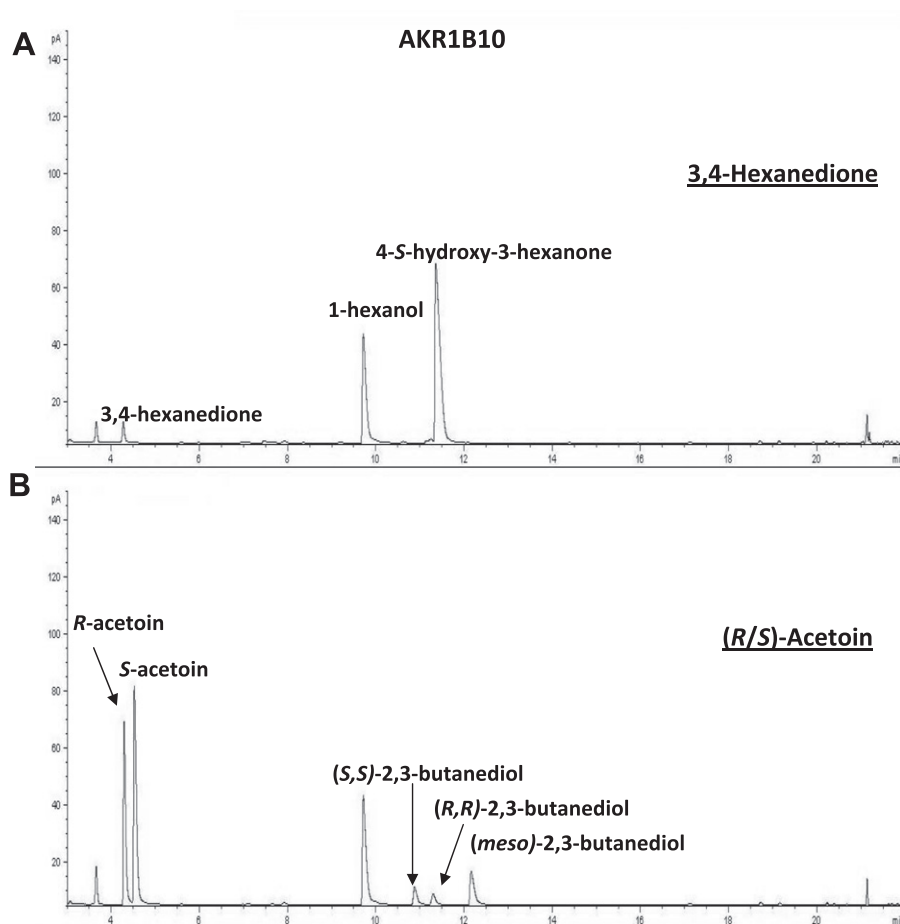


Fig. 5. Gas-chromatography analysis of AKR1B10 reaction products from 3,4-hexanedione and racemic acetoin. Elution profiles for the reactions under the same conditions described in Fig. 2 legend. A: 3,4-hexanedione, B: (R/S)-acetoin.

site. However, since the 3-D structures of the yeast enzymes are not known, it would be difficult to explain the opposite stereoselectivity shown by the two groups of AKRs, as commented above for these substrates.

In a multi sequence alignment containing AKR1B1, AKR2B6, AKR3A1, AKR3A2, AKR3C1, AKR5F and AKR5G, Petrash et al. [26] showed that the catalytic tetrad (Asp-43, Tyr-48, Lys-77 and His-110, numbered according to AKR1B1) was conserved and that the main differences between the human AKR1B1 and the yeast reductases were localized in loops A and B [25]. Thus, AKR1B1, AKR1B10 and AKR3C1 contained a loop A of very similar length, while in AKR5F and AKR5G the loop A was missing. In addition, AKR1B1, AKR1B10, AKR3C1, AKR5F and AKR5G presented a loop B of similar length. Consequently, the presence or absence of any of the loops cannot explain by itself the different stereoselectivities shown by these enzymes. For instance, AKR1B1, AKR1B10, AKR3C1 and AKR5F show the same stereoselectivity in the production of α -hydroxy ketones, but in AKR5F loop A is missing. Moreover AKR5F and AKR5G showed very similar loop lengths, but we here demonstrate that they present different enantiospecificities (Table 4). Alternatively, it is conceivable that the stereoselectivities would depend on the amino acid sequence of the loops. In this regard, Beers et al. [27] showed that single mutations in the loop A from AKR5G provoked a change in the stereoselectivity towards the reduction of 2-chloro-3-phenylpropionic acid ethyl ester.

Previously, it had been reported that AKR1B1 and AKR1B10 could reduce diacetyl [28]. To our knowledge, the current study on human AKR1B1 and AKR1B10 is the first to address systematically the reduction of vicinal diketones and the use of these en-

zymes as biocatalysts. Both enzymes could transform the diketones to the corresponding (*S*)- α -hydroxy ketones (as AKR3C1 and AKR5F) (Table 4), but displaying some distinct features. Thus, although the main product from the reduction of 3,4-hexanedione by AKR1B1 is *S*-4-hydroxy-3-hexanone, AKR1B1 is the only enzyme capable of reducing both keto groups of 3,4-hexanedione yielding (3*S*,4*S*)-3,4-hexanedione (Fig. 4).

We also identified the products obtained by the yeast and human AKRs with acetoin, in the presence of NADPH and an NADPH-regenerating system. Only AKR3C1, AKR1B1 and AKR1B10 were active towards the acetoin racemic mixture, giving in all cases a mixture of 2,3-butanediols (Figs. 4B and 5B). Thus, AKR3C1 [7] and AKR1B1 yielded a mixture of (*meso*)-2,3-butanediol and (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol, while AKR1B10 gave the three stereoisomers, including (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol (Table 4 and Fig. 5). These data can serve to understand the structure/function relationships of AKR1B1 and AKR1B10 towards the binding and reactivity with (*R/S*)-acetoin. Thus, although AKR3C1, AKR1B1 and AKR1B10 can react with (*R*) and (*S*)-acetoin yielding the (*meso*)-2,3-butanediol and (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol, only AKR1B10 could bind (*R*)-acetoin in the correct orientation to produce (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol.

In summary, we have described the use of five members of the AKR superfamily in the synthesis of different α -hydroxy ketones and vicinal diols providing a further example of the use of enzymes as biocatalysts for specific synthesis purposes. Depending on the AKRs used, *R* or *S*-hydroxy ketones have been obtained. Therefore, chirality can be introduced by these enzymes under mild conditions, such as physiological pH and temperature.

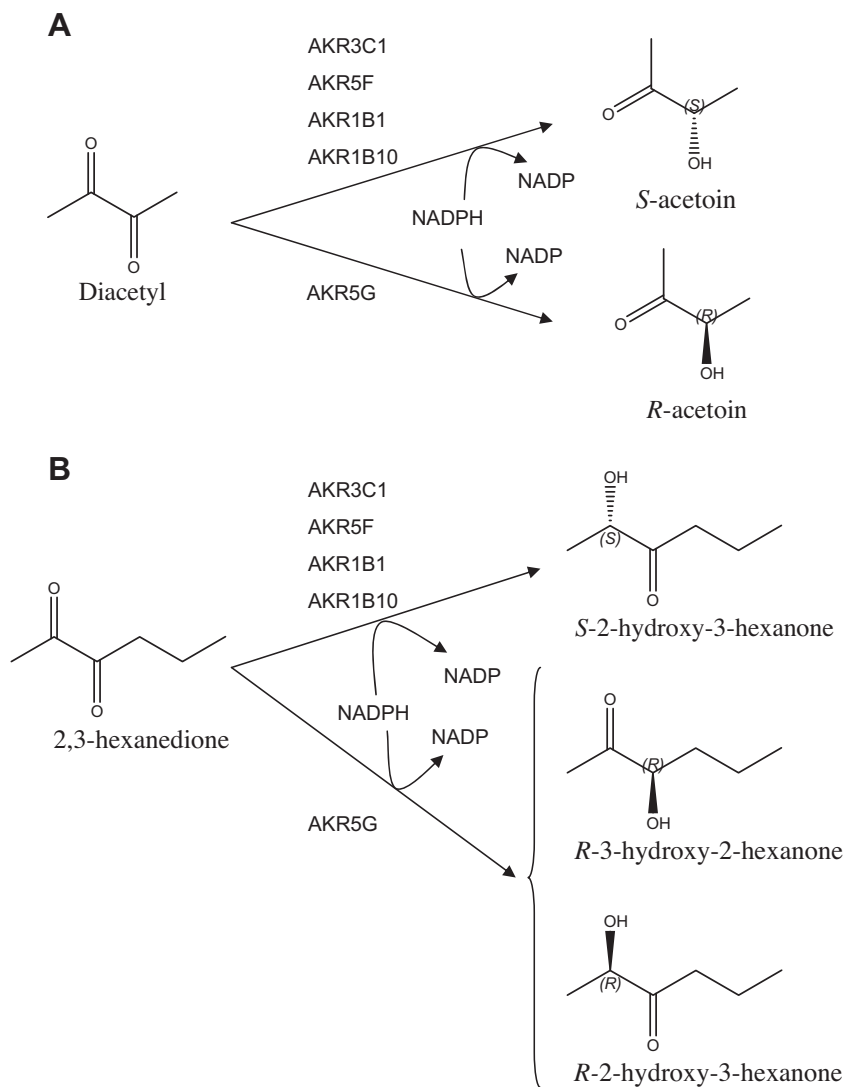


Fig. 6. Chemical structures and associated reactions for diacetyl and 2,3-hexanedione. Products arising from the reduction of dicarbonyls by the yeast and human AKRs. Panel A: diacetyl, B: 2,3-hexanedione.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish Dirección General de Investigación (BIO2007-64659 and BFU2011-24176) and Generalitat de Catalunya (2009 SGR 795).

References

- [1] D. Hyndman, D.R. Bauman, V.V. Heredia, T.M. Penning, The aldo-keto reductase superfamily homepage, *Chem. Biol. Interact.* 143–144 (2003) 621–631.
- [2] E.M. Ellis, Microbial aldo-keto reductases, *FEMS Microbiol. Lett.* 216 (2002) 123–131.
- [3] R.D. Mindnich, T.M. Penning, Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation, *Hum. Genomics* 3 (2009) 362–370.
- [4] Q. Chang, J.M. Petrash, Disruption of aldo-keto reductase genes leads to elevated markers of oxidative stress and inositol auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* 1783 (2008) 237–245.
- [5] K.L. Träff, R.R. Otero Cordero, W.H. van Zyl, B. Hahn-Hägerdal, Deletion of the GRE3 aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the xylA and XKS1 genes, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 5668–5674.
- [6] R. Kratzer, D.K. Wilson, B. Nidetzky, Catalytic mechanism and substrate selectivity of aldo-keto reductases: insights from structure-function studies of *Candida tenuis* xylose reductase, *IUBMB Life* 58 (2006) 499–507.
- [7] E. González, M.R. Fernández, D. Marco, E. Calam, L. Sumoy, X. Parés, S. Dequin, J.A. Biosca, Role of *Saccharomyces cerevisiae* oxidoreductases Bdh1p and Ara1p in the metabolism of acetoin and 2,3-butanediol, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 670–679.
- [8] N.G. Tsevetanova, D.M. Klass, J. Salzman, P.O. Brown, Proteome-wide search reveals unexpected RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLOS one* 5 (2012) 1–12.
- [9] B.D. Feske, I.A. Kaluzna, J.D. Stewart, Enantiodivergent, biocatalytic routes to both taxol side chain antipodes, *J. Org. Chem.* 70 (2005) 9654–9657.
- [10] P. Hoyos, J.V. Sinisterra, F. Molinari, A.R. Alcántara, P. Domínguez de María, Biocatalytic strategies for the asymmetric synthesis of alpha-hydroxy ketones, *Acc. Chem. Res.* 43 (2010) 288–299.
- [11] B. Hahn-Hägerdal, C.F. Wahlbom, M. Gárdonyi, W.H. van Zyl, R.R. Cordero Otero, L.J. Jönsson, Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 73 (2001) 53–84.
- [12] D.K. Wilson, K.L. Kavanagh, M. Klímacek, B. Nidetzky, The xylose reductase (AKR2B5) structure: homology and divergence from other aldo-keto reductases and opportunities for protein engineering, *Chem. Biol. Interact.* 143–144 (2003) 515–521.
- [13] M. Wills, J. Hannedouche, New methodology for the asymmetric reduction of ketones, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5 (2002) 881–891.
- [14] T. Johanson, M. Katz, M.F. Gorwa-Grauslund, Strain engineering for stereoselective bioreduction of dicarbonyl compounds by yeast reductases, *FEMS Yeast Res.* 5 (2005) 513–525.
- [15] I.A. Kaluzna, T. Matsuda, A.K. Sewell, J.D. Stewart, Systematic investigation of *Saccharomyces cerevisiae* enzymes catalyzing carbonyl reductions, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 12827–12832.

- [16] M. Kataoka, K. Kita, M. Wada, Y. Yasohara, J. Hasegawa, S. Shimizu, Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62 (2003) 437–445.
- [17] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [18] H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata, A. Kimura, Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *J. Bacteriol.* 153 (1983) 163–168.
- [19] O. Gallego, O.V. Belyaeva, S. Porté, F.X. Ruiz, A.V. Stetsenko, E.V. Shabrova, N.V. Kostereva, J. Farrés, X. Parés, N.Y. Kedishvili, Comparative functional analysis of human medium-chain dehydrogenases, short-chain dehydrogenases/reductases and aldo–keto reductases with retinoids, *Biochem. J.* 399 (2006) 101–109.
- [20] S. Michnik, J.L. Roustan, F. Remize, P. Barre, S. Dequin, Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase, *Yeast* 3 (1997) 783–793.
- [21] E. González, M.R. Fernández, C. Larroy, L. Solà, M.A. Pericàs, X. Parés, J.A. Biosca, Characterization of a (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* *YAL060W* gene product. Disruption and induction of the gene, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35876–35885.
- [22] K. Ishihara, H. Yamamoto, K. Mitsuhashi, K. Nishikawa, S. Tsuboi, H. Tsuji, N. Nakajima, Purification and characterization of alpha-keto amide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (2004) 2306–2312.
- [23] K. Amako, K. Fujita, C. Iwamoto, M. Sengee, K. Fuchigami, J. Fukumoto, Y. Ogishi, R. Kishimoto, K. Goda, NADP(+)-dependent D-arabinose dehydrogenase shows a limited contribution to erythroascorbic acid biosynthesis and oxidative stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (2006) 3004–3012.
- [24] B. van Bergen, R. Strasser, N. Cyr, J.D. Sheppard, A. Jardim, Alpha, beta-dicarbonyl reduction by *Saccharomyces* D-arabinose dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta* 1760 (2006) 1636–1645.
- [25] M. Katz, B. Hahn-Hägerdal, M.F. Gorwa-Grauslund, Screening of two complementary collections of *Saccharomyces cerevisiae* to identify enzymes involved in stereo-selective reduction of specific carbonyl compounds: an alternative to protein purification, *Enzyme Microb. Technol.* 33 (2003) 163–172.
- [26] J.M. Petrash, B.S. Murthy, M. Young, K. Morris, L. Rikimaru, T.A. Griest, T. Harter, Functional genomic studies of aldo–keto reductases, *Chem. Biol. Interact.* 130–132 (2001) 673–683.
- [27] M. Beers, C. Archer, B.D. Feske, S.C. Mateer, Using biocatalysis to integrate organic chemistry into a molecular biology laboratory course, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 40 (2012) 130–137.
- [28] D. Cao, S.T. Fan, S.S. Chung, Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 11429–11435.

1 **Enantioselective synthesis of vicinal diols by butanediol dehydrogenase:**
2 **from pure protein to permeabilized yeast cells.**

3 Running title: Biotechnological applications of yeast Bdh1p.

4

5

6

7 Eduard Calam, Eva González-Roca¹, M. Rosario Fernández, Sylvie Dequin²,
8 Xavier Parés, Albert Virgili³ and Josep A. Biosca*

9

10

11 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de
12 Barcelona, E-08193 Bellaterra (Barcelona). 1 Present address
13 Autoinflammatory Disease Unit Immunology Service (CDB-IDIBAPS) Hospital
14 Clinic (Barcelona) 2 Laboratoire de Microbiologie et Technologie des
15 Fermentations, INRA-IPV, F-34600 Montpellier, France and 3 Department of
16 Chemistry, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra (Barcelona).

17

18

19 *Correspondence to: Josep A. Biosca, Dept. of Biochemistry and Molecular
20 Biology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193
21 Bellaterra (Barcelona) Spain

22

23 Telefax: 34-93-581 1264

24 Telephone: 34-93-581 3070

25 E-mail: josep.biosca@uab.es

26

27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

Abstract.

Butanediol dehydrogenase (Bdh1p) from *Saccharomyces cerevisiae* belongs to the superfamily of the medium chain dehydrogenases/reductases and converts reversibly *R*-acetoin and *S*-acetoin to (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and *meso*-2,3-butanediol, respectively. It is specific for NAD(H) as a coenzyme and it is the main enzyme involved in the last metabolic step leading to (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol in yeast. In this study, we have used the activity of Bdh1p, in different forms: purified enzyme, yeast extracts, permeabilized yeast cells, and as a fusion protein (with yeast formate dehydrogenase, Fdh1p) to transform several vicinal diketones to the corresponding diols. We have also developed a new variant of the “delitto perfetto” methodology to place *BDH1* under the control of the *GAL1* promoter, resulting in a yeast strain that overexpresses butanediol dehydrogenase and formate dehydrogenase activities in the presence of galactose and regenerates NADH in the presence of formate. While the use of purified Bdh1p allows the synthesis of enantiopure (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol, (2*R*,3*R*)-2,3-pentanediol, (2*R*,3*R*)-2,3-hexanediol and (3*R*,4*R*)-3,4-hexanediol, the use of the engineered strain (as an extract or as permeabilized cells), yields mixtures of the diols. The production of pure diol stereoisomers has also been achieved by means of a chimeric fusion protein combining Fdh1p and Bdh1p. Finally, we have determined the selectivity of Bdh1p towards the oxidation/reduction of the hydroxyl/ketone groups from (2*R*,3*R*)-2,3-pentanediol/2,3-pentanedione and (2*R*,3*R*)-2,3-hexanediol/ 2,3-hexanedione. In conclusion, Bdh1p is an enzyme with biotechnological interest that can be used to synthesize chiral building blocks. A scheme of the favored pathway with the corresponding intermediates is proposed for the Bdh1p reaction.

Introduction

53

54 Biocatalytic transformations using pure enzymes or whole-cell
55 microorganisms offer mild and environmentally benign reaction conditions as
56 opposed to the chemical processes that use harsh conditions and produce
57 residual metals. Several diols, as 1,3-propanediol, 1,2-propanediol, 2,3-
58 butanediol and 1,4-butanediol, are considered platform chemicals because of
59 their many applications in the industry, including the synthesis of special
60 chemicals and their use as precursors of polymers (1). Thus, 2,3-butanediol
61 (2,3-BD) has been used as an antifreeze agent and as a precursor of several
62 compounds, through reactions of dehydration (obtaining methyl ethyl ketone,
63 that can be used as a fuel additive), dehydrogenation (giving flavoring
64 compounds as acetoin and diacetyl), ketalization (yielding a potential gasoline
65 blending agent) and esterification (giving precursors of drugs and plasticizers)
66 (2-3, for recent reviews). Several microbial systems have been optimized (by
67 genetic engineering and by optimization of the fermentation conditions) for the
68 production of 2,3-BD, such as *E.coli* (4), *Klebsiella oxytoca* or *Paenibacillus*
69 *polymyxa* (2). *Saccharomyces cerevisiae* has also been used recently as a
70 producer of 2,3-BD through genetic engineering (5-6).

71 The pure stereoisomers of 2,3-butanediol, (*S,S*)-, (*R,R*)- and *meso*- are
72 useful as auxiliaries and can serve as building blocks in the asymmetric
73 synthesis of chiral compounds with two stereogenic centers (7). Pure (*2R,3R*)-
74 2,3-BD has been obtained recently by metabolic engineering of *E. coli* and *S.*
75 *cerevisiae*, using dextroses as carbon sources, through the introduction of
76 biosynthetic pathways composed of endogenous and foreign genes (8-9).
77 Several classes of oxidoreductases, belonging to the superfamilies of medium

78 chain dehydrogenases/reductases (MDR), aldoketo reductases and short-chain
79 dehydrogenases/reductases have been used in those organisms to convert
80 diacetyl and/or acetoin to 2,3-BD (10-11). A recent biotechnological use for
81 Bdh1p from *Bacillus subtilis* was described by Xiao et al. (2010). They used
82 Bdh1p together with an NAD⁺-regenerating system, formed by NADH oxidase
83 from *Lactobacillus brevis* that regenerates NAD⁺ from NADH by reducing O₂ to
84 H₂O, to produce (3*R*)-acetoin and (3*S*)-acetoin with high enantiomeric excess,
85 from (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and *meso*-2,3-butanediol, respectively.

86 We have previously characterized Bdh1p as an MDR that can reversibly
87 convert *R*-acetoin and *S*-acetoin to (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and *meso*-2,3-
88 butanediol, respectively using NAD(H) as a coenzyme (13). We have also
89 shown that Bdh1p is the main enzyme involved in the last metabolic step
90 leading to (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol in yeast (14). In the present work we have
91 used the activity of Bdh1p in different conditions: (I) purified enzyme, (II) yeast
92 extracts, (III) permeabilized yeast cells and, (IV) as a fusion protein with yeast
93 formate dehydrogenase (Fdh1p), to transform diacetyl, 2,3-pentanedione, 2,3-
94 hexanedione and 3,4-hexanedione to the corresponding diols. By using purified
95 Bdh1p (together with exogenous Fdh to regenerate NADH) we have obtained
96 enantiopure (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol, (2*R*,3*R*)-2,3-pentanediol, (2*R*,3*R*)-2,3-
97 hexanediol and (3*R*,4*R*)-3,4-hexanediol. We have also engineered a yeast
98 strain (by developing a new variant of the “delitto perfetto” methodology (15)
99 that overexpresses Bdh and Fdh activities in the presence of galactose. The
100 use of this engineered strain allowed obtaining several diols from the
101 corresponding diketones in the presence of formate, without the need of a
102 coenzyme-regenerating system. Although the use of yeast extracts or

103 permeabilized cells from this strain did not allow the production of pure
104 stereoisomers, we could separate and identify the hydroxyketones and diols
105 arising from the reduction of the diketones. To allow the production of pure diol
106 stereoisomers and to avoid the need of a coenzyme regenerating system, we
107 have constructed a chimeric fusion protein combining Fdh1p and Bdh1p.
108 Finally, we propose a mechanism to explain the selectivity shown by Bdh1
109 towards the oxidation/reduction of the hydroxyl/ketone groups from (2*R*,3*R*)-2,3-
110 pentanediol/2,3-pentanedione and (2*R*,3*R*)-2,3-hexanediol/ 2,3-hexanedione.

111 **Materials and Methods**

112

113 **Materials.**

114 Restriction enzymes and T4 DNA ligase were from Roche (Basel,
115 Switzerland). Vent and KOD polymerases were from New England Biolabs, Inc.
116 (Beverly, USA) and Merck (Nottingham, United Kingdom) respectively. DNA
117 oligomers were synthesized and purified by Sigma-Genosys (Haverhill, United
118 Kingdom). Chemicals were purchased from Fluka or, Sigma-Aldrich (Saint
119 Louis, USA). *Candida boidinii* formate dehydrogenase was from Sigma-Aldrich.

120

121 **Yeast and bacterial strains.**

122 *Escherichia coli* XL-1 blue (Stratagene, La Jolla, USA) or DH5 α was
123 used for cloning experiments. The *S. cerevisiae* strains used in this study were
124 derived from the wild type FY834 α (*MAT α* , *his3 Δ 200*, *ura3-52*, *leu2 Δ 1*,
125 *lys2 Δ 202*, *trp1 Δ 63*) (16) and from the Adh⁻ strain WV36-405 (*MAT α* , *ura3-52*,
126 *trp1*, *Δ adh1*, *Δ adh2*, *Δ adh3*, *adh4::TRP1*) constructed by Dr. Wolfgang Vogel
127 (Neuherberg, Germany). Mutant strain EG2 (FY834 α *MAT α* *his3 Δ 200* *ura3-52*

128 *leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63 TRP1::bdh1* (13) was used to characterize additional
129 NADH dependent diacetyl reductases. Yeast strains deleted for *bdh1* ($\Delta bdh1$)
130 and/or *ara1* ($\Delta ara1$) were constructed by the one-step gene replacement
131 method (17) with a fragment containing the *kanMX4* and/or *natMX4* (18-19)
132 genes flanked by sequences identical to *BDH1* and/or *ARA1* (14).

