

# ESPECIFICITAT DE L'ALCOHOL DESHIDROGENASA AMB RETINOIDES

**Sílvia Martras Delgado**

# **ESPECIFICITAT DE L'ALCOHOL DESHIDROGENASA AMB RETINOIDES**

Tesi presentada per adquirir el grau de Doctora en Bioquímica i Biologia Molecular per

**SÍLVIA MARTRAS DELGADO**

Llicenciada en Química

Treball realitzat en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Unitat de Bioquímica de la Facultat de Ciències, de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció dels doctors **XAVIER PARÉS CASASAMPERA** i **JAUME FARRÉS VICÉN**

Xavier Parés Casasampera

Jaume Farrés Vicén

Sílvia Martras Delgado

Bellaterra, Gener del 2005

*Totes aquestes pàgines les dedico al Josep M<sup>a</sup>, el meu millor amic i company de viatge d'aquesta vida. Gràcies per ser-hi sempre.*

# ÍNDEX

<b>RESUM .....</b>	<b>9</b>
<b>LLISTAT D'ARTICLES .....</b>	<b>11</b>
<b>ABREVIATURES .....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>15</b>
<b>LES ALCOHOL DESHIDROGENASASES DE VERTEBRATS .....</b>	<b>16</b>
<b>Propietats estructurals .....</b>	<b>16</b>
<b>Mecanisme catalític i cinètic .....</b>	<b>17</b>
<b>La família enzimàtica .....</b>	<b>20</b>
<i>ADH1</i> .....	22
<i>ADH2</i> .....	22
<i>ADH3</i> .....	23
<i>ADH4</i> .....	23
<i>Altres ADHs</i> .....	24
<b>LES DESHIDROGENASES / REDUCTASES DE CADENA CURTA .....</b>	<b>24</b>
<b>Retinol deshidrogenases de la superfamília SDR .....</b>	<b>25</b>
<i>RoDHs</i> .....	25
<i>CRADs</i> .....	25
<i>RDH5</i> .....	25
<i>retSRD1</i> .....	26
<i>prRDH</i> .....	26
<b>LES ALDO-CETO REDUCTASES .....</b>	<b>26</b>
<b>AKRs amb activitat amb retinoides .....</b>	<b>26</b>
<i>AR</i> .....	26
<i>AR-like</i> .....	27
<i>3<math>\alpha</math>-HSD</i> .....	27
<b>METABOLISME DE L'ALCOHOL .....</b>	<b>27</b>
<b>Absorció, distribució i eliminació de l'etanol .....</b>	<b>27</b>
<i>La via de l'alcohol deshidrogenasa</i> .....	29
<i>La via del citocrom P450</i> .....	29
<i>La via de la catalasa</i> .....	29

Efectes de l'alcohol .....	30
<b>METABOLISME DELS RETINOIDES .....</b>	<b>30</b>
<b>Importància fisiològica dels retinoides .....</b>	<b>31</b>
<i>La deficiència de vitamina A .....</i>	<i>33</i>
<i>Toxicitat de la vitamina A .....</i>	<i>33</i>
<b>Absorció, distribució i emmagatzematge del retinol .....</b>	<b>33</b>
<b>Metabolisme i mecanisme d'acció dels retinoides .....</b>	<b>34</b>
<i>Oxidació del retinol .....</i>	<i>35</i>
<i>Reducció del retinal .....</i>	<i>36</i>
<i>Oxidació del retinal .....</i>	<i>36</i>
<i>Acció de l'àcid retinoic .....</i>	<i>37</i>
<b>El cicle visual .....</b>	<b>38</b>
<b>EFFECTE DE L'ALCOHOL EN EL METABOLISME DELS RETINOIDES .....</b>	<b>40</b>
<b>OBJECTIUS DE LA TESI .....</b>	<b>41</b>
<b>ARTICLE I .....</b>	<b>43</b>
<b>ARTICLE II .....</b>	<b>57</b>
<b>RESULTATS I DISCUSSIÓ .....</b>	<b>67</b>
<b>EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ D'ADHs .....</b>	<b>67</b>
<b>SÍNTESI DE RETINOLS PER OXIDACIÓ DE RETINALS .....</b>	<b>72</b>
<b>ESPECIFICITAT DE L'ADH AMB CIS-RETINOIDES .....</b>	<b>77</b>
Estudis cinètics .....	77
Estudis estructurals .....	79
<b>ESPECIFICITAT DE L'ADH AMB RETINOIDES OXIDATS EN L'ANELL .....</b>	<b>84</b>
<b>EFFECTE DE LA PRESENCIA DE TWEEN 80 EN LES CONSTANTS</b>	
<b>CINÈTIQUES DE L'ADH AMB RETINOIDES .....</b>	<b>88</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>91</b>
<b>AGRAÏMENTS .....</b>	<b>93</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>95</b>