133

134 **Plasmids, DNA manipulations, cloning techniques and transformation**
135 **methods.**

136 All DNA manipulations were performed under standard conditions as
137 described (20). *E. coli* plasmid DNA was obtained by using a commercial kit
138 provided by Sigma. The plasmids used to overexpress Bdh1p (pYES2-*BDH1*)
139 and Bdh1p-(His)₆ (pYES2-*BDH1*-6His) have already been described (13-14).
140 The formate dehydrogenase gene (*FDH1*) from *S. cerevisiae* was amplified
141 from yeast genomic DNA in a PCR with the oligos o-FDH-fw and o-FDH-rv
142 (Table 1). The band containing *FDH1* was excised from an agarose gel,
143 digested with *Bam*HI and *Eco*RI and cloned in the pYES2 vector digested with
144 the same enzymes. The construct pYES2-*FDH1* was sequenced to verify that
145 no mutations had been introduced during the PCR. Plasmids pYES2-*BDH1*-
146 6His and pYES2-*FDH1* (see above) were used as starting points to construct
147 the plasmid pYES2-*FDH1*-*BDH1*-6His, expressing the fusion protein containing
148 Fdh1p in its N-terminus and Bdh1-(His)₆p in its C-terminus linked by the
149 heptapeptide (ENLYFQG). The gene coding for the fusion protein was
150 constructed in two steps: firstly, we used the oligonucleotides o-FDH-fw and
151 FPint-Rv (Table 1) together with the plasmid pYES2-*FDH1* as a template, which
152 in a PCR resulted in a fragment containing *FDH1* fused to the sequence coding

153 for the peptide linker (see above). Secondly, the oligos FPint-Fw and bdh1-his
154 together with the plasmid pYES2-*BDH1*-6His as a template, were used to
155 construct by PCR a fragment that contained the sequence coding for Bdh1p-
156 (His)₆ fused to the aforementioned peptide linker. A mixture of these two
157 fragments, containing a complementary region (underlined in the oligos, see
158 Table 1), was used as template in a PCR with the external oligos o-FDH-fw and
159 bdh1-his to obtain the complete gene coding for the fusion protein Fdh1p-
160 Bdh1p(His)₆. The amplified fragment was excised from an agarose gel and
161 cloned in pYES2 digested with *Bam*HI and *Eco*RI. The correctness of the
162 construct was verified by sequencing.

163 The plasmids were introduced into the yeast strains by the lithium
164 acetate method (17), and the transformants were selected on SC-Ura medium
165 supplemented with 2% glucose or galactose (in the case of the Adh⁻ strains).

166

167 **Construction of a yeast strain overexpressing Bdh1p and Fdh1p by self-** 168 **cloning.**

169 A modification of the *delitto perfetto* technique (15) was performed to
170 place *BDH1* under the control of the *GAL1* promoter in its chromosomal *locus*.
171 The promoter and part of the *BDH1* coding region from the yeast strain WV36-
172 405 were deleted with a double marker (consisting of *URA3* from *Kluyveromices*
173 *lactis* fused to *natMX4* from *Streptomyces noursei*) obtained by PCR using the
174 plasmids pUG72 and pAG25 (obtained from Euroscarf) as templates. The
175 oligonucleotides used to amplify the double marker by PCR were Pbdh-ura-fw
176 and Bdh-nat1-rv (Table 1). The linear fragment obtained upon PCR (containing
177 two flanking regions identical to the -520→ -473 and +1→ +48 sequences from

178 *BDH1* and its promoter) was used to transform the yeast strain WV36-405 by
179 the lithium acetate method, and the transformants were selected on YPD agar
180 medium (1% Bacto yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glucose-containing
181 2% agar) supplemented with 100 µg/ml clonNAT (Hans-Knöll Institute für
182 NaturstonForschung, Jena, Germany). Several transformants that grew on
183 clonNAT medium were checked by PCR to verify that the double marker was in
184 the proper place, thus a yeast strain WV36-405 *URA3-NAT1::P_{bdh1}-bdh1* was
185 constructed. One of the transformants was grown in SC-Ura medium and
186 transformed with a recombinogenic linear fragment containing the *GAL1*
187 promoter flanked by the -520→ -473 sequence of the *BDH1* promoter and by
188 the +1→+48 sequence from *BDH1*. This fragment had been obtained in a PCR
189 with the oligos: Pbdh-gal-Fw and Bdh-gal-bis-rv (Table 1) by using pYES2-
190 *BDH1* as a template. Upon transformation by the lithium acetate method, the
191 mixture was plated on a YPD plate overnight. The plate was replica plated on a
192 SC-Ura plate, containing 5-FOA, the following day to allow for counter-selection.
193 The colonies that grew in this plate were replica-plated on a YPD plate
194 containing clonNAT, to discard spontaneous mutations of *URA3* that allowed
195 cells to grow on the 5-FOA plate. Several transformants growing on FOA, but
196 not on clonNAT plates, were checked by PCR with oligos o-gal1-fw and o-bdh1-
197 rv (Table 1) and one of the transformants was verified by sequencing. The new
198 strain (WV36-405 *P_{bdh1}::P_{GAL1}-BDH1*) was transformed with plasmid pYES2-
199 *FDH1* and selected on SC-Ura plates, obtaining a yeast strain named DP-BDH1
200 overexpressing Bdh1p (because of the presence of its engineered
201 chromosomal *GAL1* promoter) and Fdh1p (under the control of the *GAL1*
202 promoter contained in the pYES2 plasmid) on galactose. Crude extracts were

203 prepared from this strain grown in SC-Ura medium plus 2% galactose until the
204 beginning of the stationary phase. Permeabilized yeast DP-BDH1 cells were
205 prepared by adding 0.1% (w/v) digitonin to the cell suspension, essentially as
206 described by Cordeiro and Freire (1995).

207

208 **Media and growth conditions.**

209 *E. coli* was grown at 37°C in Luria-Bertani medium supplemented with 50
210 µg/ml of ampicillin to select for the desired plasmid constructs. The yeast strains
211 derived from WV36-405 containing pYES2 derived plasmids were grown at 28
212 °C on a rotatory shaker (250 rpm) in SC-Ura supplemented with 2% galactose.

213

214 **Bdh1p, Bdh1p(His)₆ and Fdh1p-Bdh1(His)₆ purification. Molecular mass** 215 **determination.**

216 Bdh1p, Bdh1p(His)₆ and Fdh1p-Bdh1(His)₆ were purified from the yeast
217 strains WV36-405 $\Delta ara1$ [pYES2-BDH1], WV36-405 $\Delta ara1 \Delta bdh1$ [pYES2-
218 *BDH1(His)6*] and WV36-405 $\Delta ara1 \Delta bdh1$ [pYES2-FDH1-BDH1-6His]
219 respectively, as described (13-14). The last step of the purification protocol
220 served to determine the Mr of the fusion protein, Fdh1p-Bdh1p(His)₆ by gel-
221 filtration chromatography. A Hi-Load (26/60) SuperDex 200 prep grade column
222 from GE Healthcare equilibrated with 50 mM Hepes, pH 7 and 150 mM NaCl
223 was used. The column was eluted at a flow rate of 1.75 mL/min with the
224 equilibration buffer.

225

226 **Enzyme activities, chemical transformations, and coenzyme regenerating** 227 **systems.**

228 Enzyme activities were determined spectrophotometrically by
229 measuring the change of absorbance at 340 nm and 25°C, corresponding to the
230 oxidation of NADH ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). One unit (U) of activity corresponds
231 to 1 μmol of NAD^+ formed per minute. The specific activity of Bdh1p was
232 measured in 33 mM sodium phosphate buffer at pH 7, in the presence of 50
233 mM (*R/S*)-acetoin and 0.2 mM NADH. To ascertain the stereoselectivities of the
234 enzymes, reaction mixtures were prepared in 5 mL tubes with O-ring from Nirco
235 (Barberà del Vallés, Spain) with continuous agitation at room temperature. The
236 initial composition of the mixtures when using pure Bdh1p were 50 mM
237 diketone, 200 U of Bdh1p, 1 mM NADH in 33 mM sodium phosphate, pH 7
238 buffer and an NADH-regenerating system containing 100 mM sodium formate
239 and 4 U of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* (22). When using
240 crude extracts, yeast strain DP-BDH1 (WV36-405 $P_{\text{GAL1-BDH1}}$ [pYES2-FDH1])
241 was grown in SC-Ura plus galactose until the beginning of the stationary phase
242 and the pelleted cells were disrupted with glass beads. The extracts, containing
243 150 U of Bdh1 and 3 U of Fdh activity, were incubated with 50 mM diketone
244 together with 1 mM NADH and 100 mM formate. Yeast cells, permeabilized with
245 0.1 % digitonin (21), were used to drive the reduction of 50 mM diketone, in the
246 presence of 2% galactose, 1 mM NADH, 100 mM formate and 33 mM sodium
247 phosphate pH 7. When using the fusion protein Fdh1p-Bdh1p(His)₆, the
248 reaction solution contained 39 U of Bdh and 0.3 U of Fdh, which were incubated
249 with 50 mM diketone together with 5 mM NAD^+ and 100 mM formate as an
250 NADH-regenerating system. For the oxidation of the diols with pure Bdh1p, we
251 used an NAD^+ regenerating system containing 50 mM α -ketoglutarate, 100 mM

252 ammonium chloride and 25 U of glutamate dehydrogenase in 33 mM sodium
253 phosphate buffer at pH 7 (22).

254

255 **Western blots and isoelectric focusing (IEF) gels.**

256 Bdh1p(His)₆ and Fdh1p-Bdh1(His)₆ expressed from WV36-405Δ*ara1*
257 Δ*bdh1* [pYES2-*BDH1*-6His] and WV36-405Δ*ara1**BDH1*[pYES2-*FDH1*-*BDH1*-
258 6His] yeast strains were detected by Western blotting using a mouse
259 monoclonal anti-His₆ antibody following a previously described method (14).

260 The Bdh activities of the crude extracts were visualized by IEF on precast
261 (pH 3 to 9) gels from Bio-Rad (Criterion) as described (14).

262 **Analytical methods.**

263 The reaction mixtures were extracted with chloroform, to recover the
264 hydroxyketones and diols, together with 1-hexanol, as an internal standard,
265 essentially as described (23). A slight modification was introduced to quantify *R*-
266 and *S*-acetoin and the different 2,3-butanediol stereoisomers obtained from the
267 overnight reaction mixtures. To 1-mL reaction mixture, 1-hexanol was added up
268 to 8 mM, together with 2.5 g of K₂CO₃, followed by two successive extractions
269 with 2 and 4 mL chloroform. Both extractions were necessary to attain linearity
270 in the recovered acetoin and 2,3-butanediols from standard additions to the
271 reaction mixtures. The different stereoisomers of the hydroxyketones and diols
272 were resolved on a chiral column (Supelco β-DEX™ 120, 30 m length, 0.25
273 mm inner diameter), coupled to a Hewlett-Packard gas chromatograph
274 equipped with a mass spectrophotometer as a detector, under conditions
275 previously described (13). The identity of the products was verified by known

276 standards (when available) and by mass spectrometry. A better resolution of
277 (3*R*)-hydroxy-2-pentanone from (2*R*)-hydroxy-3-pentanone was achieved by an
278 HP-5MS Agilent column, 30 m length, 0.25 mm inner diameter, coupled to a
279 Hewlett-Packard gas chromatograph equipped with a mass spectrophotometer
280 as a detector. The following temperature program was used: isotherm at 45°C
281 for 2 min and three ramps 5°C/min up to 100°C, 15°C/min up to 150°C and 30
282 °C/min up to 275°C. The identity of the products was verified by mass
283 spectrometry.

284

285

Results

286

287 Kinetic parameters and stereoselectivity of Bdh1p.

288 Table 2 gives the kinetic parameters determined for Bdh1p towards
289 acetoin, diacetyl, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione.
290 The specificity constant k_{cat}/K_M decreased from acetoin to 2,3-hexanedione and
291 then increased for 3,4-hexanedione. The reaction of purified Bdh1p with diacetyl
292 specifically produced (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol, with a 95% yield, and a minor
293 amount of *R*-acetoin (Fig 1A). To determine the optical purity of the (2*R*,3*R*)-
294 2,3-butanediol obtained, we added a known concentration of *meso*-2,3-
295 butanediol and (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol to half of the reaction mixture obtained
296 upon the reaction of Bdh1p with diacetyl (and the NADH-regenerating system).
297 An equal volume of buffer was added to the other half of the reaction. By
298 comparing the areas of the known added concentrations of *meso*-2,3-butanediol
299 and (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol (panel B in Figure 2) and the corresponding ones in

300 panel A, we estimated an enantiomeric purity of (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol greater
301 than 99.6% (Fig 2).

302 When using Bdh1p with 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-
303 pentanedione only one diol was obtained (Fig 1B, C, D), identified as 2,3-
304 pentanediol, 2,3-hexanediol and 3,4-hexanediol, respectively, by their mass
305 spectra. Since there are not commercial sources of pure stereoisomers of these
306 compounds that could be used as standards, we assume that the diols
307 produced by Bdh1p are the (*R,R*) stereoisomers, given the stereoselectivity
308 displayed by Bdh1p towards diacetyl. A small peak corresponding to 3-hydroxy-
309 2-hexanone was also detected in the reduction of 2,3-hexanedione (Fig 1C).

310

311 **Search for other yeast NADH-dependent diacetyl reductases.**

312 A protein extract of a yeast strain deleted for *bdh1*, namely EG2
313 (FY834α *TRP1::bdh1*) (13) grown in YPglucose displayed a diacetyl reductase
314 activity of 0.73 U/mg (measured in 50 mM diacetyl and 0.2 mM NADH). The
315 extract was loaded in an IEF gel and the diacetyl reductase activities were
316 visualized by activity staining with diacetyl and NADH (results not shown). A
317 clear band with a pI lower than the pI of Bdh1p (Bdh1p was not visible in this gel
318 since *BDH1* was disrupted in the strain EG2) indicated that another enzyme (or
319 enzymes) was able to reduce diacetyl in an NADH- dependent reaction.
320 Therefore, we developed a protocol to purify this diacetyl reductase activity from
321 the yeast strain EG2. The protocol consisted of a DEAE-Sepharose, followed by
322 a hydroxyapatite column and by a Cibachron Blue 3GA chromatography. We
323 obtained a homogeneous protein with an estimated Mr of approximately 42,000
324 (by SDS-PAGE), which upon digestion with trypsin was analyzed by MALDI-

325 TOF MS (conditions described in González et al., 2010). The protein was
326 identified as Adh2p, and thus we analyzed by GC-MS the products obtained in
327 the reduction of diacetyl in the presence of Adh2p, which resulted in *S*-acetoin.
328 Given the similarity between Adh2p, Adh1p and Adh3p, we cloned an over-
329 expressed Adh1p and Adh3p (by means of the galactose inducible pYES2
330 vector) in the WV36-405 strain, finding that both displayed diacetyl reductase
331 activity, also yielding *S*-acetoin (results not shown). Since Bdh1p is
332 enantioselective yielding *R*-acetoin from diacetyl, we decided to use the Adh-
333 deficient strain WV36-405 when working with extracts and permeabilized cells
334 to minimize the production of *S*-acetoin, that would yield *meso*-2,3-butanediol
335 upon the action of Bdh1p.

336

337 **Diols and hydroxyketones obtained from vicinal diketones by yeast**
338 **extracts and permeabilized cells.**

339 Although purified Bdh1p yields enantiopure vicinal diols upon the
340 reduction of the corresponding diketones, an NADH-regenerating system was
341 necessary to displace the reaction towards the diols. To avoid the need of an
342 external source of FDH activity to regenerate NADH, we constructed a yeast
343 strain that overexpressed Bdh1p and yeast formate dehydrogenase (Fdh1p),
344 such that it would not be necessary to purify Bdh1p, nor the addition of
345 exogenous FDH. As a first step to construct such a strain, we used a
346 modification of the “*delito perfetto*” technique (15) developed in our laboratory to
347 change the chromosomal promoter of *BDH1* by the *GAL1-10* promoter. Then, a
348 multicopy inducible plasmid with cloned *FDH1* under the control of the *GAL1*
349 promoter was used to transform the previous yeast strain, such that the

350 presence of galactose in the growth medium induced the Bdh and Fdh
351 activities. The resulting yeast strain was named DP-BDH1 (WV36-405 P_{GAL1} -
352 $BDH1$ [pYES2- $FDH1$]). To ascertain the overexpression of Bdh and Fdh
353 activities in the strain DP-BDH1, we grew it and its parental control strain
354 (WV36-405 P_{BDH1} - $BDH1$ [pYES2]) in galactose containing medium. At the end
355 of their logarithmic phases, we obtained the yeast extracts by disrupting the
356 cells with glass beads and determined their Bdh and Fdh activities. While the
357 Bdh and Fdh specific activities from the control strain, WV36-405 P_{BDH1} -
358 $BDH1$ [pYES2], were 0.26 and less than 0.001 U/mg, respectively (measured at
359 5 mM NAD^+ and 100 mM (2*R*,3*R*)-butanediol or 100 mM formate), the
360 corresponding ones from the strain DP-BDH1 were 1.22 and 0.13 U/mg,
361 respectively. The yeast strain DP-BDH1 was permeabilized with 0.1% digitonin,
362 following the technique of Cordeiro and Freire (1995) and incubated with the
363 different diketones and galactose containing medium. When using the protein
364 extracts or the digitonin permeabilized yeast cells DP-BDH1, grown in
365 galactose, on the different diketones, the products obtained were a mixture of
366 all possible stereoisomers (Figs. 3 and 4). Thus, (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol, *meso*-
367 2,3-butanediol and traces of (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol were the products upon the
368 reduction of diacetyl with permeabilized cells with a yield of 65% (adding the 3
369 butanediol stereoisomers) (Fig. 4). Furthermore, the additional enzymatic
370 activities present in the yeast extracts and permeabilized cells yielded several
371 diol stereoisomers from 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-
372 hexanedione (Figs. 3 and 4). For instance, the four stereoisomers of 2,3-
373 hexanediol could be detected from their mass spectra, upon the reaction of 2,3-
374 hexanedione with DP-BDH1 extracts or permeabilized cells (Figs. 3C and 4C).

375

376 **Identification of the stereoisomeric forms of the hydroxyketones and**
377 **vicinal diols.**

378 In the case of the acetoin and 2,3-butanediol stereoisomers obtained
379 upon reduction of diacetyl (Figs. 3A and 4A), the assignation of the
380 stereoisomeric forms was made by comparison with the retention times of the
381 pure (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol, *meso*-2,3-butanediol and (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol
382 and also after the oxidation of pure (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol to *R*-acetoin (13). In
383 the case of 2,3-pentanedione (Figure 4B), the MS of the peaks that eluted at
384 7.06 and 7.77 min (*m/z* of 59, 43 and 31, in decreasing % abundance) identified
385 them as 3-hydroxy-2-pentanones (24), while the peak eluting at 7.64 min (*m/z*
386 of 45, 57 and 43, in decreasing % abundance) was identified as 2-hydroxy-3-
387 pentanone (24). The stereoisomeric form eluting at $t_R=7.06$ min was assigned to
388 (3*R*)-hydroxy-2-pentanone since its retention time was the same as the product
389 obtained with pure Bdh1p and 2,3-pentanedione (after one hour of reaction
390 only). Thus, the 3-hydroxy-2-pentanone eluting at 7.77 min must be (3*S*)-
391 hydroxy-2-pentanone. The 2-hydroxy-3-pentanone eluting at 7.64 min was
392 assigned to (2*S*)-hydroxy-3-pentanone, since this retention time was the same
393 as the product obtained upon reduction of 2,3-pentanedione with pure Ara1p
394 (25). Further evidences for the assignments were obtained from the oxidations
395 of (2*R*,3*R*)-2,3-pentanediol and (2*R*,3*R*)-2,3-hexanediol with pure Bdh1p (see
396 below).

397 The stereoisomeric forms of the 2,3-pentanedols were assigned by
398 comparing their retention times with the ones obtained upon treatment of 2,3-
399 pentanedione with Bdh1p alone and with Ara1p followed by Bdh1p. Thus, the

400 treatment with Bdh1p alone allowed us to assign the peak and retention time for
401 (2*R*,3*R*)-2,3-pentanediol. Moreover, the treatment with Ara1p yielded (2*S*)-
402 hydroxy-3-pentanone (25), which should yield (2*S*,3*R*)-2,3-pentanediol after
403 treating the hydroxyketone with Bdh1p. Consequently, we could assign the
404 peak at 18.15 min retention time to (2*S*,3*R*)-2,3-pentanediol (Fig. 4B). Since the
405 stereoisomer (2*S*,3*S*)-2,3-pentanediol should elute before (2*R*,3*R*)-2,3-
406 pentanediol (following the behavior shown by (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and
407 (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol), the peak eluting at 18.07 min can be assigned to
408 (2*R*,3*S*)-2,3-pentanediol (Fig 4B).

409 The same experimental strategy and reasoning was followed to assign
410 the hydroxyketones and 2,3-hexanediols derived from 2,3-hexanedione (Fig.
411 4C). First, the four peaks eluting from $t_R=20$ to 21 min, were assigned to 2,3-
412 hexanediol by their MS (with m/z of 55, 73, 45 and 43, in decreasing %
413 abundance), characteristic of 2,3-hexanediols (26). Second, the treatment of
414 2,3-hexanedione with pure Bdh1p allowed us to assign (2*R*,3*R*)-2,3-hexanediol
415 to the $t_R=20.25$ minutes peak, and the treatment of 2,3-hexanedione with Ara1p
416 followed by Bdh1p, allowed to assign (2*S*,3*R*)-2,3-hexanediol to the 20.74 min
417 peak (Fig. 4C). The remaining stereoisomers were assigned as in the case of
418 the reduction of 2,3-pentanedione. The same order of elution of the 2,3-
419 hexanediols stereoisomers was also obtained by Schröder et al. (1994),
420 working with a β -cyclodextrin chiral column.

421 In the case of the diols produced upon the reduction of 3,4-hexanedione (Fig.
422 4D), the assignation of the stereoisomeric forms was made as in the case of
423 diacetyl reduction.

424 **Properties of the fusion protein Fdh1p-Bdh1p(His)₆.**

425 The fusion protein Fdh1p-Bdh1p(His)₆ was purified from the yeast
426 strain WV36-405 Δ *ara1* Δ *bdh1* [pYES2-*FDH1-BDH1*-6His], by means of a Ni-
427 Sepharose column, followed by gel-filtration on a Hi-Load SuperDex 200 that
428 also served to determine its Mr. The estimated Mr for Fdh1p-Bdh1p(His)₆ and
429 Bdh1p(His)₆ were 133,000 and 70,500, respectively (Fig. 5C). Given the Mr of
430 Fdh1p (Mr=41,700) and Bdh1p (Mr=41,500) monomers, the active form of the
431 fusion protein is a dimer of two Fdh1-Bdh1(His)₆p polypeptides. The fusion
432 protein is rather unstable as it can be deduced from the Western blot analysis
433 (Fig. 5A, lane 2). A main band of an apparent Mr close to 95,000 (consistent
434 with the Mr of a Fdh1p-Bdh1p(His)₆ polypeptide) and several bands
435 (presumably degradation products) of lower Mr are visible in the blot. Under
436 these conditions Bdh1p(His)₆ is stable as only one band of the correct Mr is
437 visible in the blot (Fig. 5A, lanes 3 and 4). Furthermore, the presence of Fdh1p
438 in the fusion protein decreases the pI of Bdh1p(His)₆p (compare lanes 3 and 4
439 with lane 2 in Fig. 5B). Thus, the activity bands seen in the gel (Fig. 5B, lane 2)
440 confirm that Fdh1p-Bdh1p(His)₆ had a lower pI than Bdh1p(His)₆ in two genetic
441 backgrounds, with endogenous Bdh1p (Fig 5B, lane 3) and without endogenous
442 Bdh1p (Fig. 5B, lane 4). Moreover, we determined the kinetic constants of
443 Fdh1p-Bdh1p(His)₆ towards (*R/S*)-acetoin as $K_M=2.2$ mM (determined at 0.2
444 mM NADH) and $k_{cat}= 31s^{-1}$. From the specific activity of Fdh1p-Bdh1p(His)₆
445 towards formate (at 5 mM NAD⁺), an apparent k_{cat} of 0.25 s⁻¹ was estimated at
446 25 °C. Thus, the k_{cat} of the fusion protein for acetoin was approximately 50
447 times lower than the k_{cat} of Bdh1p (Table II), while the K_M values were similar.
448 The k_{cat} for formate was 24 times lower than the published value obtained at
449 30°C (27).

450

451 **Hydroxyketones and diols produced by the fusion protein Fdh1p-**
452 **Bdh1p(His)₆.**

453 The purified fusion protein Fdh1p-Bdh1p(His)₆ yielded a single form of
454 diol, namely (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol, upon diacetyl reduction (Fig. 6A) with a
455 conversion of 31%. Moreover, when starting with either 2,3-pentanedione, 2,3-
456 hexanedione or 3,4-hexanedione a single stereoisomeric form of diol was
457 obtained also (Figs. 6B, C and D). Since these diols have the same retention
458 times than the diols obtained with pure Bdh1p, they have been tentatively
459 assigned as the corresponding (*R,R*) stereoisomers. The reduction of the
460 diketones by Fdh1p-Bdh1p(His)₆ yielded also hydroxyketones. In the case of
461 diacetyl, the hydroxyketone was identified as *R*-acetoin, while in the case of 2,3-
462 pentanedione and 2,3-hexanedione, they were identified by their mass spectra
463 as 3-hydroxy-2-pentanone and 3-hydroxy-2-hexanone, respectively. We
464 assigned them the *R* configuration (Fig. 6) because we assume that, for these
465 compounds, the fusion protein displays the same enantioselectivity shown
466 towards diacetyl.

467

468 **Oxidation of the vicinal diols with Bdh1p.**

469 We first studied the products obtained in the oxidation reaction of (2*R*,
470 3*R*)-2,3-butanediol by Bdh1p in the presence of NAD⁺ and an NAD⁺-
471 regenerating system, consisting of α -ketoglutarate, ammonium chloride and
472 glutamate dehydrogenase. We obtained *R*-acetoin as expected from the
473 oxidation of (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol (results not shown). Since (2*R*,3*R*)-2,3-
474 pentanediol, (2*R*,3*R*)-2,3-hexanediol and (3*R*,4*R*)-3,4-hexanediol are not

475 commercially available, they were obtained *in situ* from the reaction products
476 upon reduction of 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione by
477 Bdh1p (presumably the (*R,R*)-stereoisomers, see above). When using (*2R,3R*)-
478 2,3-pentandiol and NAD⁺ with Bdh1p, together with the NAD⁺-regenerating
479 system, one peak was obtained, with a MS pattern compatible with 2-hydroxy-3-
480 pentanone (Fig. 7C). We also analyzed the reaction products obtained upon the
481 reduction of 2,3-pentanedione with Bdh1p (after one-hour reaction) and
482 observed a peak, identified as 3-hydroxy-2-pentanone (Fig. 7A). The insets
483 from Figs. 7A and 7C only show the most abundant and selective ions for (3)-
484 hydroxy-2-pentanone (*m/z* of 59, black) and (2)-hydroxy-3-pentanone (*m/z* of
485 45, red) for clarity. Both compounds should have the *R*-configuration and
486 showed close retention times on the chiral column. We obtained a better
487 separation and an additional proof of their identities by loading them (as a
488 chloroform extract) on an HP-5MS column, which resolved two peaks
489 corresponding to (*3R*)-hydroxy-2-pentanone and (*2R*)-hydroxy-3-pentanone
490 (results not shown). We did a parallel study with (*2R,3R*)-2,3-hexanediol with
491 similar results. Thus, the reduction of 2,3-hexanedione yielded (*3R*)-hydroxy-2-
492 hexanone (Fig. 8A and C), while the oxidation of (*2R,3R*)-2,3-hexanediol
493 yielded (*2R*)-hydroxy-3-hexanone (Fig. 8B and D). Fig 8C and D only show the
494 most abundant and selective ions for 3-hydroxy-2-hexanone (*m/z* of 55, black),
495 and 2-hydroxy-3-hexanone (*m/z* of 45, red). However, since the reduction of
496 2,3-hexanedione was not complete, some (*3R*)-hydroxy-2-hexanone was
497 carried over together with (*2R,3R*)-2,3-hexanediol, which is visible in the
498 chromatogram (Fig. 8B). With all these data on the oxidation/reduction of vicinal
499 diols/diketones with Bdh1p, we propose as a mechanism that the more reactive

500 carbon upon oxidation (of the diol) and reduction (of the diketone) would be the
501 corresponding to the most internal hydroxyl (or keto) group (Fig. 9).
502 Furthermore, in order to resolve all the stereoisomeric forms of 2-
503 hydroxypentanone and 3-hydroxypentanone (as well as the corresponding
504 hydroxyhexanones), we induced the racemization and isomerization through
505 enolate species of the hydroxyketones by adding NaOH to the products
506 obtained upon oxidation of (2*R*,3*R*)-2,3-pentanediol and (2*R*,3*R*)-2,3-hexanediol
507 (or reduction of the diketones). Fig. 10 shows that our technique successfully
508 resolves all the hydroxyketone stereoisomers.

509

Discussion

510 The main aims of the present work were to develop a system able to
511 produce (*R,R*) diols from vicinal diketones, to determine the stereoselectivity of
512 Bdh1p towards the reduction of the two carbonyl groups, to determine the
513 kinetic constants of the reaction and to elucidate its preference towards the keto
514 groups of the vicinal diketones. In the first part of the study, we showed that
515 pure Bdh1p reduced both carbonyl groups from diacetyl to optically pure
516 (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol (Fig. 2A and B). Furthermore, when using 2,3-
517 pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione with pure Bdh1p, only
518 one stereoisomeric form of the corresponding diols was identified in the reaction
519 mixtures. Given the stereoselectivity displayed by Bdh1p towards diacetyl and,
520 since there are not commercial sources of those pure stereoisomers, we
521 tentatively assigned them to the corresponding (*R, R*).

522 The steady-state kinetic studies performed with pure Bdh1p and
523 several vicinal diketones show that the specificity constant k_{cat}/K_M decreased
524 from diacetyl to 2,3-hexanedione and then increased for 3,4-hexanedione

525 (Table 2). Bdh1p displayed the highest specificity constants towards the
526 substrates known to be transformed by Bdh1p in the *Saccharomyces cerevisiae*
527 metabolism: i.e. acetoin, diacetyl and 2,3-pentanedione.

528 Although the use of pure Bdh1p yielded only one stereoisomeric form
529 of the diols, it was necessary to use formate and exogenous formate
530 dehydrogenase to regenerate NADH. To avoid this drawback, we explored the
531 possibility of using a yeast strain derived from FY834 (16) which could
532 overexpress their endogenous *BDH1* and *FDH1*. To choose a convenient
533 genetic background, we tested first whether there were any diacetyl reductases
534 other than Bdh1p in the yeast extracts derived from the wild type strain FY834.
535 We detected Adh2p with an NADH-dependent reductase activity that yielded S-
536 acetoin from diacetyl. Furthermore, we showed that Adh1p and Adh3p could
537 also reduce diacetyl to S-acetoin, in NADH-dependent reactions. Consequently,
538 we decided to work with a yeast strain with a genetic background $\Delta adh1$,
539 $\Delta adh2$, $\Delta adh3$ (as WV36-405), to avoid the production of *meso*-2,3-butanediol,
540 that would be obtained from S-acetoin by Bdh1p (13). We developed a modified
541 *delitto perfetto* technique (15), to overexpress Bdh1p and Fdh1p in the strain
542 WV36-405. The counter-selection marker used, *URA3* from *Kluyveromyces*
543 *lactis*, being different in sequence to *URA3* from *S.cerevisiae*, minimized the
544 homologous recombination events to the endogenous *URA3* locus, while the
545 selection marker *NAT1* yields less spontaneous mutants (results not shown)
546 than the *kanMX4* marker. Thus, by placing the *GAL1-10* promoter controlling
547 *BDH1* and transforming the resultant strain with a multicopy galactose-inducible
548 plasmid carrying *FDH1*, we obtained a modified yeast strain (named DP-BDH1)
549 that overexpressed Bdh1p and Fdh1p in the presence of galactose. We

550 measured a 4.5-fold increase in Bdh specific activity towards (2*R*,3*R*)-2,3-BD
551 and of more than 100 fold in Fdh specific activity towards formate in the
552 corresponding protein extracts, in comparison to the values of the parental
553 strain, transformed with an empty plasmid. We used this engineered strain in
554 the form of protein extracts and permeabilized cells to drive the reductions of
555 diketones without exogenously added Fdh. Although the diketones were
556 reduced, the diols were a mixture of different stereoisomers. Thus, with diacetyl,
557 *meso*-2,3-butanediol and (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol were identified as products by
558 using protein extracts or permeabilized cells (Figs. 3 and 4). A mixture of
559 different stereoisomeric forms of 2,3-pentanediol, 2,3-hexanediol and 3,4-
560 hexanediol were obtained in the reductions of 2,3-pentanedione, 2,3-
561 hexanedione and 3,4-hexanedione, respectively (Figs. 3 and 4). Although it was
562 advantageous to use DP-BDH1 with no need of coenzyme regenerating
563 processes, the diastereoisomeric composition of the products precludes its use
564 to obtain pure (*R,R*)-diols. Mixtures of stereoisomeric alcohols are formed
565 because of the presence of other enzymes that could convert the same
566 substrates but with different stereoselectivities. Thus, the activities of other
567 diketone reductases (NADH- and also NADPH-dependent in the permeabilized
568 cells) in yeast would be responsible for the production of *S*-hydroxyketones and
569 the different stereoisomeric forms of the diols (14, 25). In fact, the reduction of
570 diacetyl and 2,3-pentanedione for only one hour, allowed the observation of *S*-
571 acetoin, (2*S*)-hydroxy-3-pentanone and (3*S*)-hydroxy-2-pentanone (Fig. 4A and
572 4B). Then, Bdh1p and/or other reductases would reduce these mixtures of
573 hydroxyketones to the corresponding mixture of diols. A mixture of

574 stereoisomeric alcohols derived from the reduction of α - and β -ketoesters was
575 already observed working with yeast cells (11).

576 To avoid these interfering activities, and the use of exogenous Fdh, we
577 constructed a bifunctional fusion protein containing Fdh and Bdh activities with
578 a His-tag at its C-terminus Fdh1p-Bdh1p(His)₆. By using this protein, pure
579 (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol, (2*R*,3*R*)-2,3-pentanediol, (2*R*,3*R*)-2,3-hexanediol and
580 (3*R*,4*R*)-3,4-hexanediol (Fig. 6) were obtained, but with lower yield (31% with
581 (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol) than when using pure Bdh1p and exogenous formate
582 dehydrogenase (95% conversion of diacetyl into (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol). The
583 fusion Fdh1p-Bdh1p(His)₆ behaved as a dimer in a gel-filtration column (Fig.
584 5C), consistent with the fact that Bdh1p is a dimer (13) and the orthologous
585 formate dehydrogenase from *Candida boidinii* is also a dimer (28). The stability
586 of the fusion protein was checked by Western-blot and zymogram analyses
587 (Fig. 5A and B), showing that the protein suffered proteolysis but maintaining
588 Bdh activity on the zymogram. The use of this fusion protein allowed the
589 production of pure (*R,R*)-diols from vicinal diketones, without the need of adding
590 an external cofactor-regenerating system, but with a low yield. In fact the k_{cat}
591 values of the Bdh and Fdh activities were 50 and 24 times lower, respectively,
592 for the fusion protein than for the individual enzymes. However, this strategy
593 allowed the rapid purification of the fusion protein and the production of
594 enantiopure (*R,R*)-diols. However, further work needs to be done, to increase
595 the stability of the fusion protein and the expression level and/or the turnover
596 rate of Fdh1p. A similar approach for cofactor regeneration was used recently
597 by Hölsch and Weuster-Botz (2010) to convert a prochiral ketone to (*S*)-1-
598 (pentafluorophenyl)-ethanol. They used a bifunctional protein composed of an

599 NADP⁺ dependent mutant of formate dehydrogenase linked to a NADPH-
600 reductase, in the whole-cell reduction of pentafluoroacetophenone. In their
601 case, however, the activity of the oxidoreductase was almost not affected by the
602 fusion.

603 We also studied the specificity of Bdh1p towards the two hydroxy
604 groups of (2*R*,3*R*)-2,3-pentanediol and (2*R*,3*R*)-2,3-hexanediol upon oxidation
605 with NAD⁺, as well as for the reverse reaction, the reduction of 2,3-
606 pentanedione and 2,3-hexanedione with NADH. The reduction of 2,3-
607 pentanedione after one hour of reaction yielded (3*R*)-hydroxy-2-pentanone as
608 intermediate (Fig. 7A). When the reduction reaction was complete (Fig. 7B), the
609 selectivity was studied in the oxidation direction, yielding (2*R*)-hydroxy-3-
610 pentanone.

611 A consistent result with these observations was obtained when
612 studying the oxidation/reduction of (2*R*,3*R*)-2,3-hexanediol/2,3-hexanedione by
613 Bdh1p. The enzyme showed preference for the functional group bound to the
614 most internal carbon, namely C-3, in the oxidation and reduction reactions (Fig.
615 8). Thus, 3-hydroxy-2-hexanone was identified in the reduction direction and 2-
616 hydroxy-3-hexanone in the oxidation direction by its mass spectra. With the
617 characterization of all these intermediates and products, we propose the
618 mechanism shown in Fig. 9, which indicates that the most internal carbon (C-3
619 for 2,3-pentanedione and hexanedione) is the most reactive, since it is the one
620 that predominantly reacts in both directions. Although we did not detect (2*R*)-
621 hydroxy-3-pentanone in the reduction direction of 2,3-pentanedione by Bdh1p
622 (Fig.7A), it would be difficult to discard it completely (Fig. 9 discontinuous line).
623 For the same reason a discontinuous line indicates a putative oxidation of

624 (2*R*,3*R*)-2,3-pentanediol to (3*R*)-hydroxy-2-pentanone. Since no 3D structure of
625 any (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol dehydrogenase has been published yet, it would be
626 speculative to give a structural reason for this preference. A recent article (30)
627 reports the crystallization of the orthologous (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol
628 dehydrogenase from *Bacillus coagulans*, therefore we will be able to discuss
629 more deeply the differential reactivity of both stereogenic centers, once the 3D
630 structure of the enzyme is solved.

631 Finally, we showed the resolution power of the β -cyclodextrin column
632 that was able to resolve the four hydroxyketones derived from 2,3-pentanedione
633 and the four derived from the 2,3-hexanedione (Fig 10). Although *R*-3-hydroxy-
634 2-pentanone and *R*-2-hydroxy-3-pentanone are not completely resolved with
635 the chiral column under the conditions used, we obtained a better resolution
636 and confirmed their identities by the use of an HP-5MS column (results not
637 shown).

638

639

Acknowledgments

640 The invaluable technical help from Dr. Sílvia Bronsoms from the IBB
641 (Universitat Autònoma de Barcelona) and from Drs. Alba Eustaquio, Maria J.
642 Bergé and Sandra Izquierdo from the Servei d'Anàlisi Química (Universitat
643 Autònoma de Barcelona) are acknowledged. This work was supported by the
644 grants BIO-2007-64659 from the Ministry of Education and Science (Spain) and
645 (2009 SGR795) from Generalitat de Catalunya (Spain).

646

647

References.

- 648 1. **Zeng AP, Sabra W.** 2011. Microbial production of diols as platform
649 chemicals: recent progresses.
650 Curr Opin Biotechnol. **22**:749-57.
- 651 2. **Ji XJ, Huang H, Ouyang PK.** 2011. Microbial 2,3-butanediol production: a
652 state-of-the-art review.
653 Biotechnol Adv. **29**:351-64.
- 654 3. **Celińska E, Grajek W.** 2009. Biotechnological production of 2,3-butanediol--
655 current state and prospects.
656 Biotechnol Adv. **27**:715-25.
- 657 4. **Xu Y, Chu H, Gao C, Tao F, Zhou Z, Li K, Li L, Ma C, Xu P.** 2014.
658 Systematic metabolic engineering of Escherichia coli for high-yield production of
659 fuel bio-chemical 2,3-butanediol.
660 Metab Eng..**23**:22-33.
- 661 5. **Kim SJ, Seo SO, Jin YS, Seo JH.** 2013. Production of 2,3-butanediol by
662 engineered Saccharomyces cerevisiae.
663 Bioresour Technol. **46**:274-281.
- 664 6. **Kim SJ, Seo SO, Park YC, Jin YS, Seo JH.** 2014. Production of 2,3-
665 butanediol from xylose by engineered Saccharomyces cerevisiae.
666 J Biotechnol. **192**:376-382.
- 667 7. **Rong Liu, Hans-Erik Högberg.** 2001. Chemoenzymatic preparation of
668 (2S,3S)- and (2R,3R)-2,3-butanediols and their esters from mixtures of d,l- and
669 meso-diols,
670 Tetrahedron: Asymmetry.**12**: 771-778,

- 671 8. **Yan Y, Lee CC, Liao JC.** 2009. Enantioselective synthesis of pure (R,R)-2,3-
672 butanediol in *Escherichia coli* with stereospecific secondary alcohol
673 dehydrogenases.
674 *Org Biomol Chem.* **7**:3914-7.
- 675 9. **Lian J, Chao R, Zhao H.** 2014. Metabolic engineering of a *Saccharomyces*
676 *cerevisiae* strain capable of simultaneously utilizing glucose and galactose to
677 produce enantiopure (2R,3R)-butanediol.
678 *Metab Eng.* **23**:92-9.
- 679 10. **Otagiri M, Ui S, Takusagawa Y, Ohtsuki T, Kurisu G, Kusunoki M.** 2010.
680 Structural basis for chiral substrate recognition by two 2,3-butanediol
681 dehydrogenases.
682 *FEBS Lett.* **584**:219-23.
- 683 11. **Kaluzna IA, Matsuda T, Sewell AK, Stewart JD.** 2004. Systematic
684 investigation of *Saccharomyces cerevisiae* enzymes catalyzing carbonyl
685 reductions.
686 *J Am Chem Soc.* **126**:12827-32.
- 687 12. **Xiao Z, Lv C, Gao C, Qin J, Ma C, Liu Z, Liu P, Li L, Xu P.** 2010. A novel
688 whole-cell biocatalyst with NAD⁺ regeneration for production of chiral
689 chemicals.
690 *PLoS One.* **5**: e8860.
- 691 13. **González, E., M. R. Fernández, C. Larroy, L. Solá, M. A. Pericás, X.**
692 **Parés, and J. A. Biosca.** 2000. Characterization of a (2R,3R)-2,3-butanediol
693 dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* *YAL060W* gene product.
694 Disruption and induction of the gene.
695 *J. Biol. Chem.* **275**:35876-35885.

- 696 14. **González E, Fernández MR, Marco D, Calam E, Sumoy L, Parés X,**
697 **Dequin S, Biosca JA.** 2010. Role of *Saccharomyces cerevisiae*
698 oxidoreductases Bdh1p and Ara1p in the metabolism of acetoin and 2,3-
699 butanediol.
700 Appl Environ Microbiol. **76**:670-9.
- 701 15. **Storici F, Lewis LK, Resnick MA.** 2001. In vivo site-directed mutagenesis
702 using oligonucleotides.
703 Nat Biotechnol. **19**:773-6.
- 704 16. **Winston F, Dollard C, Ricupero-Hovasse SL.** 1995. Construction of a set
705 of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C.
706 Yeast **11**: 53-5.
- 707 17. **Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A.** 1983. Transformation of intact yeast
708 cells treated with alkali cations.
709 J Bacteriol. **153**:163-8.
- 710 18. **Wach A, Brachat A, Pöhlmann R, Philippsen P.** 1994. New heterologous
711 modules for classical or PCR-based gene disruptions in
712 *Saccharomyces cerevisiae*.
713 Yeast. **10**:1793-808.
- 714 19. **Goldstein AL, McCusker JH.** 1999. Three new dominant drug resistance
715 cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*.
716 Yeast. **15**:1541-53.
- 717 20. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning. A*
718 *laboratory manual.* 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
719 NY.

- 720 21. **Cordeiro C, Freire AP.** 1995. Digitonin permeabilization of *Saccharomyces*
721 *cerevisiae* cells for *in situ* enzyme assay.
722 *Anal Biochem.* **229**:145-8.
- 723 22. **Woodyer, R.D., Johannes, T.W. and Zhao, H.** 2006. Regeneration of
724 Cofactors in Enzyme Biocatalysis in “Enzyme Technology” Eds.Pandey, A.,
725 Webb, C., Soccol, C.R. and Laroche C. Springer Science pgs. 83-100
- 726 23. **Michnick S., J.L. Roustan, F. Remize, P. Barre, and S. Dequin.** 1997.
727 Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in
728 *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1*
729 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast* **13**:783-93.
- 730 24. **Höckelmann, C. and Jüttner, F.** 2005. Off-flavours in water:
731 hydroxyketones and β -ionone derivatives as new odour compounds of
732 freshwater cyanobacteria.
733 *Flavour Fragr. J.* **20**: 387–394.
- 734 25. **Calam E, Porté S, Fernández MR, Farrés J, Parés X, Biosca JA.** 2013.
735 Biocatalytic production of alpha-hydroxy ketones and vicinal diols by yeast and
736 human aldo-keto reductases.
737 *Chem Biol Interact.* **202**:195-203.
- 738 26. **Schröder, F., Fettköther, R., Noldt, U., Dettner, K., König, W.A. and**
739 **Francke, W.** 1994. Synthesis of (3R)-3-Hydroxy-2-Hexanone, (2R,3R)-2,3-
740 hexanediol and (2S,3R)-2,3-hexanediol, the Male Sex Pheromone of *Hylotrupes*
741 *bajulus* and *Pyrrhidium sanguineum* (cerambycidae).
742 *Liebigs Ann. Chem.* 1211-1218.

- 743 27. **Serov AE, Popova AS, Fedorchuk VV, Tishkov VI.** 2002. Engineering of
744 coenzyme specificity of formate dehydrogenase from *Saccharomyces*
745 *cerevisiae*.
746 *Biochem J.* **367**: 841-7.
- 747 28. **Schirwitz K, Schmidt A, Lamzin VS.** 2007. High-resolution structures of
748 formate dehydrogenase from *Candida boidinii*.
749 *Protein Sci.* **16**:1146-56.
- 750 29. **Hölsch K, Weuster-Botz D.** 2010. Enantioselective reduction of prochiral
751 ketones by engineered bifunctional fusion proteins.
752 *Biotechnol Appl Biochem.* **56**:131-40.
- 753 30. **Miao X, Huang X, Zhang G, Zhao X, Zhu X, Dong H.** 2013. Crystallization
754 and preliminary X-ray study of a (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase from
755 *Bacillus coagulans* 2-6.
756 *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **69**:1140-2.
- 757
- 758
- 759

760 **Table I. List of oligonucleotide primers used.**

761 The restriction sites and self-complementary regions of the primers FPint-Fw
 762 and FPint-Rv are underlined.

Function	Name	Sequence
Cloning <i>FDH1</i> and <i>FDH1-BDH1</i> -6His in vector pYES2	o-FDH-fw	5' CGC <u>GGA TCC</u> AAT ATG TCG AAG GGA AAG G 3'
Cloning <i>FDH1</i> in vector pYES2	o-FDH-rv	5' CCG <u>GAA TTC</u> TTA TTT CTT CTG TCC ATA AGC TCT GG 3'
Construction of the template for <i>FDH1-BDH1</i> -6His	FPint-Rv	5' CAA AGC TCT CAT ACC TTG <u>AAA ATA CAA ATT TTC TTT</u> <u>CTT CTG TCC ATA AGC TCT</u> GG 3'
Construction of the template for <i>FDH1-BDH1</i> -6His	FPint-Fw	5' <u>CAG AAG AAA GAA AAT TTG</u> <u>TAT TTT CAA GGT ATG AGA</u> <u>GCT TTG</u> GCA TAT TTC AAG AAG 3'
Cloning <i>FDH1-BDH1</i> -6His in vector pYES2	bdh1-his	5' GCG <u>GAA TTC</u> TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG CTT CAT TTC ACC GTG ATT GTT AGG 3'
Strain generation WV36-405 <i>URA3-NAT1::p_{bdh1}-bdh1</i>	Pbdh-ura-fw	5' GAG CAG TCG GAA AGA TCA AGA AAG ACT ACG AGA ATC AAT AAA CGA GGC CAA TAC AAC AGA TCA CGT G 3'
Strain generation WV36-405 <i>URA3-NAT1::p_{bdh1}-bdh1</i>	Bdh-nat1-rv	5' ATT AGT GAA GTG AAT ATC ACC CTT CTT GAA ATA TGC CAA AGC TCT CAT TCG ACA CTG GAT GGC GGC G 3'
Strain generation WV36-405 <i>P_{GAL1}-BDH1</i>	Pbdh-gal-Fw	5'GAG CAG TCG GAA AGA TCA AGA AAG ACT ACG AGA ATC AAT AAA CGA GGC ACG GAT TAG AAG CCG CCG AGC 3'
Strain generation WV36-405 <i>P_{GAL1}-BDH1</i>	Bdh-gal-bis-rv	5' ATT AGT GAA GTG AAT ATC ACC CTT CTT GAA ATA TGC CAA AGC TCT CAT TAT CCG GGG TTT TTT CTC CTT GAC G 3'
Verification of the construct <i>P_{GAL1}-BDH1</i>	o-gal1-fw	5' CCG ACG GAA GAC TCT CCT CCG 3'
Verification of the construct <i>P_{GAL1}-BDH1</i>	o-bdh1-rv	5' GGT CCG CAC AAC TGC TGG CAG C 3'

763

764

Table II.

765

Steady-state kinetic constants of yeast Bdh1p towards acetoin and several vicinal diketones.

766

767

768

Acetoin and diketone reduction activities were measured at 25°C in 33 mM

769

sodium phosphate pH 7.0 with 0.2 mM NADH.

770

771

	k_{cat} (s^{-1})	K_{M} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$)
(<i>R/S</i>)-acetoin	1,625±83	3±0.6	5.4x10 ⁵ ±1.3x10 ⁵
diacetyl	1,735±165	60±2	2.9x10 ⁴ ±0.4x10 ⁴
2,3-pentanedione	826±83	33±7	2.5x10 ⁴ ±0.8x10 ⁴
2,3-hexanedione	55±8	6±3	9x10 ³ ±6x10 ³
3,4-hexanedione	22±1	0.7±0.2	3x10 ⁴ ±1x10 ⁴

772

FIGURE LEGENDS

773

774 **Figure 1. Production of diols by purified Bdh1p.**

775 Gas chromatograms obtained after extraction with chloroform of the products
776 obtained from a reaction mixture containing 50 mM diketone, 1 mM NADH, 100
777 mM sodium formate and 4 U of FDH in 33 mM sodium phosphate, pH 7, after
778 the addition of 200 U of pure Bdh1p, together with 1-hexanol as an internal
779 standard. Total reaction time was 20 h.

780

781 **Figure 2. Optical purity of the (2R,3R)-2,3-butanediol obtained with pure** 782 **Bdh1p and diacetyl.**

783 Panels A and B correspond to the enlarged region of 2,3-butanediols
784 stereoisomers, before (panel A) and after (panel B) adding external (2S,3S)-2,3-
785 butanediol and (*meso*)-2,3-butanediol. (A) Enlarged chromatogram
786 corresponding to a reaction with diacetyl, Bdh1p and an NADH-regenerating
787 system where the concentration of the reaction product (2R,3R)-2,3-butanediol
788 was 13.7 mM.

789 (B) Enlarged chromatogram containing the reaction mixture from panel A, to
790 which (2S,3S)-2,3-butanediol and (*meso*)-2,3-butanediol were added as
791 controls. The final concentration of (2R,3R)-2,3-butanediol was 12.9 mM, while
792 the concentrations of (2S,3S)-2,3-butanediol and (*meso*)-2,3-butanediol were
793 0.1 mM each.

794

795 **Figure 3. Production of diols by yeast extracts overexpressing Bdh1p and** 796 **Fdh1p.**

797 Gas chromatograms obtained after extraction with chloroform of the products
798 obtained from a reaction mixture containing 50 mM diketone, 1 mM NADH, 100
799 mM sodium formate in 33 mM sodium phosphate, pH 7, 20 h after the addition
800 of an extract of yeast strain DP-BDH1 containing 3 U of Fdh and 150 U of Bdh,
801 together with 1-hexanol as an internal standard.

802

803 **Figure 4. Production of diols by permeabilized yeast cells overexpressing**
804 **Bdh1p and Fdh1p.**

805 Gas chromatograms obtained after extraction with chloroform of the products
806 obtained from a reaction mixture containing 2% galactose, 50 mM diketone, 5
807 mM NAD⁺, 100 mM sodium formate in 33 mM sodium phosphate, pH 7, after
808 the addition of permeabilized DP-BDH1 yeast cells, together with 1-hexanol as
809 an internal standard. Total reaction time was one hour for diacetyl and 2,3-
810 pentanedione and 20 h for 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione.

811

812 **Figure 5. Determination of the molecular properties of the fusion protein**
813 **Fdh1p-Bdh1p(His)₆.**

814 (A) Western blot analysis of yeast protein extracts developed with an anti-His
815 antibody, Lane 1, Mr standards; lane 2, 15 µg from strain WV36-405Δ*ara1* Δ
816 *bdh1* [pYES2-*FDH1-BDH1*-6His] extract; lane 3, 17 µg from strain WV36-
817 405Δ*ara1BDH1* [pYES2-*BDH1*-6His] extract; lane 4, 21 µg from strain WV36-
818 405Δ*ara1* Δ*bdh1* [pYES2-*BDH1*-6His] extract. (B), IEF gel (pH 3 to 9) stained
819 with 100 mM (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol. Lane 1, pI standards; lane 2, 30 mU of
820 butanediol dehydrogenase activity, from strain WV36-405Δ*ara1* Δ*bdh1* [pYES2-
821 *FDH1-BDH1*-6His] extract; lane 3, 7 mU of Bdh from a yeast strain WV36-

822 405 Δ ara1BDH1[pYES2-BDH1-6His] extract; lane 4, 6 mU of Bdh from strain
823 WV36-405 Δ ara1 Δ b bdh 1 [pYES2-BDH1-6His] extract. (C), size exclusion
824 chromatography of purified Bdh1p(His)₆ and fusion protein Fdh1p-Bdh1p(His)₆
825 on a SuperDex 200 prep grade column. a, β -amylase (200 kDa); b, yeast
826 alcohol dehydrogenase (150 kDa); c, bovine serum albumin (66 kDa); d,
827 carbonic anhydrase (29 kDa); e, cytochrome c (12.4 kDa).

828

829 **Figure 6. Stereoisomeric composition of the products obtained from**
830 **reaction mixtures containing vicinal diketones and purified fusion protein**
831 **Fdh1p-Bdh1p(His)₆.**

832 Stereoisomer composition of the products obtained with a reaction mixture
833 containing purified fusion protein Fhd1p-Bdh1p(His)₆, 37 U of Bdh activity and
834 0.3 U of Fdh activity, 5 mM NAD⁺, 100 mM sodium formate, in 33 mM sodium
835 phosphate buffer at pH 7, together with 50 mM of the compounds diacetyl (A),
836 2,3-pentanedione (B), 2,3-hexanedione (C) and 3,4-hexanedione (D). Total
837 reaction time was 20 h.

838

839 **Figure 7. Stereoisomeric composition of the products from the**
840 **reduction/oxidation of 2,3-pentanedione/(2R,3R)-2,3-pentanediol with**
841 **Bdh1p.**

842 (A) Stereoisomer composition of the products obtained in a reaction mixture
843 containing Bdh1p, 50 mM 2,3-pentanedione, 1 mM NADH and an NADH-
844 regenerating system (100 mM sodium formate and 1 U of formate
845 dehydrogenase) in 33 mM sodium phosphate, pH 7, after the addition of 40 U of
846 pure Bdh1p, together with 1-hexanol as an internal standard, with a total

847 reaction time of 1 h. The inset shows the relative abundances of the ions with
848 an m/z of 59 (in black) and of 45 (in red), for the peak eluting at 6.1 min from the
849 chiral column.

850 (B) Stereoisomer composition of the products obtained in a reaction mixture
851 containing Bdh1p, 50 mM 2,3-pentanedione, the same components of reaction
852 solution as A, after the addition of 40 U of pure Bdh1p, together with 1-hexanol
853 as an internal standard, with a total reaction time of 20 h.

854 (C) Stereoisomer composition of the products obtained in a reaction mixture
855 containing Bdh1p, (2*R*,3*R*)-2,3-pentanediol, 5 mM NAD^+ and a NAD^+ -
856 regenerating system (50 mM α -ketoglutarate, 100 mM ammonium chloride and
857 6 U of glutamate dehydrogenase) in 33 mM sodium phosphate, pH 7, after the
858 addition of 6 U of Bdh1p, together with 1-hexanol as an internal standard, with a
859 total reaction time of 20 h. The inset shows the relative abundances of the ions
860 with an m/z of 59 (in black) and of 45 (in red), for the peak eluting at 7.1 min
861 from the chiral column. Small differences in retention times were due to running
862 some samples in different days.

863

864 **Figure 8. Stereoisomeric composition of the products from the**
865 **reduction/oxidation of 2,3-hexanedione/(2*R*,3*R*)-2,3-hexanediol with**
866 **Bdh1p.**

867 (A) Stereoisomer composition of the products obtained in a reaction mixture
868 containing Bdh1p, 2,3-hexanedione 50 mM, 1 mM NADH and an NADH-
869 regenerating system (100 mM sodium formate and 3 U of formate
870 dehydrogenase) in 33 mM sodium phosphate, pH 7, after the addition of 40 U of

871 Bdh1p, together with 1-hexanol as an internal standard, with a total reaction
872 time of 20 h.

873 (B) Stereoisomer composition of the products obtained in a reaction mixture
874 containing Bdh1p and (2*R*,3*R*)-2,3-hexanediol, 5 mM NAD⁺ and a NAD⁺-
875 regenerating system (50 mM α-ketoglutarate, 100 mM ammonium chloride and
876 6 U of glutamate dehydrogenase) in 33 mM sodium phosphate, pH 7, after the
877 addition of 6 U of Bdh1p with 1-hexanol as an internal standard, with a total
878 reaction time of 20 h.

879 (C) Relative abundances of the ions with an *m/z* of 55 (in black) and of 45 (in
880 red), for the peak eluting at 11 min from the chiral column.

881 (D) Relative abundancies of the ions with an *m/z* of 45 (in red) and of 55 (in
882 black), for the peak eluting at 10.7 min from the chiral column.

883

884 **Figure 9. Reaction schemes for the oxidation and reduction of (2*R*,3*R*)-2,3-**
885 **pentanediol and 2,3-pentanedione by Bdh1p.**

886 The scheme accounts for the relative abundances of (*R*)-3-hydroxy-2-
887 pentanone and (*R*)-2-hydroxy-3-pentanone in the reduction of 2,3-pentanedione
888 and in the oxidation of (2*R*,3*R*)-2,3-pentanediol with the C-3 position being the
889 most reactive center in both directions. The discontinuous lines correspond to
890 putative pathways, that although not observed, it would be difficult to rule out
891 completely.

892

893 **Figure 10. Separation of the four hydroxy-pentanones and four hydroxy-**
894 **hexanones obtained upon racemization and isomerization of the products**

895 **obtained from the oxidations of (2R,3R)-2,3-pentanediol and (2R,3R)-2,3-**
896 **hexanediol by Bdh1p.**

897 (A) 40 mM 2,3-pentanedione and 40 mM 2,3-hexanedione were separately
898 reduced by 6 U of Bdh1p in the presence of 1 mM NADH, 100 mM sodium
899 formate and 4 U of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*, in 33 mM
900 sodium phosphate buffer pH 7. After 20 h of reaction, the products were
901 recovered by filtration on an Amicon column and the filtrates (containing the
902 (2R,3R)-2,3-diols) were subjected to an overnight oxidation by 6 U of Bdh1p in
903 the presence of 5 mM NAD⁺, 50 mM α -ketoglutarate, 100 mM ammonium
904 chloride and 6 U of glutamate dehydrogenase. The final reaction products were
905 made 1N in NaOH to induce racemization and isomerization and were loaded
906 (after chloroform extraction) on a β -cyclodextrin gas chromatography column
907 coupled to a mass spectrophotometer.

908 (B) Relative abundances of the ions with an m/z of 59 (in black) and of 45 (in
909 red), for the peaks eluting at 5.67, 5.72, 6.16 and 6.27 min from the chiral
910 column, labeled 1, 2, 3 and 4.

911 (C) Relative abundances of the ions with an m/z of 55 (in blue) and of 45 (in
912 red), for the peaks eluting at 9.03, 9.21, 9.59 and 10.31 min from the chiral
913 column, labeled 5, 6, 7 and 8.

914

915

Figure 1

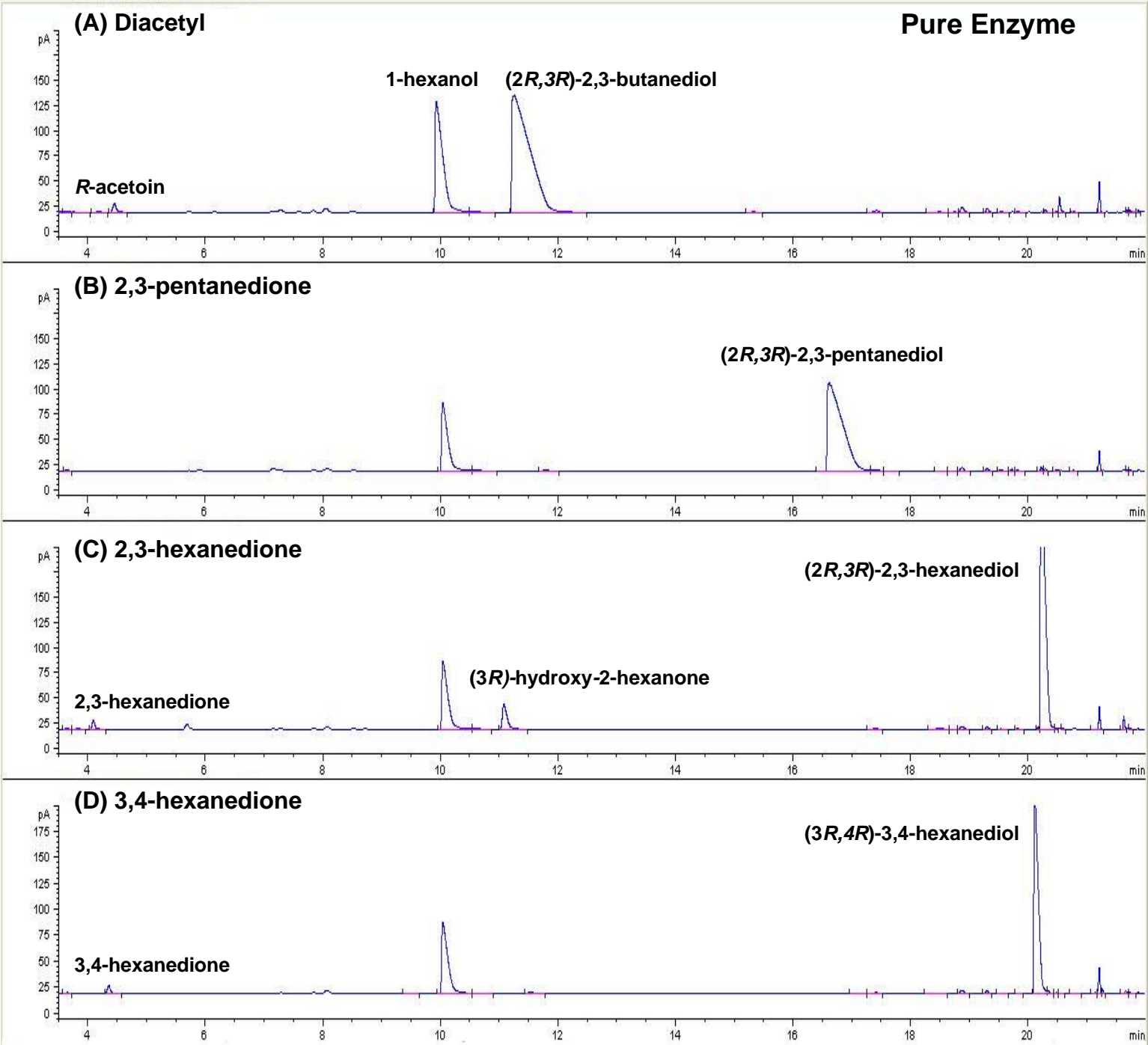


Figure 2

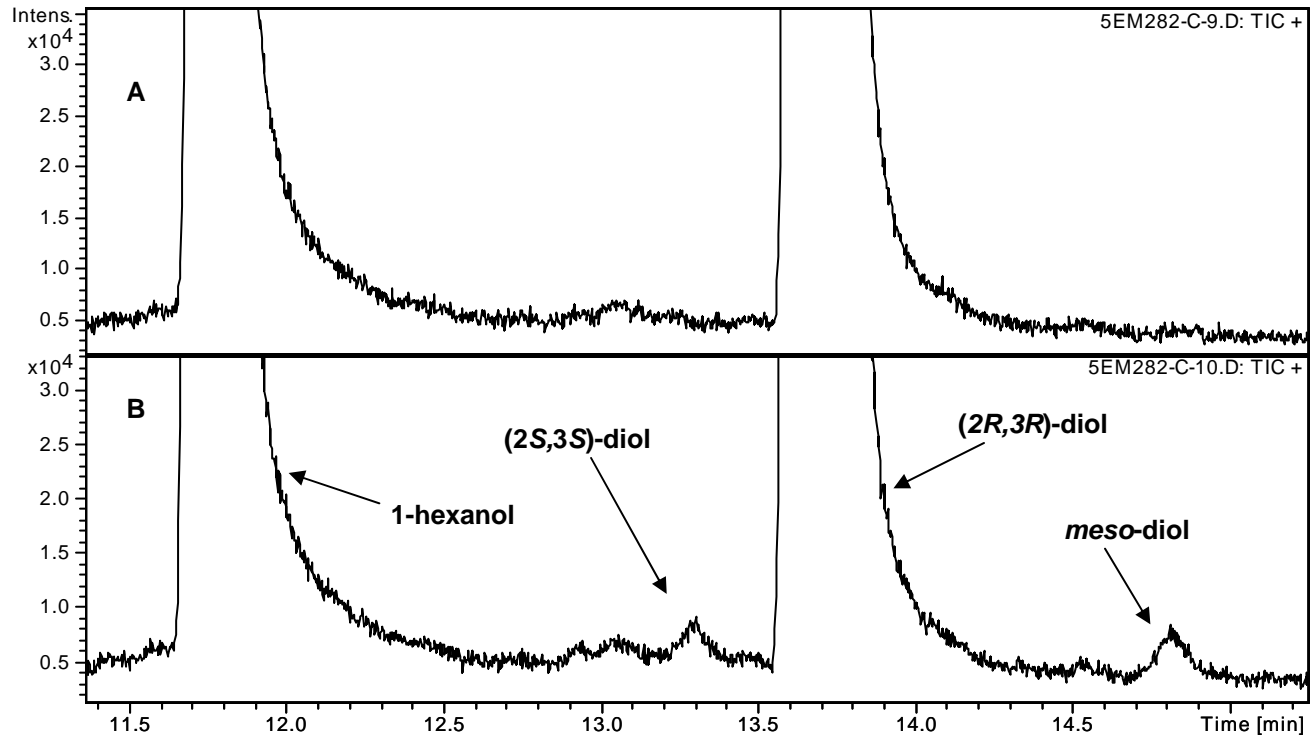
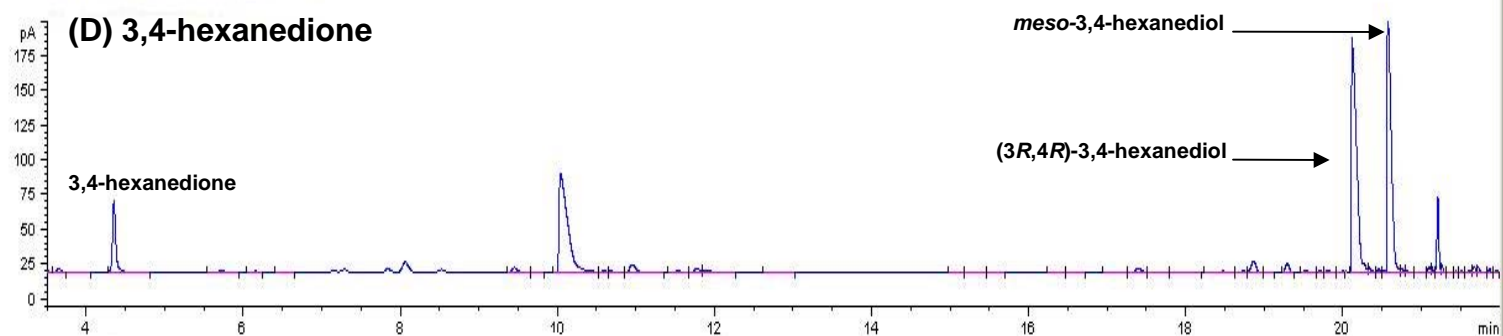
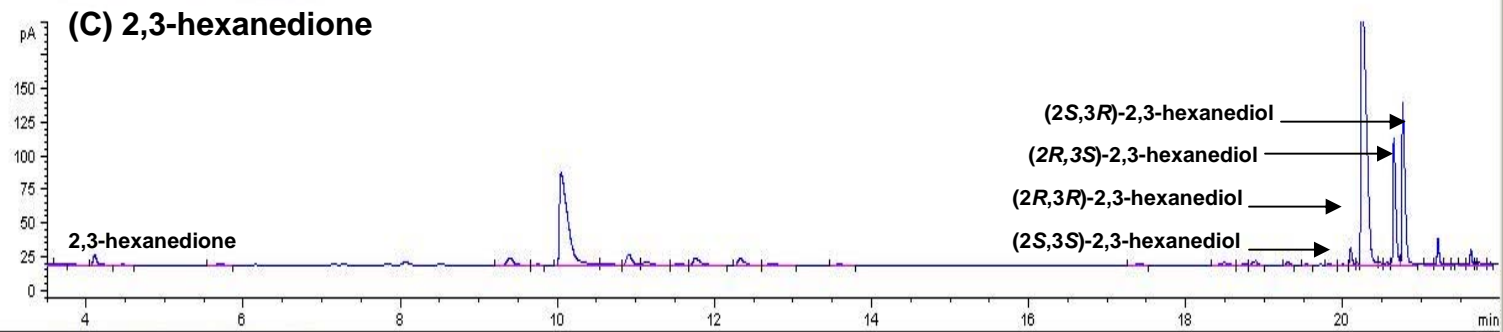
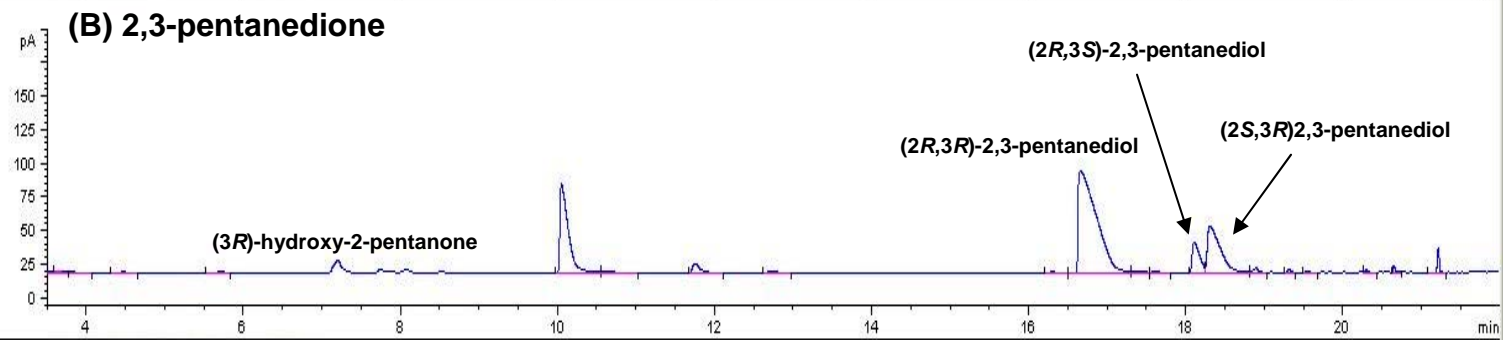
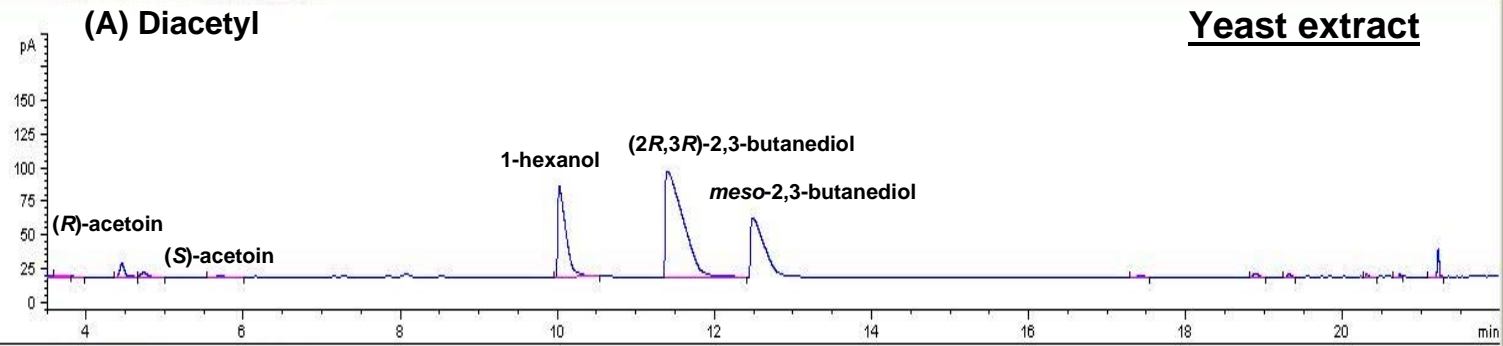


Figure 3



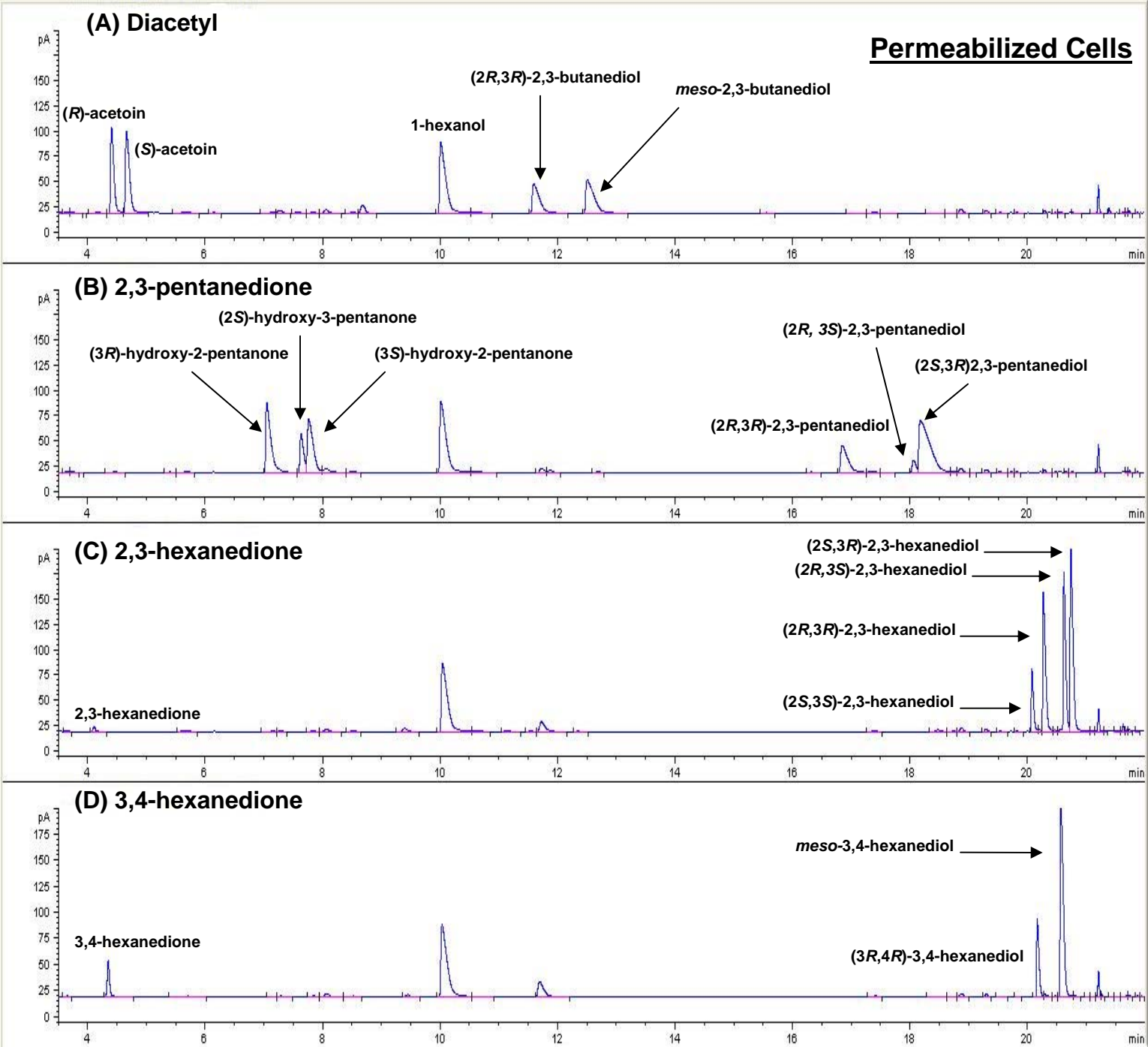


Figure 4

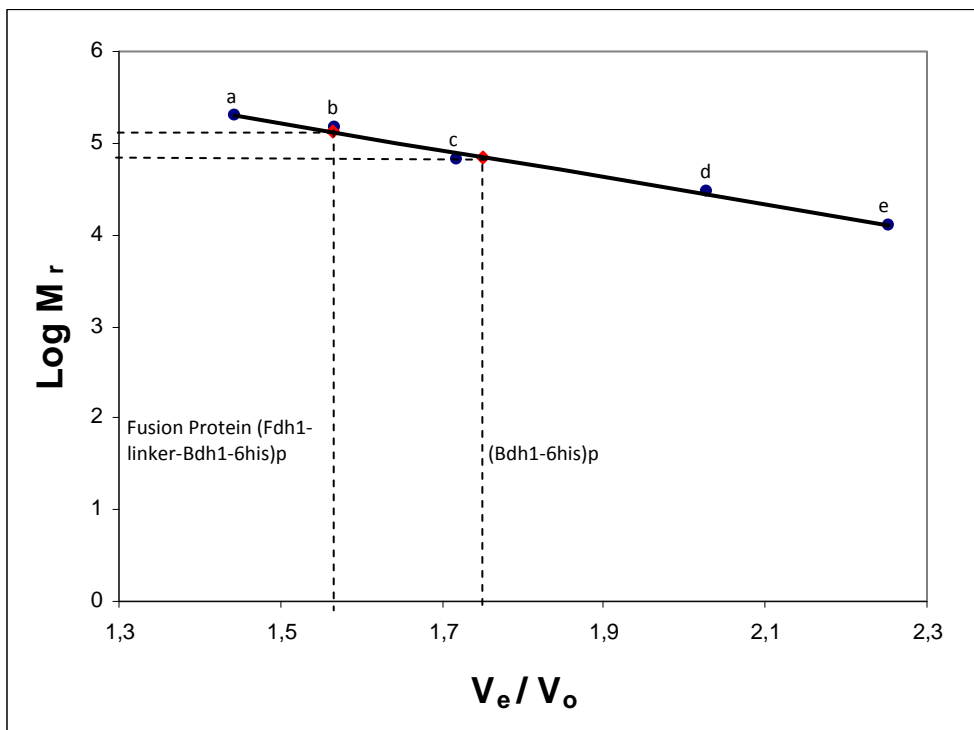
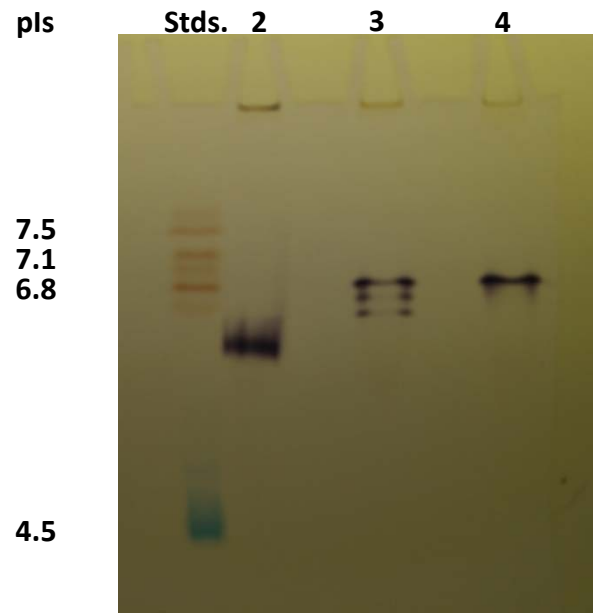
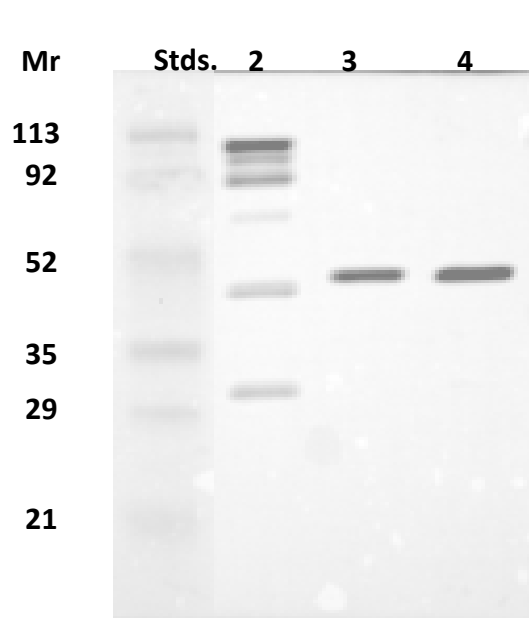


Figure 5

Fusion Protein [Fdh1-Bdh1(His)₆p]

Figure 6

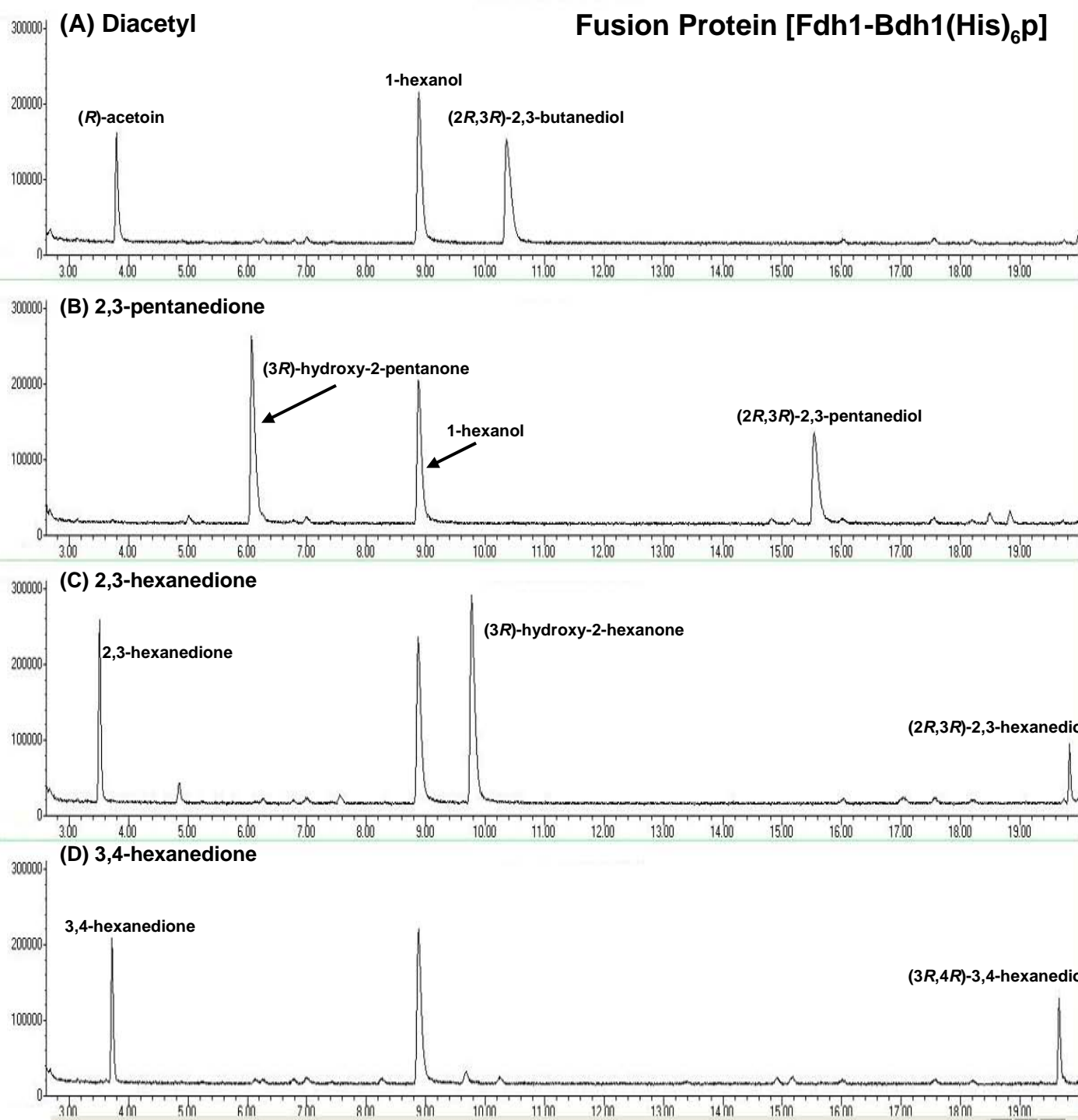
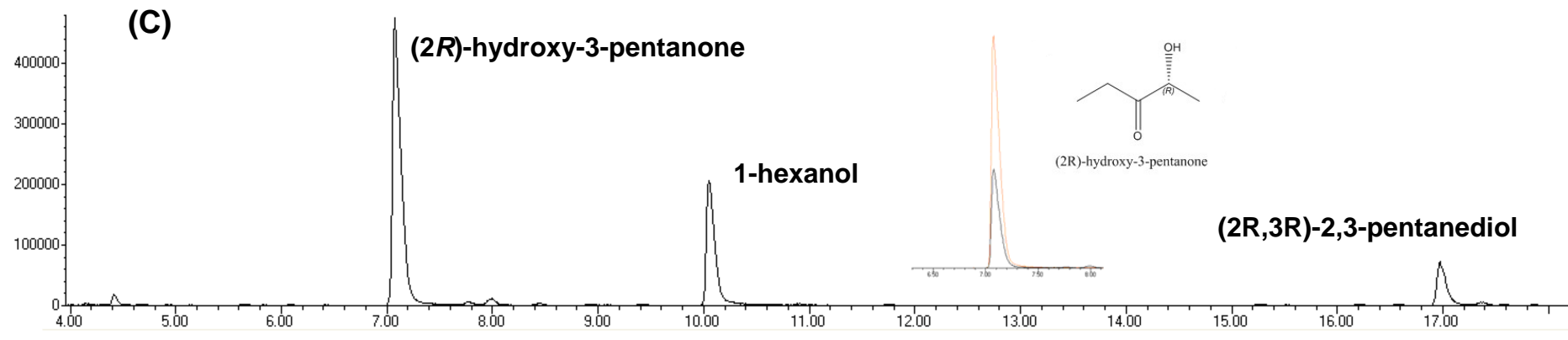
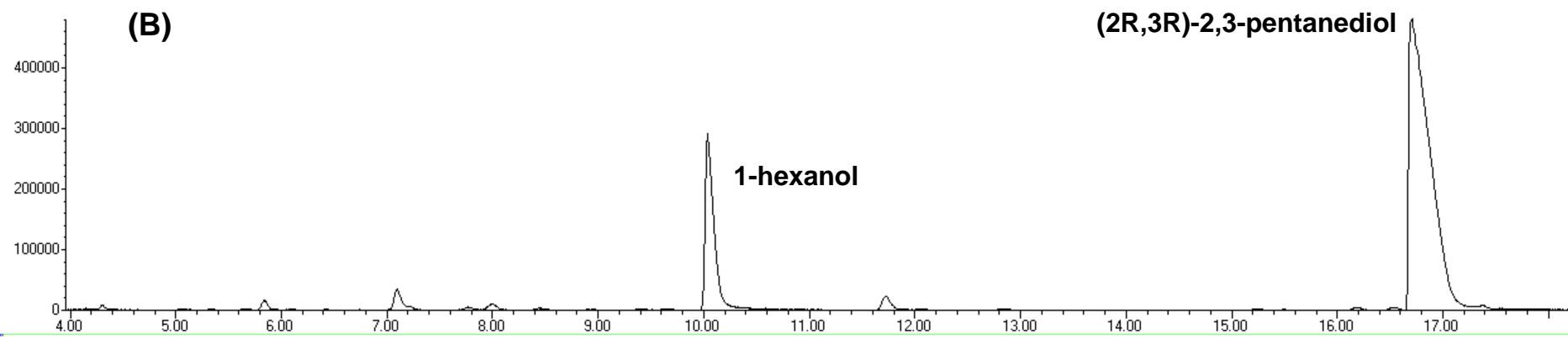
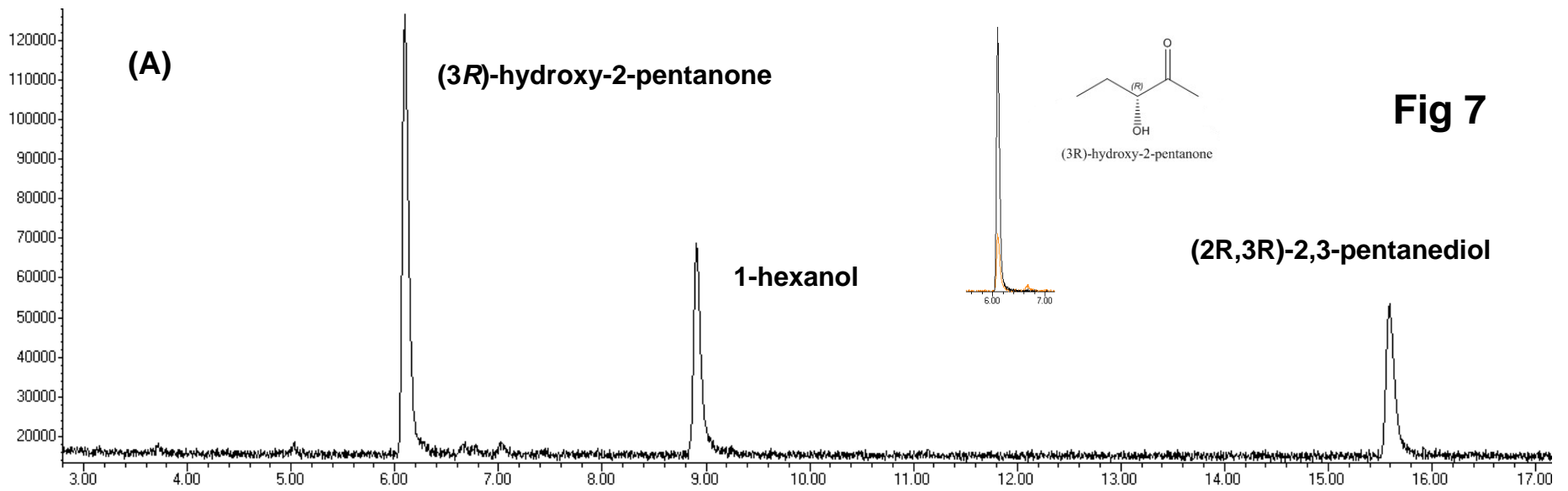
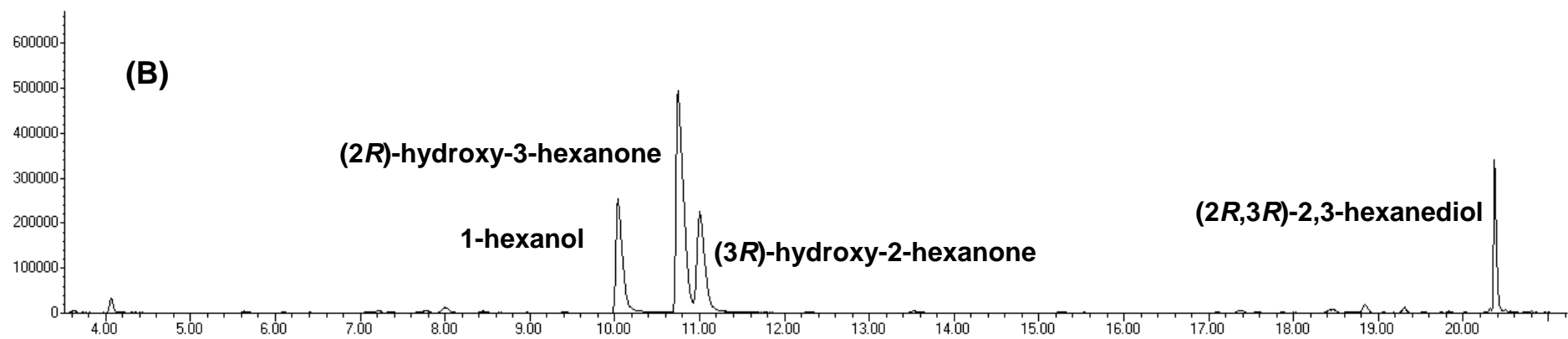
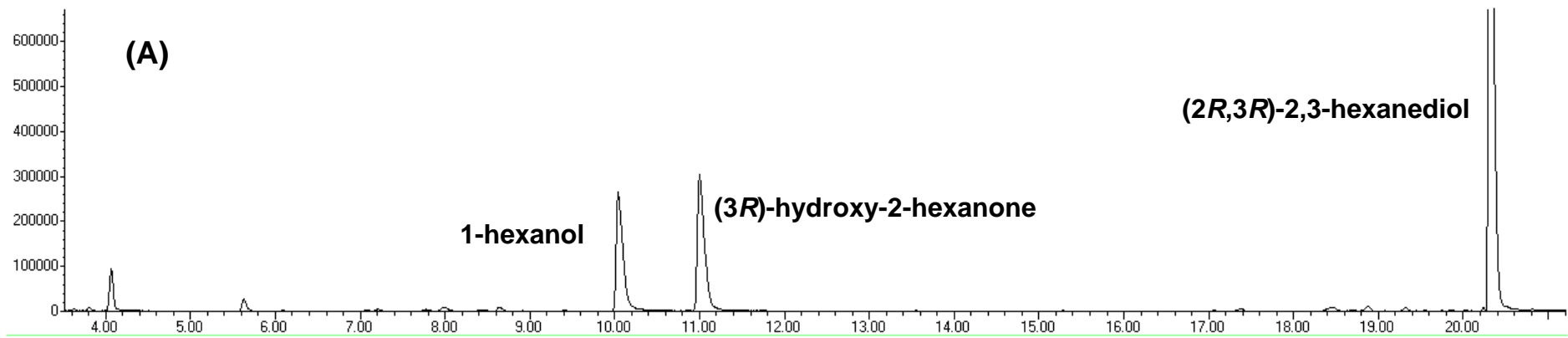
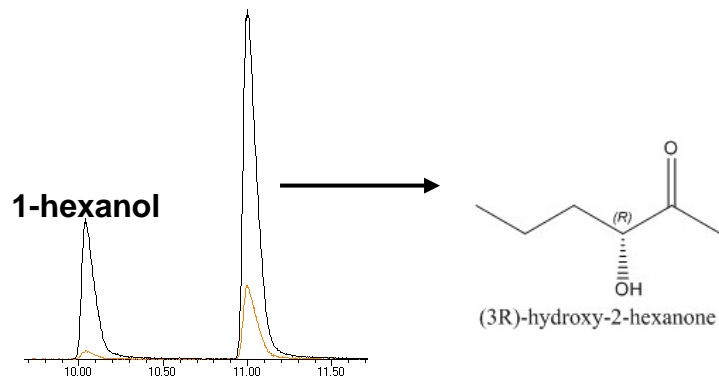


Fig 7





(C)



(D)

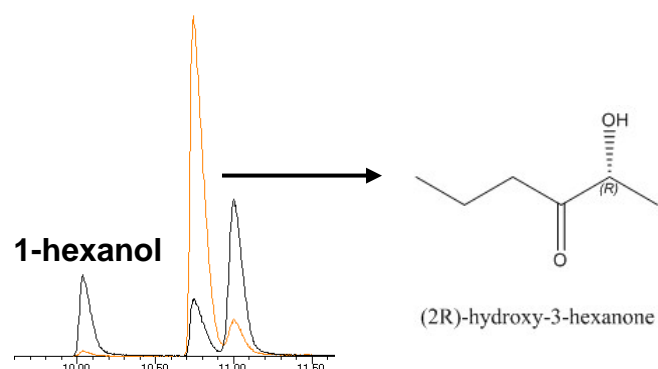


Figure 8

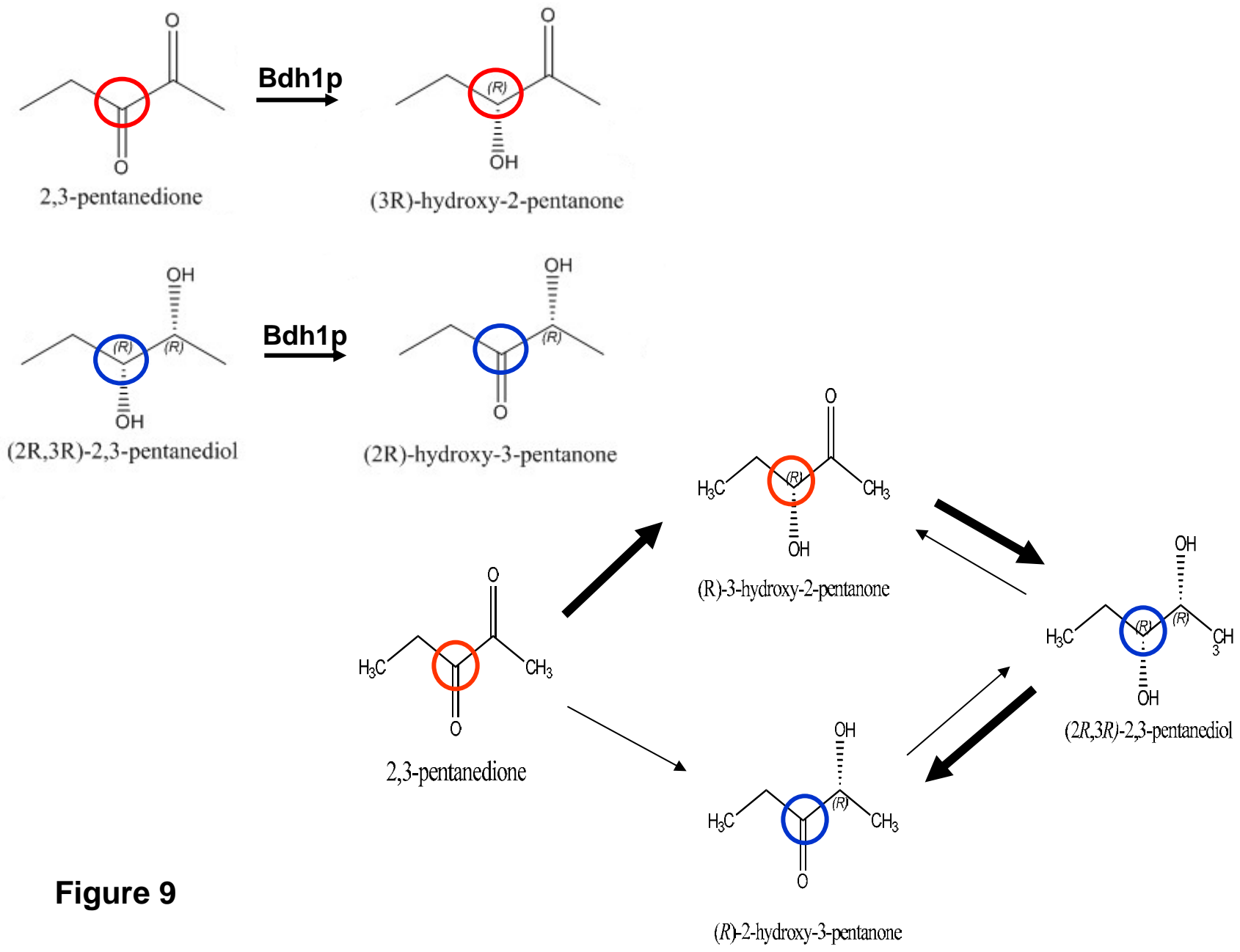
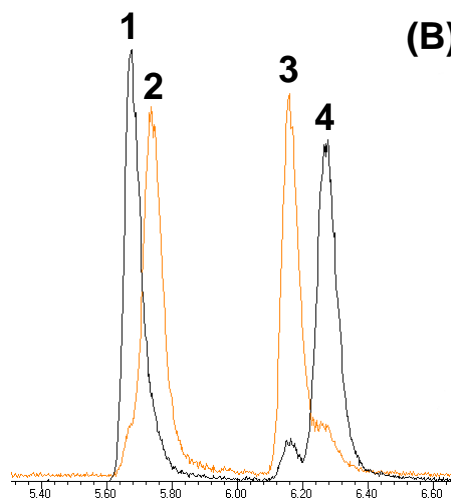
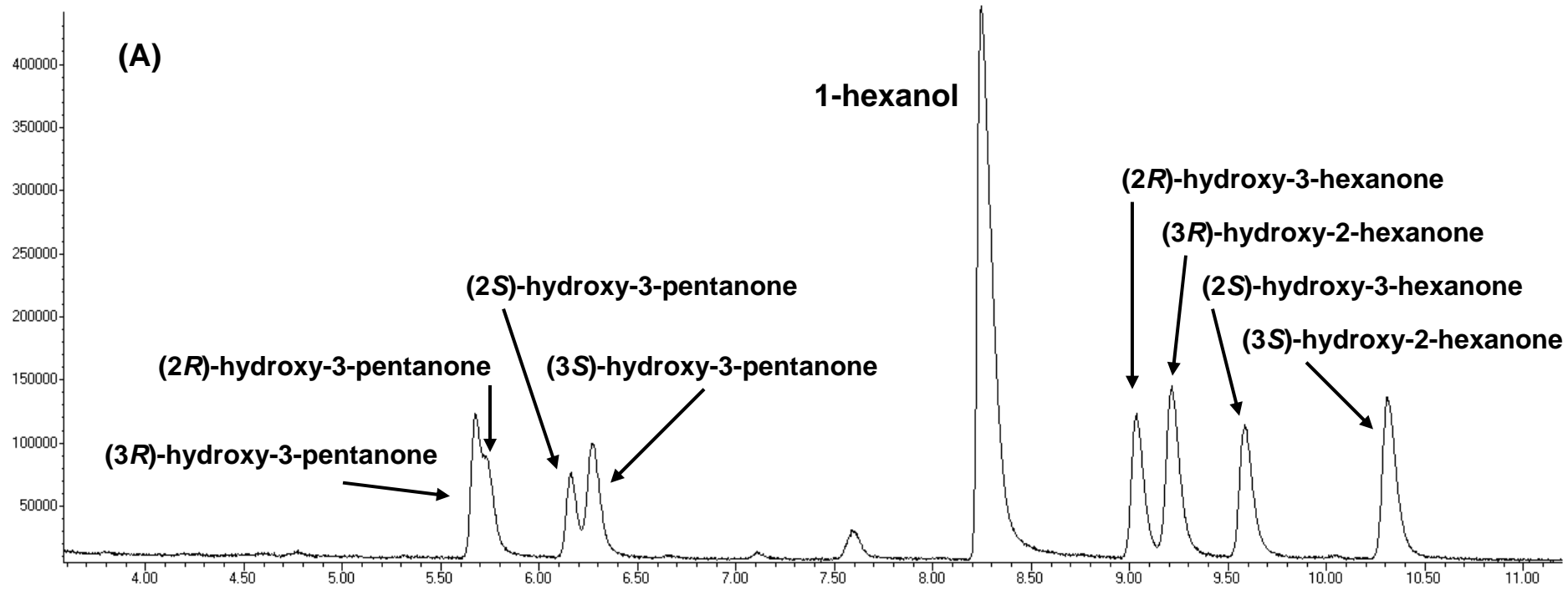
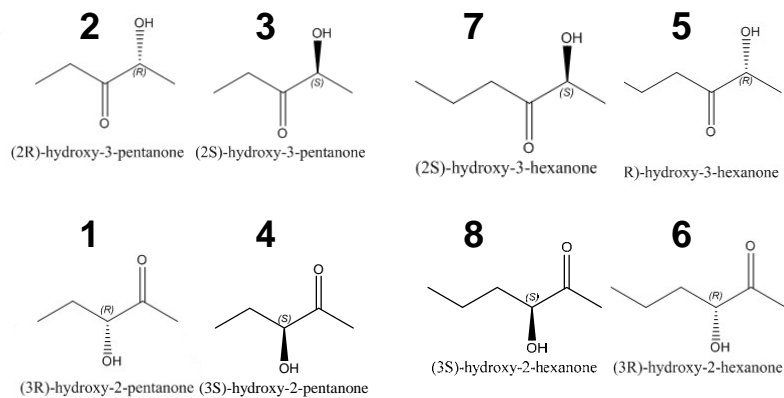


Figure 9



(B)



(C)

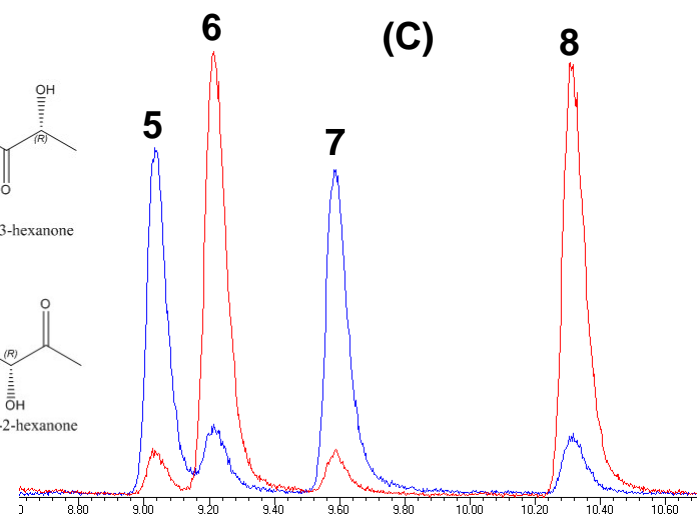


Figure 10

Role of *Saccharomyces cerevisiae* Oxidoreductases Bdh1p and Ara1p in the Metabolism of Acetoin and 2,3-Butanediol[∇]

Eva González,^{1†} M. Rosario Fernández,¹ Didac Marco,¹ Eduard Calam,¹ Lauro Sumoy,^{2‡}
Xavier Parés,¹ Sylvie Dequin,³ and Josep A. Biosca^{1*}

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain¹;
Microarray Laboratory, Center for Genomic Regulation, 88 Dr. Aiguader, E-08003 Barcelona, Spain²; and
UMR 1083 Sciences pour l'Oenologie, INRA, 2 Place Viala, F-34060 Montpellier Cedex 1, France³

Received 29 June 2009/Accepted 26 November 2009

NAD-dependent butanediol dehydrogenase (Bdh1p) from *Saccharomyces cerevisiae* reversibly transforms acetoin to 2,3-butanediol in a stereospecific manner. Deletion of *BDH1* resulted in an accumulation of acetoin and a diminution of 2,3-butanediol in two *S. cerevisiae* strains under two different growth conditions. The concentrations of (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol are mostly dependent on Bdh1p activity, while those of (meso)-2,3-butanediol are also influenced by the activity of NADP(H)-dependent oxidoreductases. One of them has been purified and shown to be D-arabinose dehydrogenase (Ara1p), which converts (R/S)-acetoin to meso-2,3-butanediol and (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol. Deletion of *BDH2*, a gene adjacent to *BDH1*, whose encoded protein is 51% identical to Bdh1p, does not significantly alter the levels of acetoin or 2,3-butanediol in comparison to the wild-type strain. Furthermore, we have expressed Bdh2p with a histidine tag and have shown it to be inactive toward 2,3-butanediol. A whole-genome expression analysis with microarrays demonstrates that *BDH1* and *BDH2* are reciprocally regulated.

Acetoin and 2,3-butanediol are minor products generated by *Saccharomyces cerevisiae* during alcohol fermentation. Their sensory impacts on wine are poorly documented. Acetoin may affect the wine bouquet, although its perception threshold in wine is relatively high, around 150 mg/liter (21, 31). On the other hand, 2,3-butanediol is odorless (33) and cannot be expected to appreciably affect the sensory quality of wine. However, the compound may contribute to the wine body (28).

Acetaldehyde, pyruvate, and α -acetolactate are the main precursors of acetoin in *S. cerevisiae*. Acetoin can be formed from acetaldehyde and/or pyruvate through an anomalous reaction of pyruvate decarboxylase. Thus, although its main activity is to irreversibly decarboxylate pyruvate to acetaldehyde, it can also catalyze carbon-carbon bond formation, yielding acetoin from pyruvate and/or acetaldehyde (2, 4). In addition, α -acetolactate would produce acetoin through its nonenzymatic decarboxylation to diacetyl and subsequent reduction to acetoin through the action of several NADH- and NADPH-dependent oxidoreductases (12). However, the situation is more complex in wine fermentation, where other yeasts and bacteria display supplementary enzymatic activities capable of producing both acetoin and 2,3-butanediol (1, 27).

We have previously characterized a butanediol dehydrogenase (Bdh1p) as a medium-chain dehydrogenase/reductase (MDR) that can reversibly transform *R*-acetoin and *S*-acetoin to (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and meso-2,3-butanediol, respectively, in a NAD(H)-dependent reaction (10). *BDH2* is a gene adjacent to *BDH1* whose uncharacterized protein product (Bdh2p) shares 51% sequence identity with Bdh1p. To evaluate the *in vivo* roles of Bdh1p and Bdh2p, we compared the levels of several extracellular metabolites in cultures of wild-type and deficient strains. The results show that, although Bdh1p is the main enzyme in 2,3-butanediol production [essentially the (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol stereoisomer], some meso-2,3-butanediol is still produced by the *bdh1* Δ strains. We have characterized Ara1p as an oxidoreductase that can reduce racemic acetoin to meso-2,3-butanediol and (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol in the presence of NADPH.

Furthermore, we have overexpressed Bdh2p with a histidine tag at its carboxyl terminus and have shown it to be inactive toward acetoin and 2,3-butanediol. A microarray study indicated that *BDH1* and *BDH2* are reciprocally regulated under the conditions studied.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Restriction enzymes and T4 DNA ligase were from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Vent polymerase was from New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA). DNA oligomers were synthesized and purified by Sigma-Genosys (Haverhill, United Kingdom). Chemicals were purchased from Fluka, Aldrich, or Sigma (Saint Louis, MO) and were of the highest available quality. Formate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase were from Sigma.

Yeast and bacterial strains. *Escherichia coli* XL-1 blue (Stratagene, La Jolla, CA) or DH5 α was used for cloning experiments. The *S. cerevisiae* organisms used were derived from four laboratory strains with different genetic backgrounds: FY834 α (*MAT α his3 Δ 200 ura3-52 leu2 Δ 1 lys2 Δ 202 trp1 Δ 63*) (38); CEN.PK2-1C (*MAT α ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3 Δ 1 MAL2-8c SUC2*) (36); WCG4-11/22a (*MAT α pre1-1 pre2-2 ura2 leu2-3,112 his3-115*), a yeast strain with an impaired

* Corresponding author. Mailing address: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Phone: 34-93-581 3070. Fax: 34-93-581 1264. E-mail: josep.biosca@uab.es.

† Present address: Functional Genomics Core Facility, Institut de Recerca Biomèdica, Baldiri Reixac, 10-12 (PCB), 08028 Barcelona, Spain.

‡ Present address: Institute of Predictive and Personalized Medicine of Cancer, Crta. Can Ruti, Camí de les Escoles s/n, 08916 Badalona, Spain.

[∇] Published ahead of print on 4 December 2009.

proteasome (23); and WV36-405 (*MATa ura3-52 trp1 adh1Δ adh2Δ adh3 adh4::TRP1*), constructed by Wolfgang Vogel (Neuherberg, Germany), an *Adh*⁻ strain. The mutant strains FY *bdh1Δ*, FY *bdh2Δ*, FY *bdh1Δ bdh2Δ*, CEN *bdh1Δ*, CEN *bdh2Δ*, CEN *bdh1Δ bdh2Δ*, WCG4-11/22a *bdh1Δ*, and WV36-405 *bdh1Δ* were constructed by disrupting the *BDH1* and *BDH2* genes from the parental strains by PCR-based gene targeting with the *kanMX4* (19) and *natMX4* (9) markers, respectively (see below).

Plasmids, DNA manipulations, cloning techniques, and transformation methods. All DNA manipulations were performed under standard conditions, as described previously (30). *E. coli* plasmid DNA was obtained by using a commercial kit provided by Sigma. The disruption of the *BDH1*, *BDH2*, and *ARAI* genes was done by the one-step gene replacement method (29) using three DNA fragments containing *kanMX4* and *natMX4* flanked by 40 nucleotides identical to those of the coding regions of *BDH1*, *BDH2*, and *ARAI*. These DNA fragments were obtained from three PCRs by using the oligonucleotides 5' GGA ACT AAA AAA AGT TTT AAT TAA TTA TGA GAG CTT TGG CCG TAC GCT GCA GGT CGA C 3' and 5' CGC GAG GGG CCC CAA ATA TTA TTT TGT CAT TAC TTC ATT TTC GAT GAA TTC GAG CTC G 3' with the plasmid pUG6 (11) as a template (to delete *BDH1*), the oligonucleotides 5' GCA ATA AGA ATA ACA ATA AAT TCA TTG AAC ATA TTT CAG ACG TAC GCT GCA GGT CGA CGG 3' and 5' ACC GCG GGA TTA ACA CGA GAA CGT GAG TAC TCA ATCA ACA AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG 3' with plasmid pAG25 (9) (to delete *BDH2*), and the oligonucleotides 5' TCA ATT GAT AAA AGC GTC TTG ATT TTA ATC AAC TGC TAT CAG CTT GCC TTG TCC CC 3' and 5' AAG AAG CGA ACT AAA TAA AGT GAA AAT AAA GTC GTT GTC GCT CGT TTT CGA CAC T 3' with plasmid pAG25 (9) (to delete *ARAI*). The conditions used for the PCRs were those described for the amplification of the *kanMX4* and *natMX4* genes (9, 37). The linear fragments were introduced into the yeast strains by the lithium acetate method (13), and the transformants were selected on YPD agar medium (1% Bacto yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glucose-containing 2% agar) supplemented with 200 μg/ml G418 from Gibco (Minnesota) or 100 μg/ml clonNAT (Hans-Knöll Institute für Naturstoffforschung, Jena, Germany). The deletions of the *BDH1*, *BDH2*, and *ARAI* genes were checked by appropriate PCRs of the genomic DNA obtained from several transformants. *BDH1* and *BDH2* (tagged with His₆ at their C termini) were amplified by PCR by using genomic DNA from the strain FY834α as a template and cloned in the pYES2 vector from Stratagene (La Jolla, CA). The primers 5' GCG GGA TCC ATG AGA GCT TTG GCA TAT TTC AAG AAG GG 3' and 5' GCG GAA TTC TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG CTT CAT TTC ACC GTG ATT GTT AGG 3' were used to clone *BDH1*, and the primers 5' GCG GGA TCC ATG AGA GCC TTA GCG TAT TTC GGT AAA GG 3' and 5' CGG GAA TTC TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG TGT GTG ACG CAG TTT AGC CTC G 3' were used to clone *BDH2*. The amplified fragments and the pYES2 vector were digested with BamHI and EcoRI (to clone *BDH1* and *BDH2*). Both constructs (pYES2-*BDH1*-6His and pYES2-*BDH2*-6His) were sequenced to verify that no mutations had been introduced by the Vent polymerase enzyme. Both constructs, together with constructs that did not contain the His tag, were used to transform the yeast strains by the lithium acetate method. *ARAI* (tagged with His₆ at its C terminus) was amplified by PCR by using genomic DNA from the strain FY834α as a template and cloned in the pYES2 vector. The primers 5' CGG CGG ATC CAT CAT GTC TTC TTC AGT AGC CTC AAC C 3' and 5' GCG TCT AGA TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATA CTT TAA ATT GTC CAA GTT TGG 3' were used to histidine tag and clone *ARAI*, with BamHI and XbaI digestion in pYES2.

Media and growth conditions. Aerobic cultures were grown at 28°C on a rotary shaker (250 rpm) in YPD medium containing 20% glucose, starting with an inoculum at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.05. Anaerobic growth was performed in 200-ml fermentors equipped with fermentation locks in YPD containing 15% glucose at 28°C with continuous stirring (230 rpm). The expression of Bdh1p (see below) was followed under aerobic conditions in YPD and in 1% yeast extract, 2% peptone, and 2% galactose or 3% ethanol. The FY834α(pYES2-*BDH1*-6His), FY834α(pYES2-*BDH2*-6His), WCG4-11/22a (pYES2-*BDH1*-6His), and WCG4-11/22a(pYES2-*BDH2*-6His) strains were grown in synthetic complete medium lacking uracil (SC-Ura) in the presence of 2% galactose.

Analytical methods. The levels of glucose, succinate, glycerol, pyruvate, ethanol, acetate, acetaldehyde, acetoin, and 2,3-butanediol were measured in the growth media at different times after inoculation of yeast cells by previously described methods (22). To determine the levels of the different acetoin and 2,3-butanediol stereoisomers, the supernatants of the yeast cultures (together with 1-hexanol as an internal standard) were extracted by chloroform, as reported previously (17), and analyzed by gas chromatography (GC). The different

acetoin and 2,3-butanediol stereoisomers were resolved on a chiral column (Supelco β-DEX 120; 30 m in length; 0.25-mm inner diameter) coupled to a Hewlett-Packard gas chromatograph equipped with a mass spectrophotometer as a detector, under the conditions reported previously (10).

MALDI-TOF MS analyses. The Coomassie-stained protein spots were excised from the acrylamide gel, destained, and digested with 25 ng sequencing-grade trypsin (Promega) for 3 h at 37°C. All mass spectrometry (MS) samples were prepared by mixing 1 μl of sample with the same volume of a solution of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (10 mg/ml in 30% acetonitrile, 60% water plus 0.1% trifluoroacetic acid) and were spotted onto a ground-steel plate (Bruker) and allowed to air dry at room temperature. Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectra were recorded in the positive ion mode on an Ultraflex time of flight (TOF) instrument (Bruker). Ion acceleration was set to 20 kV. All mass spectra were externally calibrated for each matrix using a standard peptide mixture. For peptide mass fingerprint analysis, a Mascot search engine (Matrix Science) was used with the following parameters: mass spectrometry protein sequence database, a maximum of 2 missed trypsin cleavages, cysteine carbamidomethylation and methionine oxidation as variable modifications, and 50-ppm tolerance. Positive identifications with *P* values higher than 0.05 were accepted.

Ara1p purification. The yeast extract from strain WV36-405 *bdh1Δ* (pYES2-*ARAI*-6His) was used to purify Ara1p-6His. The extract was loaded on a Ni-Sepharose column (GE Healthcare, Sant Cugat, Spain) that was extensively washed with 50 mM sodium phosphate, pH 7.4, containing 150 mM NaCl and 20 mM imidazol. Ara1p-6His was eluted in the presence of the same buffer, but with 0.5 M imidazol. The active fractions were recovered and loaded on a PD10 column (GE Healthcare, Sant Cugat, Spain) to change the buffer to 20 mM KP, pH 7. The desalted fraction was then loaded on a hydroxyapatite column and eluted with a gradient of 20 mM KP, pH 7 (50 ml), and 600 mM KP, pH 7 (50 ml). The active fractions were pooled and loaded on a PD10 column to change the buffer composition to 100 mM HEPES, pH 7, 50 mM NaCl.

Enzymatic activities and coenzyme-regenerating systems. Butanediol dehydrogenase activity was determined spectrophotometrically by measuring the change of absorbance at 340 nm and 25°C, corresponding to the oxidation of NADH ($\epsilon_{340} = 6,220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). One unit of activity (U) corresponded to 1 μmol of NAD formed per minute. The standard specific activity was measured in 33 mM sodium phosphate buffer at pH 7 in the presence of 50 mM (*R/S*)-acetoin and 0.2 mM NADH. For the characterization of the products generated by the acetoin reductase activity from yeast extracts, cells were homogenized by agitation with glass beads in 33 mM sodium phosphate, pH 7. Assay mixtures were prepared with 50 mM racemic acetoin and 0.2 mM NADH (or NADPH), together with the following coenzyme-regenerating systems: 100 mM sodium formate (at pH 7) and 3 U of formate dehydrogenase were used for NADH regeneration, and 50 mM glucose-6-phosphate and 10 U of glucose-6-phosphate dehydrogenase were used for NADPH regeneration.

Western blots and isoelectric focusing (IEF) gels. Bdh1-6His and Bdh2-6His were detected by Western blotting by using a mouse monoclonal anti-His₆ antibody (Roche). Briefly, FY834, FY834 *bdh1Δ*, and WCG4-11/22a transformed with plasmids pYES2-*BDH1*-6His and pYES2-*BDH2*-6His were grown in SC-Ura and galactose. Cells at an OD₆₀₀ of 2.5 were collected at the early logarithmic (OD₆₀₀ = 0.5) and stationary (OD₆₀₀ = approximately 5) phases and treated with 0.2 M NaOH as described previously (16). The extracts were loaded in a 10% SDS-PAGE gel that was blotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore) and treated with the primary anti-His₆ antibody. To visualize the relevant bands, the blot was treated with a secondary goat anti-mouse antibody (Bio-Rad) conjugated to horseradish peroxidase (HRP), and the bands were detected by chemiluminescence with luminol and peroxide with the aid of a Bio-Rad Chemidoc XRS.

To visualize the butanediol dehydrogenase activities of crude extracts, we used precast isoelectric focusing (pH 3 to 9) gels from Bio-Rad (Criterion). After the samples were loaded, the voltage was set at 100 V for 1 h, followed by 250 V for 1 h and 500 V for half an hour. BDH activities were visualized on the gel by activity staining with 0.5 M 2,3-butanediol (a mixture of isomers), 2 mM NAD, 0.08 mg/ml of phenazine methosulfate (PMS), and 0.8 mg/ml of nitroblue tetrazolium (NBT) and quantified by densitometry (25).

Microarray analysis of global gene expression. Yeast cells from wild-type (FY834) and mutant (FY *bdh1Δ*, FY *bdh2Δ*, and FY *bdh1Δ bdh2Δ*) strains were grown for 40 h under respirofermentative conditions at 20% glucose, and total RNA was extracted by using the RiboPure Yeast kit from Ambion, following the manufacturer's instructions.

Five hundred nanograms of total RNA was reverse transcribed, amplified, labeled by *in vitro* transcription with Cy3 or Cy5 using a Low Input Linear Amplification Kit (Agilent 5184-3523), and hybridized following the manufac-

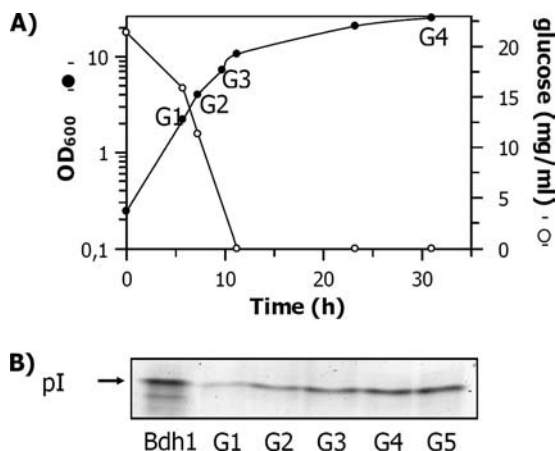


FIG. 1. Yeast growth and zymogram showing the Bdh1p activity of the FY834 strain extracts at different times under respirofermentative conditions. (A) Growth curve of the FY834 yeast strain (in rich medium at 2% glucose) under respirofermentative conditions superimposed on the glucose concentrations of the supernatants. (B) Zymogram of the yeast extracts prepared at the times indicated in the growth curve. Sample G5 was taken at an OD of 34. Bdh1p bands on the gel were visualized by activity staining with (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and NAD.

turer's instructions (Agilent Gene expression two-color 60-mer oligonucleotide microarray-processing protocol, version 5.7, March 2008) on yeast whole-genome microarrays (G2519-AMADID-015072). The oligonucleotide probes used to measure the expression of the *BDH1* and *BDH2* genes were 5' CAC AAG GAA TCC AAC GTT AAG ATT CTA TTG ACG CCT AAC AAT CAC GGT GAA ATG AAG TAA 3' and 5' CGG AAA GAT CAA GAA AGA CTA CGA GAA TCA ATA AAC GAG GCT AAA CTG CGT CAC ACA TGA 3'.

For comparison of single-deletion mutants to the wild-type strain, four-biological-replicate experiments were performed, whereas two biological replicates were used for the comparison of the double-deletion mutant to the wild type. For all biological-replicate pairs, samples labeled with two different dyes were cohybridized on two separate microarrays with dye swapping to correct for dye bias effects. Thus, eight microarray hybridizations were processed for each of the two single-mutant-versus-wild-type comparisons and four for the double-mutant-versus-wild-type comparison, totaling 20 array data sets.

Fluorescence images were obtained using an Agilent G2565BA scanner at 100% photomultiplier tube intensity and 100% laser power settings and quantified with GenePix 6.0 software (Axon, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) using the irregular-feature-finding option. The extracted raw data were processed using the Limma package developed within the Bioconductor project in the R statistical programming environment (8). After normexp background subtraction was applied (24), the two channels on each array were balanced by lowess normalization using 0.3 as the span parameter with reduced weights in control and poor-quality spots, followed by a scaling step to make all arrays comparable, using the Limma package in the R environment (32). For statistical assessment of differential gene expression, the Statistical Analysis of Microarrays (SAM) algorithm was used by applying the samr library in R (34). All software was run in a Web interface implementation of the R-based software (J. Lozano, L. Opatowski, G. Canton, E. Gonzalez, B. Minana, M. Vilardell, X. Pastor, M. Hummel, and L. Sumoy, unpublished data).

RESULTS

Expression of Bdh1p during yeast growth. The FY834 strain was grown in 2% glucose, and the Bdh1p activity was determined by a zymogram (Fig. 1). The intensities of the bands revealed a 3-fold increase of the Bdh1p activity in the stationary phase, when glucose was not detectable in the medium, compared to the activity in the exponential phase. The Bdh1p specific activity of the crude extract at an OD of 2 (G1 in Fig. 1) was 0.05 U/mg, while the samples at an OD of 20 (G4) and

at an OD of 34 (G5) yielded a specific activity of 0.17 U/mg. The densitometries in the zymogram analysis of samples grown in galactose and ethanol media, in both exponential and stationary phases, were similar to the intensities of the Bdh1p activity bands from the sample grown in 2% glucose in the stationary phase, when no glucose was detectable in the medium (data not shown).

Metabolite levels under anaerobic and respirofermentative conditions. Metabolite levels were analyzed in strains FY834, FY *bdh1*Δ, FY *bdh2*Δ, FY *bdh1*Δ *bdh2*Δ, CEN.PK2-1C, CEN *bdh1*Δ, CEN *bdh2*Δ, and CEN *bdh1*Δ *bdh2*Δ. In addition to the OD₆₀₀ and glucose concentration (Fig. 2), the levels of succinate, pyruvate, ethanol, acetate, acetaldehyde, and glycerol were also similar between the strains, under both anaerobic and respirofermentative conditions (results not shown). However, clear differences between strains were observed for acetoin and 2,3-butanediol (Fig. 2). An inverse relationship between acetoin and 2,3-butanediol accumulation for all the strains and growth conditions was clearly shown. Thus, at the end of both respirofermentative and anaerobic growth curves, an accumulation of acetoin by the FY *bdh1*Δ and FY *bdh1*Δ *bdh2*Δ strains paralleled a small amount of 2,3-butanediol. Moreover, the yeast strains FY834 and FY *bdh2*Δ accumulated 2,3-diols, while only traces of acetoin could be measured in the supernatants of their growth media. While deletion of *BDH1* impaired the conversion of acetoin to 2,3-butanediol, deletion of *BDH2* seemed to alter the 2,3-butanediol levels only marginally (Fig. 2B). The levels of acetoin and 2,3-butanediol (per mmol glucose) were approximately 2-fold higher under respirofermentative than under anaerobic conditions.

A chiral column in a gas chromatograph, coupled with a mass spectrometer, was used to identify the acetoin and 2,3-butanediol stereoisomers accumulated in the growth media of different strains. Figure 3 shows the levels of the stereoisomers at the end of the growth curve (71 h after inoculation) for the FY strains. Two different patterns could be discerned from the four yeast strains. The first pattern, represented by the FY834 and FY *bdh2*Δ strains (Fig. 3A and C), showed accumulation of (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol (2/3 of the total 2,3-butanediol) and *meso*-2,3-butanediol (1/3), with traces of (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol and acetoin. The second pattern, represented by the FY *bdh1*Δ and FY *bdh1*Δ *bdh2*Δ strains (Fig. 3B and D), shows accumulation of *R*-acetoin (2/3 of the total acetoin level), *S*-acetoin (1/3), and a minor amount of *meso*-2,3-butanediol, with traces of (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol. The stereoisomer composition of the CEN.PK2-1C strains was similar in all cases to that of the corresponding FY strains (results not shown). Thus, the deletion of *BDH1* resulted in the accumulation of acetoin and the disappearance of (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol, while a small amount of *meso*-2,3-butanediol remained.

The production of the *meso*-isomer in the absence of Bdh1p demonstrated the existence of a different enzyme activity that was able to synthesize the compound. To further characterize this activity, we studied the NADH- and NADPH-dependent acetoin reductase activities of the FY834 and FY *bdh1*Δ strains. Thus, crude extracts of those strains (after 40 h of growth under respirofermentative conditions) were assayed for their acetoin reductase activities (Fig. 4). The FY *bdh1*Δ strain did not produce any 2,3-butanediol when assayed with NADH (Fig. 4B) but produced *meso*-2,3-butanediol and (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol when as-

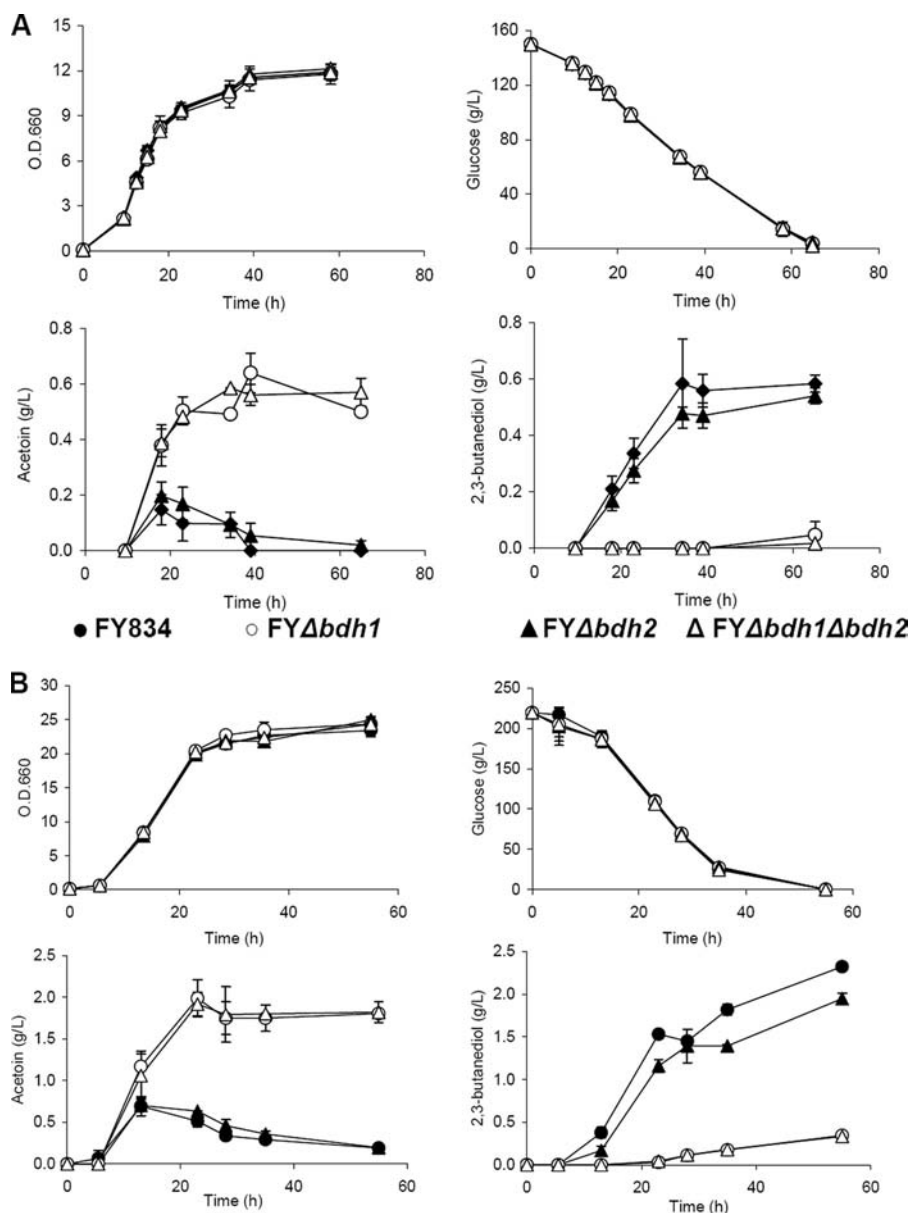


FIG. 2. Concentrations of glucose, acetoin, and 2,3-butanediol in the growth media under anaerobic and respirofermentative conditions for the FY834 and derived *bdh1* Δ and *bdh2* Δ yeast strains. The FY834 (wild type), FY *bdh1* Δ , FY *bdh2* Δ , and FY *bdh1* Δ *bdh2* Δ strains were incubated in rich media containing 15% glucose at 28°C in 200-ml fermentors equipped with fermentation locks with continuous stirring (A) and in 20% glucose at 28°C in an orbital shaker at 250 rpm (B). The growth and compositions of the media were determined at different times. The error bars correspond to the standard deviations of three experiments.

sayed with NADPH (Fig. 4C). These results indicated the presence of an NADPH-dependent acetoin reductase activity with *S* specificity for acetoin. This putative activity would produce *meso*-2,3-butanediol from *R*-acetoin and (*2S,3S*)-2,3-butanediol from *S*-acetoin.

Partial purification and characterization of Ara1p as the NADPH-dependent oxidoreductase producing *meso*-2,3-butanediol. To characterize the enzyme(s) responsible for the production of *meso*-2,3-butanediol in the *bdh1* Δ strains, we used an extract of WV36-405 *bdh1* Δ yeast cells and followed their NADPH reductase activities through different purification steps (DEAE-Sepharose and red Sepharose chromatography).

The active fractions were pooled, concentrated, and loaded on an SDS gel. The more abundant bands were excised from the gel, digested with trypsin, and analyzed by MALDI-TOF, yielding Zwf1p, Oye2p, Erg19p, Ara1p, and Trr1p with a high probability score (results not shown). All of them except Erg19p are known to require NADP(H) for their activities, an expected result because of the use of red Sepharose [a resin used to purify NADP(H)-binding proteins] in the enrichment process. Since it is known that D-arabinose dehydrogenase (Ara1p) displays NADPH-dependent diacetyl reductase activity (14, 35), we decided to purify the enzyme and determine its acetoin reductase activity. We His tagged and purified Ara1p-

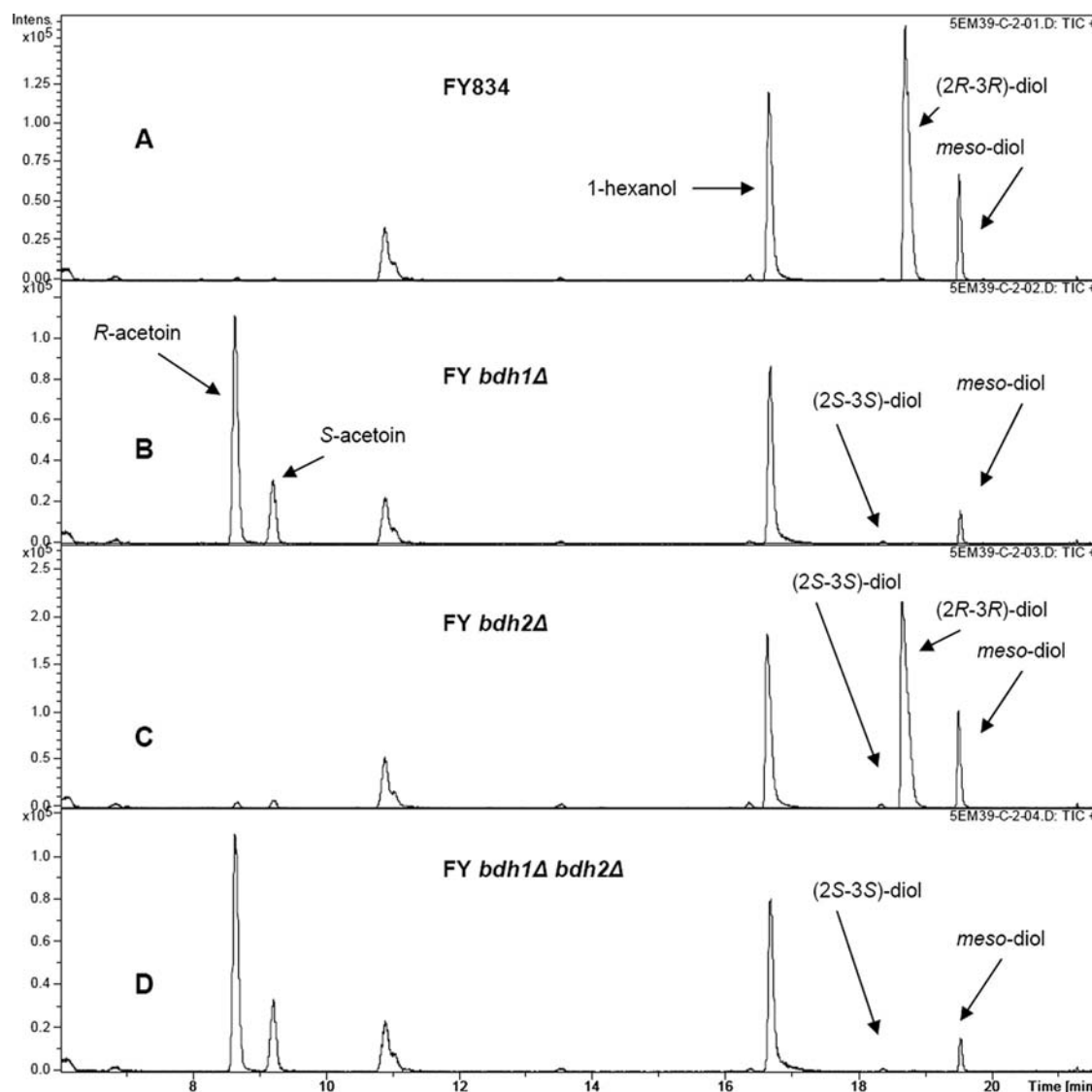


FIG. 3. Gas chromatography analysis of acetoin and 2,3-butanediol stereoisomers in the growth media under respirofermentative conditions. Rich media containing 20% glucose were inoculated with the FY834 (wild type) (A), FY *bdh1*Δ (B), FY *bdh2*Δ (C), and FY *bdh1*Δ *bdh2*Δ (D) strains. After 71 h of growth in an orbital shaker at 250 rpm and 28°C, the growth media were centrifuged and the supernatants were analyzed by gas chromatography.

6His from WV36-405 *bdh1*Δ(pYES2-*ARA1*-6His) through a Ni-nitrilotriacetic acid (NTA)-Sepharose column and a hydroxyapatite column. We characterized the products of the reaction between (*R/S*)-acetoin and Ara1p-6his in the presence of a NADPH-regenerating system by the use of a chiral column in a GC-MS system. Figure 5 shows that the reaction yielded *meso*-2,3-butanediol and (*2S,3S*)-2,3-butanediol, while no 2,3-butanediol was obtained in the control reaction mixture containing all the ingredients except Ara1p-6His.

2,3-Butanediol levels in the FY *bdh1*Δ and FY *bdh1*Δ *ara1*Δ strains. To ascertain the role of *ARA1* in the *in vivo* production of 2,3-butanediol, cultures of the strains FY834, FY *bdh1*Δ, and FY *bdh1*Δ *ara1*Δ were grown in triplicate under respirofermentative conditions on 20% glucose. After 70 h of growth, aliquots of the cultures were taken, extracted with chloroform (see Materials and Methods), and analyzed with a chiral column coupled to a gas chromatograph. The levels of (*2S,3S*)-

2,3-butanediol and *meso*-2,3-butanediol were 0.053 ± 0.005 g/liter and 0.18 ± 0.03 g/liter, respectively, for the FY *bdh1*Δ strain and 0.038 ± 0.001 g/liter and 0.120 ± 0.006 g/liter for the FY *bdh1*Δ *ara1*Δ strain. The concentrations of (*2R,3R*)-2,3-butanediol were almost undetectable for both strains. The levels of *R*-acetoin and *S*-acetoin were 1.305 ± 0.045 g/liter and 0.352 ± 0.013 g/liter for the FY *bdh1*Δ strain and 1.230 ± 0.045 g/liter and 0.345 ± 0.019 g/liter for the FY *bdh1*Δ *ara1*Δ strain. By comparing the mean values for the metabolites by Student's *t* test ($P < 0.05$), significant differences were found between the concentrations of (*2S,3S*)-2,3-butanediol ($t = 5.09$ and $P = 0.036$) and *meso*-2,3-butanediol ($t = 3.39$ and $P = 0.027$) in the FY *bdh1*Δ and FY *bdh1*Δ *ara1*Δ strains, but the differences were not significant for the acetoin levels.

Expression and enzymatic activities of Bdh2p. Since Fig. 2 suggests a mild effect on the 2,3-butanediol levels in the FY *bdh2*Δ strain compared to the FY strain, we decided to study

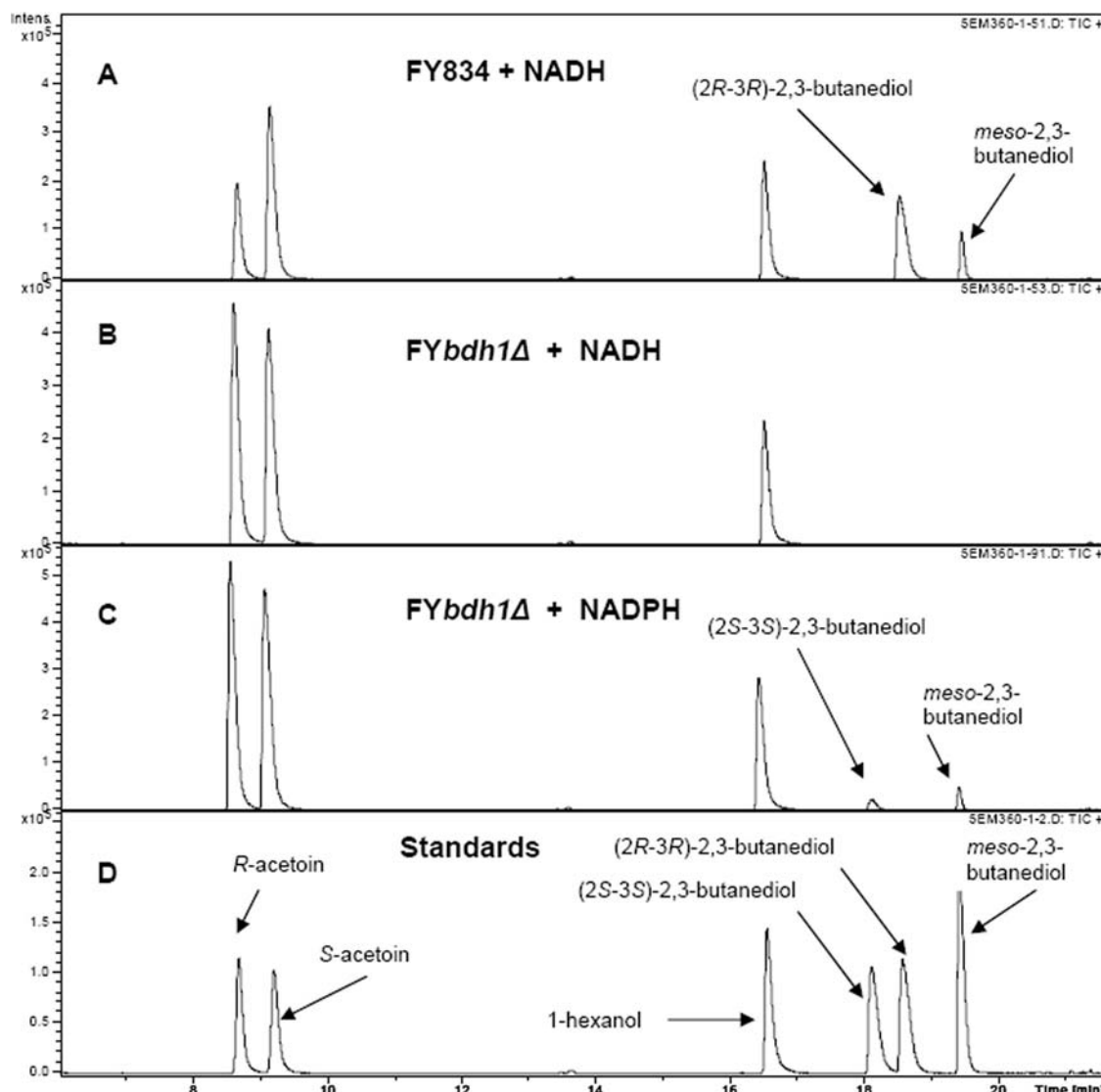


FIG. 4. Analysis by gas chromatography of NADH- and NADPH-dependent acetoin reductase activities of the FY834 (wild type) and FY *bdh1*Δ strain extracts. Yeast extracts were prepared from the corresponding cells 40 h after they were inoculated in rich medium containing 20% glucose under respirofermentative conditions. The extracts were incubated with 50 mM (*R/S*)-acetoin (racemic mixture) and 0.2 mM NADH (or NADPH), together with the corresponding coenzyme-regenerating system (see Materials and Methods). After 20 h of incubation, the reaction mixtures were analyzed by gas chromatography. (A) Analysis of the reaction mixture with the FY834 strain (with an NADH-dependent acetoin reductase specific activity of 0.20 U/mg), (*R/S*)-acetoin, NADH, and the NADH-regenerating system. (B) Analysis of the reaction mixture with the FY *bdh1*Δ strain, (*R/S*)-acetoin, NADH, and the NADH-regenerating system. (C) Analysis of the reaction mixture with the FY *bdh1*Δ strain (with an NADPH-dependent acetoin reductase specific activity of 0.030 U/mg), (*R/S*)-acetoin, NADPH, and the NADPH-regenerating system. (D) Analysis of the chloroform extract of a mixture composed of 10 mM *R*-acetoin, 10 mM *S*-acetoin, 20 mM (*2S,3S*)-2,3-butanediol, 20 mM (*2R,3R*)-2,3-butanediol, and 20 mM *meso*-2,3-butanediol, together with 1-hexanol as an internal standard.

the role of *BDH2* more directly in this respect. First, we measured the expression levels of *BDH1* and *BDH2* under respirofermentative conditions at 40 h after the inoculation (a time within the stationary phase, where clear differences in acetoin and 2,3-butanediol levels were found between strains). As Fig. 6 shows, both genes are reciprocally regulated: *BDH2* is expressed in the FY *bdh1*Δ strain (at approximately a 50% of its level in the FY strain). The data also indicate clear repression of *BDH1* in the FY *bdh2*Δ strain (the level of *BDH1* expression was approximately 20% of that in the FY strain). However, the levels of acetoin and 2,3-butanediol were much more affected

in the FY *bdh1*Δ strain than in the FY *bdh2*Δ strain. We decided to determine the putative butanediol dehydrogenase activity of Bdh2p in crude extracts of the FY *bdh1*Δ(pYES2-*BDH2*) and WV36-405 *bdh1*Δ(pYES2-*BDH2*) strains. The NADH-dependent acetoin reductase activity of the WV36-405 *bdh1*Δ(pYES2-*BDH1*) extract was 14.4 U/mg, while the corresponding cellular extracts of the WV36-405 *bdh1*Δ(pYES2-*BDH2*) and WV36-405 *bdh1*Δ(pYES2) strains were devoid of NADH-dependent acetoin reductase activity.

To explore whether Bdh2p was really expressed, we tagged Bdh2p with 6 histidines (in two constructs: N terminus, 6His-

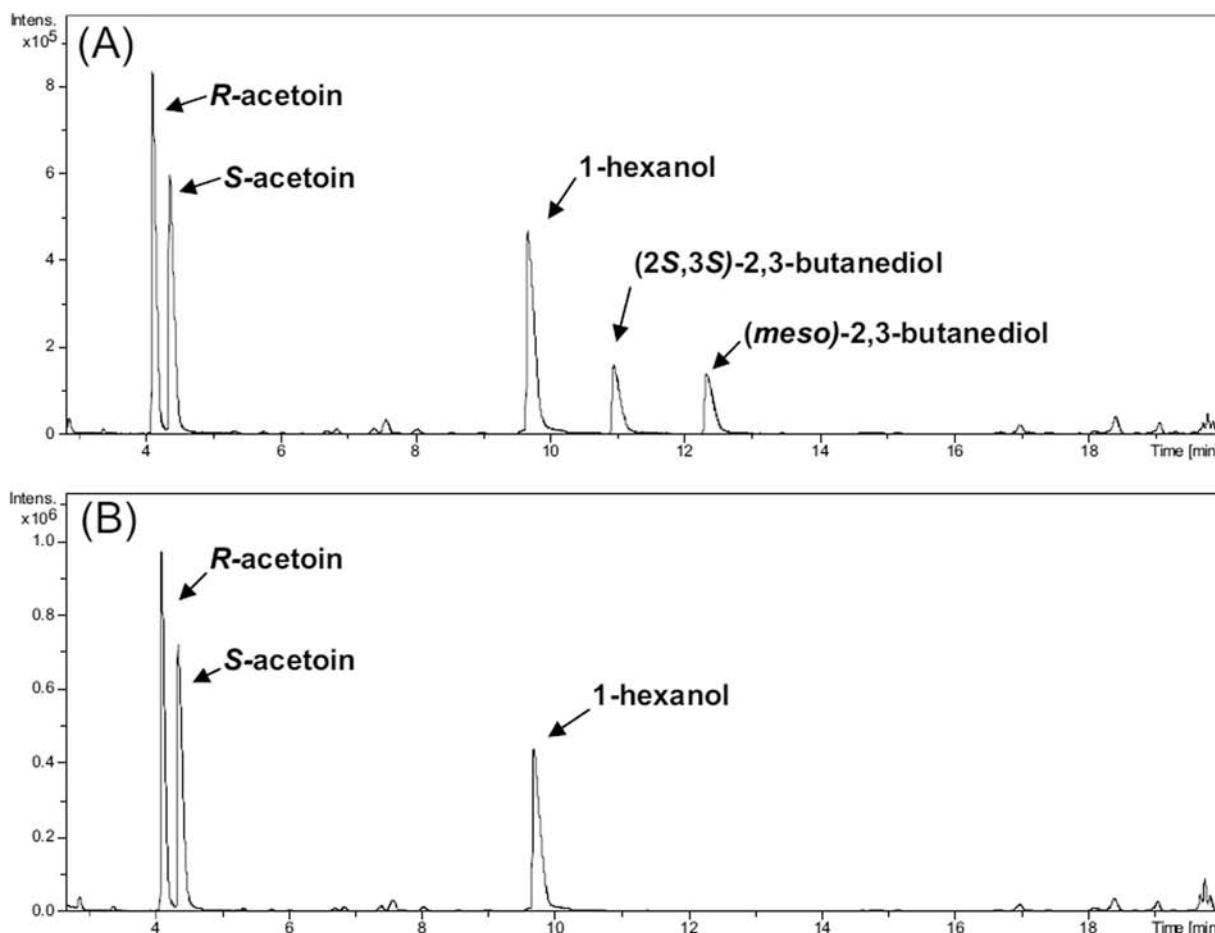


FIG. 5. The NADPH-dependent acetoin reductase reaction catalyzed by purified Ara1p-6His analyzed by gas chromatography. (A) Profile of reaction products obtained from Ara1p-6his. Ara1p-6His (0.07 U measured as NADPH-dependent acetoin reductase activity at 50 mM acetoin and 0.2 mM NADPH) was incubated for 24 h with 50 mM (*R/S*)-acetoin, 1 mM NADPH, 50 mM glucose-6-phosphate, and 10 U of glucose-6-phosphate dehydrogenase. The reaction mixture, together with 1-hexanol as an internal standard, was extracted with chloroform as described previously (13). (B) Profile of reaction products obtained in the control reaction. The reaction mixture contained the same reagents as in panel A, except for Ara1p-6His.

Bdh2, and C terminus, Bdh2-6His) and studied the presence of the tagged proteins by means of an anti-His antibody in different yeast genetic backgrounds. Positive results were obtained when Bdh2p was tagged with 6 histidines in its C ter-

minus (Bdh1p was also tagged at its C terminus as a control). Figure 7 shows the expression patterns of Bdh1-6His and Bdh2-6His in the yeast strains FY834 (lanes 5 to 8) and FY834 *bdh1*Δ (lanes 9 to 12) and in a proteasome-impaired yeast

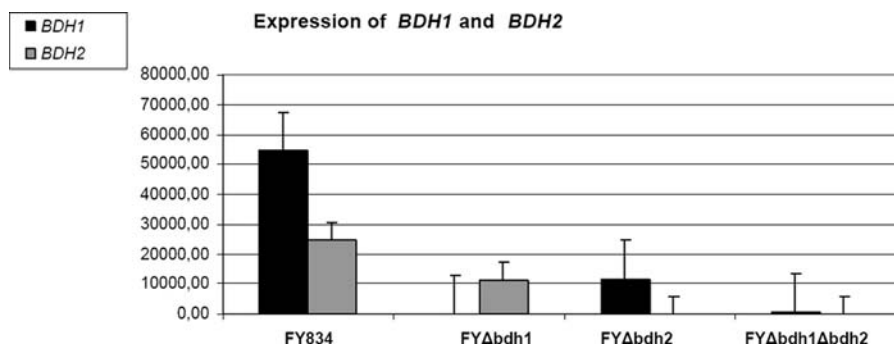


FIG. 6. Expression levels of *BDH1* and *BDH2* in the FY834 (wild type) and derived *bdh1*Δ and *bdh2*Δ yeast strains. The FY834, FY *bdh1*Δ, FY *bdh2*Δ, and FY *bdh1*Δ *bdh2*Δ strains were incubated in rich media containing 20% glucose at 28°C in an orbital shaker at 250 rpm for 40 h. Total RNA was extracted, and the expression levels of *BDH1* and *BDH2* were monitored from the intensities of the respective signals, as indicated in Materials and Methods. The means of the expression levels are given in arbitrary units, together with their standard deviations.

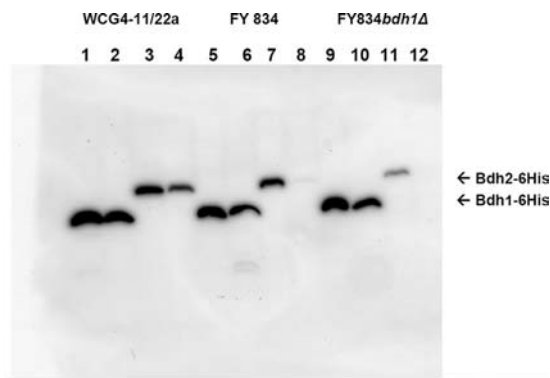


FIG. 7. Western blot analysis of the expression of Bdh1p-6His and Bdh2p-6His in different yeast strains and growth phases. Crude extracts from yeast cells at an OD_{600} of 2.5 (strains FY834, FY834 *bdh1*Δ, and WCG4-11/22a transformed with plasmids pYES2-*BDH1*-6His and pYES2-*BDH2*-6His) were grown in SC-Ura and galactose. The cells were collected in the early logarithmic ($OD_{600} = 0.5$; lanes 1, 3, 5, 7, 9, and 11) and stationary ($OD_{600} =$ approximately 5; lanes 2, 4, 6, 8, 10, and 12) phases and treated with 0.2 M NaOH as described previously (34). Lanes 1, 2, 5, 6, 9, and 10 show the expression levels of Bdh1p-6His in the cell extracts of strains WCG4-11/22a (lanes 1 and 2), FY834 (lanes 5 and 6), and FY834 *bdh1*Δ (lanes 9 and 10). Lanes 3, 4, 7, 8, 11, and 12 show the expression of Bdh2p-6His in the cell extracts of strains WCG4-11/22a (lanes 3 and 4), FY834 (lanes 7 and 8), and FY834 *bdh1*Δ (lanes 11 and 12).

strain (WCG4-11/22a [lanes 1 to 4]). The expression of both proteins was followed in the early logarithmic (lanes 1, 3, 5, 7, 9, and 11) and stationary (lanes 2, 4, 6, 8, 10, and 12) phases. Bdh2-6His was more stable in the proteasome-impaired strain (compare lanes 3 and 4 with 7 and 8 and with 11 and 12) and in the early logarithmic phase (compare lanes 3 and 4). We could not detect the expression of 6His-Bdh2p (Bdh2p tagged at its N terminus) in any of the strains checked (results not shown). Therefore, we decided to overexpress Bdh2-6His (and Bdh1-6His as control) in a WCG4-11/22a *bdh1*Δ yeast strain. The yeast strains were grown in galactose to the early logarithmic phase, and after the cells were broken, the crude extracts were subjected to Western blotting, BDH activity determination, and IEF analysis. Although both Bdh2p-6His and Bdh1p-6His were detected by Western blotting (Fig. 8A, lanes 4 and 5; the higher M_r of Bdh2p-6His was due to its 34-amino-acid extension at the C terminus in respect to Bdh1p-6His), only Bdh1-6His showed butanediol dehydrogenase activity in the IEF gel and in the spectrophotometer. The IEF gel visualized by BDH activity showed that Bdh1p-6His had a higher pI than Bdh1p (the experimental value was close to the predicted pI value of 6.2), probably due to the His₆ tag (Fig. 8B, lanes 1 and 2). Lanes 1 and 2 (Fig. 8B) also show a multiplicity of bands, probably due to different oxidation states of the proteins. Bdh2 and Bdh2-6His did not show activity on the IEF gels (Fig. 8B, lanes 4 and 5). The specific activity of the extract overexpressing Bdh1p was 25 U/mg, while the one overexpressing Bdh1-6His yielded 1.6 U/mg. No acetoin reductase activity (and no 2,3-butanediol dehydrogenase) was found in the extracts overexpressing neither Bdh2 nor Bdh2-6His. The lack of activity of Bdh2p toward 2,3-butanediol (from the IEF and spectrophotometer determinations) and acetoin (from the spectrophotometer) was correlated with the acetoin content in the super-

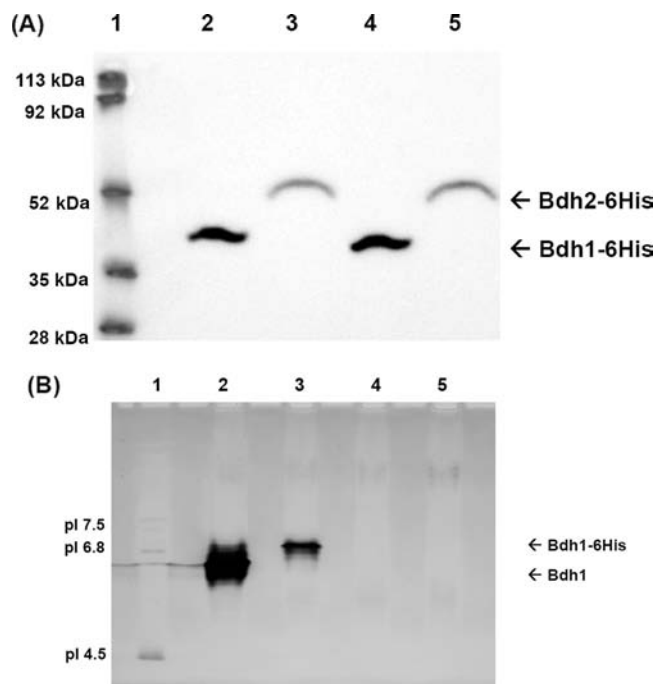


FIG. 8. Western blot and isoelectric focusing analyses of the expression of Bdh1p-6His and Bdh2p-6His. (A) Western blot analysis. Yeast cells at an OD of ~10 from strains WCG4-11/22a *bdh1*Δ (pYES2-*BDH1*-6His) (lane 2) and WCG4-11/22a *bdh1*Δ (pYES2-*BDH2*-6His) (lane 3) were treated as described previously (34) for Western blot analysis with an anti-His antibody. Lane 4, 54 μg of protein from extract WCG4-11/22a *bdh1*Δ (pYES2-*BDH1*-6His); lane 5, 57 μg of protein from extract WCG4-11/22a *bdh1*Δ (pYES2-*BDH2*-6His); lane 1, molecular mass standards. (B) Isoelectric focusing analysis. Shown is an isoelectric focusing gel (pH 3 to 9) of Bdh1p, Bdh1p-6His, Bdh2p, and Bdh2p-6His visualized by butanediol dehydrogenase activity. Lane 1, pI standards; lane 2, 75 μg of protein from extract WCG4-11/22a *bdh1*Δ (pYES2-*BDH1*) containing 1.9 U of BDH activity; lane 3, 81 μg of protein from extract WCG4-11/22a *bdh1*Δ (pYES2-*BDH1*-6His) containing 0.15 U of BDH activity; lane 4, 81 μg of protein from extract WCG4-11/22a *bdh1*Δ (pYES2-*BDH2*) with no BDH activity; lane 5, 86 μg of protein from extract WCG4-11/22a *bdh1*Δ (pYES2-*BDH2*-6His) with no BDH activity.

natants of the FY, FY *bdh1*Δ, FY *bdh2*Δ, and FY *bdh1*Δ *bdh2*Δ strains, where no difference could be attributed to the deletion of *BDH2* under the experimental conditions studied. Since the deletion of *BDH2* has been found to affect the expression of *BDH1*, the small effect on 2,3-butanediol concentrations observed in the FY *bdh2*Δ strain (Fig. 2B) could be an indirect effect due to the lower level of *BDH1* expression, although the repression of *BDH1* does not necessarily result in less Bdh1p.

DISCUSSION

We showed above that Bdh1p is induced upon glucose depletion. This augmentation of Bdh1p activity is supported by microarray data reporting upregulation of *BDH1* during stationary phase and upon the diauxic shift (5, 7). On the other hand, we observed that the production of acetoin and 2,3-butanediol catalyzed by Bdh1p increased under respirofermentative conditions compared to anaerobic conditions. A similar

effect of the oxygen supply during yeast fermentation on the formation of 2,3-butanediol through acetoin was previously observed (15). This change was attributed to reduction of the NADH availability by oxygen, decreasing the rate of glycerol and ethanol formation and resulting in the accumulation of acetaldehyde and derivative compounds. As a whole, these data emphasize the role of Bdh1p in the metabolic remodeling associated with the transition from fermentation to respiration.

We have previously shown the enantioselectivity of Bdh1p toward the reduction of the carbonyl groups from acetoin, leading to an *R*-alcohol (10). Thus, (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol and *meso*-2,3-butanediol are formed by Bdh1p from *R*-acetoin and *S*-acetoin, respectively. We now demonstrate that Bdh1p accounts for most of the (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol produced under fermentative and respirofermentative conditions in *S. cerevisiae* growing in rich media containing 15 to 20% glucose. Thus, almost no (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol was detected in the culture medium of the FY *bdh1Δ* or CEN *bdh1Δ* strain. The fact that the levels of *meso*-2,3-butanediol did not decrease to the same degree can be attributed to an independent oxidoreductase activity that was shown to be NADPH dependent (Fig. 4). This finding agrees with the fact that certain strains have been found to produce *meso*-2,3-diol without producing (2*R*,3*R*)-2,3-butanediol (20), suggesting that a different enzymatic activity produces *meso*-2,3-diol without the need to accumulate the (2*R*,3*R*) isomer. The MALDI-TOF analysis of a partially purified active fraction suggested that Ara1p could be involved. Purified His-tagged Ara1p was able to produce *meso*-2,3-butanediol and (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol from (*R/S*)-acetoin (Fig. 5). Ara1p would be selective toward the acetoin carbonyl group, leading to an *S*-alcohol. This is the first report of acetoin reductase activity by Ara1p with characterization of the enantiomeric form of the products. Thus, Ara1p could contribute to the production of *meso*-2,3-butanediol and (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol from acetoin by the *bdh1Δ* strains. We tested this hypothesis directly by comparing the *in vivo* levels of acetoin and 2,3-butanediol in a FY *bdh1Δ* strain and a FY *bdh1Δ ara1Δ* strain. While the differences between the acetoin concentrations were not significant, the levels of both isomers, (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol and *meso*-2,3-butanediol, were significantly lower in the FY *bdh1Δ ara1Δ* strain than in the FY *bdh1Δ* strain. However, given the fact that the differences were small, the data suggest a minor role of Ara1p in the production of 2,3-butanediol under these conditions. Another relevant conclusion from the work is that the double-mutant strain still produces (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol and *meso*-2,3-butanediol. Since five more aldoketoreductases have been described in yeast (3), it is possible that some of them could play additional roles in the production of 2,3-butanediol. However, these would be minor pathways, since Bdh1p accounts for most of the 2,3-butanediol production (Fig. 3). Interestingly, the [*R*-acetoin]/[*S*-acetoin] ratio of 3.1 found in the present work for the *bdh1Δ* strains closely corresponds to the ratio of 3.3 resulting from the pyruvate decarboxylase activity from pyruvate (4). Moreover, the [(2*R*,3*R*)-2,3-butanediol]/[*meso*-2,3-butanediol] ratio of 3.1 found here for the wild-type strain is close to the ratio of 2.1 found in an early report of yeast grown anaerobically (18).

The levels of extracellular metabolites (especially acetoin) measured in the *bdh2Δ* strains are close to the levels found in their wild-type counterparts. Moreover, the levels of acetoin

isomers and 2,3-butanediol are similar in the *bdh1Δ* and *bdh1Δ bdh2Δ* strains (Fig. 3). Although these facts could imply that Bdh2p is not involved in the production of 2,3-butanediol (and is devoid of acetoin reductase activity), we decided to address this issue more directly. First, we showed that the mRNA of *BDH2* was expressed in the FY strain and repressed in the FY834 *bdh1Δ* strain, although no butanediol dehydrogenase activity was present in a FY834 *bdh1Δ*(pYES2-*BDH2*) strain. We also could demonstrate the presence of the protein Bdh2-6His in a Western blot that did not show BDH activity in an IEF gel or in the spectrophotometer. Bdh2-6His seems to be a labile protein that could be expressed in a proteasome-deficient yeast strain, although at a lower level than Bdh1-6His expressed under similar experimental conditions.

The final conclusion about Bdh2p that can be deduced from the present work is that it is devoid of BDH activity. In effect, Fig. 8 shows expression of Bdh2p-6His, but no BDH activity (as opposed to Bdh1p-6His). Although it could be argued that the His tail impairs its putative BDH activity, we do not favor this explanation for two reasons: Bdh1p-6His displays BDH activity, and the IEF gel loaded with an extract of the strain WCG4-11/22a *bdh1Δ*(pYES2-*BDH2*) does not show BDH activity (Fig. 8B, lane 4). Since an extract of the strain WCG4-11/22a *bdh1Δ*(pYES2-*BDH1*) grown under the same conditions showed high BDH activity (lane 2), Bdh2p, if active, should be visible in lane 4 (unless, of course, it was extremely labile). Thus, although *YAL061W* affects the expression of *BDH1* (under our experimental conditions, at least), its designation as *BDH2* (currently in the databases) should be reconsidered, since the results from this work do not corroborate its presumed BDH activity.

An interesting application of the present results is that the control of *BDH1* expression could affect the balance between acetoin and 2,3-butanediol and could have an impact on the flavor and aroma of wines produced by industrial yeast strains. In fact, some strains reported as non-2,3-butanediol producers (26) could have a nonfunctional or a repressed *BDH1* gene. Alternatively, *BDH1* could be lost in those strains, given its subtelomeric position in chromosome I. We have recently shown the utility of overexpressing *BDH1* in a wine yeast strain to reduce its acetoin content (6). Another application of Bdh1p overproduction is in the production of enantiopure 2,3-butanediol isomers.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Ministry of Education and Science (BFU-2006-10401, BIO2007-64659, and BFU2008-02945) and Generalitat de Catalunya (2005 SGR 00112), Spain.

We thank Danièle Urban-Grimal (Institut Jacques Monod, Paris, France) for sending us the WCG4-11/22a strain. The MALDI-TOF MS analyses were carried out by Silvia Bronsoms in the proteomics and bioinformatics facility (SePBio) of UAB, a member of the Proteored network. The technical assistance of Brigitte Cambon (UMR 1083 Sciences pour l'Oenologie, INRA, Montpellier, France) is acknowledged.

REFERENCES

1. Bartowsky, E. J., and P. A. Henschke. 2004. The buttery attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* **96**:235–252.
2. Bornemann, S., D. H. G. Crout, H. Dalton, D. Hutchinson, G. Dean, N. Thomson, and M. M. Turner. 1993. Stereochemistry of the formation of lactaldehyde and acetoin produced by the pyruvate decarboxylases of yeast

- (*Saccharomyces* sp.) and *Zymomonas mobilis*: different Boltzmann distributions between bound forms of the electrophile, acetaldehyde, in the two enzymatic reactions. *J. Chem. Soc. Perkin I*:309–311.
3. **Chang, Q., T. A. Griest, T. M. Harter, and J. M. Petrash.** 2007. Functional studies of aldo-keto reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**:321–329.
 4. **Chen, G. C., and F. Jordan.** 1984. Brewers' yeast pyruvate decarboxylase produces acetoin from acetaldehyde: a novel tool to study the mechanism of steps subsequent to carbon dioxide loss. *Biochemistry* **23**:3576–3582.
 5. **deRisi, J. L., V. R. Iyer, and P. O. Brown.** 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**:680–686.
 6. **Ehsani, M., M. R. Fernández, J. A. Biosca, A. Julien, and S. Dequin.** 2009. Engineering of 2,3-butanediol dehydrogenase to reduce acetoin formation by glycerol-overproducing, low-alcohol *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:3196–3205.
 7. **Gasch, A., P. Spellman, C. Kao, O. Carmel-Harel, M. Eisen, G. Storz, D. Botstein, and P. Brown.** 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **11**:4241–4257.
 8. **Gentleman, R. C., V. J. Carey, D. M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A. J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J. Y. Yang, and J. Zhang.** 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **5**:R80.
 9. **Goldstein, A. L., and J. H. McCusker.** 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**:1541–1553.
 10. **González, E., M. R. Fernández, C. Larroy, L. Solá, M. A. Pericás, X. Parés, and J. A. Biosca.** 2000. Characterization of a (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* *YAL060W* gene product. Disruption and induction of the gene. *J. Biol. Chem.* **275**:35876–35885.
 11. **Guldener, U., S. Heck, T. Fielder, J. Beinhauer, and J. H. Hegemann.** 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **24**:2519–2524.
 12. **Heidlas, J., and R. Tressl.** 1990. Purification and properties of two oxidoreductases catalyzing the enantioselective reduction of diacetyl and other diketones from baker's yeast. *Eur. J. Biochem.* **188**:165–174.
 13. **Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura.** 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**:163–168.
 14. **Kim, S. T., W. K. Huh, B. H. Lee, and S. O. Kang.** 1998. D-Arabinose dehydrogenase and its gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1429**:29–39.
 15. **Kuriyama, H., and H. Kobayashi.** 1993. Effects of oxygen supply on yeast growth and metabolism in continuous fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* **75**:364–367.
 16. **Kushnir, V.** 2000. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* **16**:857–860.
 17. **Michnick, S., J. L. Roustan, F. Remize, P. Barre, and S. Dequin.** 1997. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast* **13**:783–793.
 18. **Neish, A. C.** 1950. Stereoisomers of 2,3-butanediol produced by yeast. *Can. J. Res.* **28B**:660–661.
 19. **Oka, A., H. Sugisaki, and M. Takanami.** 1981. Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon *Tn903*. *J. Mol. Biol.* **147**:217–226.
 20. **Patel, S., and T. Shibamoto.** 2002. Effect of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on production of volatiles in Napa Gamay wine and Petite Sirah wine. *J. Agric. Food Chem.* **50**:5649–5653.
 21. **Peinado, R. A., J. Moreno, M. Medina, and J. C. Mauricio.** 2004. Changes in volatile compounds and aromatic series in sherry wine with high gluconic acid levels subjected to aging by submerged flor yeast cultures. *Biotechnol. Lett.* **26**:757–762.
 22. **Remize, F., J. L. Roustan, J. M. Sablayrolles, P. Barre, and S. Dequin.** 1999. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:143–149.
 23. **Richter-Ruoff, B., D. H. Wolf, and M. Hochstrasser.** 1994. Degradation of the yeast MAT alpha 2 transcriptional regulator is mediated by the proteasome. *FEBS Lett.* **354**:50–52.
 24. **Ritchie, M. E., J. Silver, A. Oshlack, M. Holmes, D. Diyagama, A. Holloway, and G. K. Smyth.** 2007. A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* **23**:2700–2707.
 25. **Robertson, E. F., H. K. Dannelly, P. J. Malloy, and H. C. Reeves.** 1987. Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* **167**:290–294.
 26. **Romano, P., L. Granchi, M. Caruso, G. Borra, G. Palla, C. Fiore, D. Ganucci, A. Caligiani, and V. Brandolini.** 2003. The species-specific ratios of 2,3-butanediol and acetoin isomers as a tool to evaluate wine yeast performance. *Int. J. Food Microbiol.* **86**:163–168.
 27. **Romano, P., and G. Suzzi.** 1996. Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:309–315.
 28. **Romano, P., G. Suzzi, V. Brandolini, E. Menziani, and P. Domizio.** 1996. Determination of 2,3-butanediol in high and low acetoin producers of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts by automated multiple development (AMD). *Letts. Appl. Microbiol.* **22**:299–302.
 29. **Rothstein, R. J.** 1983. One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101**:202–211.
 30. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 31. **Shinohara, T., Y. Shimazu, and M. Watanabe.** 1979. Dosage de l'acétoine et du lactate d'éthyle dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et étude de leur formation dans les vins. *Agric. Biol. Chem.* **43**:2569–2577.
 32. **Smyth, G. K., and T. P. Speed.** 2003. Normalization of cDNA microarray data. *Methods* **31**:265–273.
 33. **Syu, M. J.** 2001. Biological production of 2,3-butanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**:10–28.
 34. **Tusher, V. G., R. Tibshirani, and G. Chu.** 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:5116–5121.
 35. **van Bergen, B., R. Strasser, N. Cyr, J. D. Sheppard, and A. Jardim.** 2006. Alpha,beta-dicarbonyl reduction by *Saccharomyces* D-arabinose dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**:1636–1645.
 36. **van Dijken, J. P., J. Bauer, L. Brambilla, P. Duboc, J. M. Francois, C. Gancedo, M. L. Giuseppin, J. J. Heijnen, M. Hoare, H. C. Lange, E. A. Madden, P. Niederberger, J. Nielsen, J. L. Parrou, T. Petit, D. Porro, M. Reuss, N. van Riel, M. Rizzi, H. Y. Steensma, C. T. Verrips, J. Vindelov, and J. T. Pronk.** 2000. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme Microb. Technol.* **26**:706–714.
 37. **Wach, A., A. Brachat, C. Rebischung, S. Steiner, K. Pokorni, S. te Heesen, and P. Philippsen.** 1998. PCR-based gene targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Microbiol.* **26**:67–81.
 38. **Winston, F., C. Dollard, and S. L. Ricupero-Hovasse.** 1995. Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* **11**:53–55.