## RESUM

L'alcohol deshidrogenasa (ADH) catalitza de forma reversible l'oxidació d'alcohols per obtenir els corresponents aldehids o cetones. L'ADH de mamífers es presenta en forma de cinc classes (ADH1 – 5) que es distribueixen de forma desigual en els diferents teixits. Una de les possibles funcions fisiològiques de l'ADH és el metabolisme de retinoides.

Els retinoides són molècules derivades de compostos isoprenoides que tenen en comú dins la seva estructura un anell ciclohexè i una cadena carbonada amb quatre dobles enllaços. Dins els retinoides, trobem compostos com el retinol (vitamina A), el retinal i l'àcid retinoic. L'àcid retinoic, en les seves formes tot-*trans*- i 9-*cis*-, actua com a lligand de receptors nuclears específics, i és essencial en processos de creixement, desenvolupament i manteniment epitelial. La via de formació de l'àcid retinoic inclou dos passos d'oxidació, de retinol a retinal i de retinal a àcid retinoic. S'han descrit diversos enzims que poden participar en el primer pas, com les ADH i les retinol deshidrogenases (RDH), però es desconeix la contribució de cada enzim en el procés.

Degut a que estudis amb ratolins 'knockout' per a les ADH1 i ADH4 donen suport a la participació d'aquests enzims en el metabolisme dels retinoides, l'objectiu d'aquesta tesi ha estat ampliar el coneixement del metabolisme de diferents isòmers de retinoides per aquests enzims *in vitro*. Així, s'han clonat, expressat i purificat ADH1B1, ADH2B2 i ADH4 humanes, i també ADH1 i ADH4 de ratolí que, per primera vegada, s'han caracteritzat en la seva forma recombinant. S'han determinat les constants cinètiques de totes aquestes ADHs amb tot-*trans*-retinol i retinal i amb tots els possibles isòmers amb un enllaç *cis*- en la cadena alifàtica: 7-*cis*-, 9-*cis*-, 11-*cis*- i 13-*cis*-retinol i els corresponents retinals. Aquests retinoides són substrats per a totes les ADHs, excepte els isòmers 13-*cis*- que no són metabolitzats per l'ADH1. En general, les ADH4 humana i de ratolí mostren constants cinètiques similars, i són més eficients que les ADH1.

Totes les ADHs utilitzen com a substrats tant 11-*cis*-retinol com 11-*cis*-retinal, compostos rellevants en el cycle visual. S'ha observat que l'ADH4 mostra especificitat per a l'oxidació d'11-*cis*-retinol sobre la reducció d'11-*cis*-retinal, una propietat única entre totes les ADHs per a qualsevol parella de substrats alcohol/aldehid. Mitjançant mètodes de simulació molecular, i clonatge, expressió i caracterització del mutant de l'ADH4 humana M141L, hem demostrat que el residu 141, situat a la regió mitjana del túnel hidrofòbic del seti actiu de l'ADH, és essencial per definir aquesta especificitat de l'ADH4 sobre les ADH1. La immunolocalització de l'ADH4 a l'epiteli pigmentat i en moltes capes de la retina, dona suport a la participació de l'ADH4 en diferents reaccions amb retinoides. L'activitat citosòlica de l'ADH4 en l'epiteli pigmentat pot ser complementària a l'activitat 11-*cis*-retinol deshidrogenasa de la RDH5, necessària per completar el cycle visual, i pot estar també implicada en la generació d'àcid retinoic a les capes neuronals de la retina.

Una altra família de retinoides està constituïda per derivats oxidats en l'anell ciclohexè, com per exemple els 4-oxo-, 4-hidroxi- i 3,4-dideshidroretinol i els corresponents retinals. Tot i que són compostos poc estudiats,

es coneix que alguns derivats, com els àcids 4-oxo- i el 3,4-dideshidroretinoic, així com el 4-oxo-retinol i retinal poden interaccionar amb receptors nuclears. D'altra banda, els 3,4-dideshidroretinoides es localitzen en humans només a la pell, on poden participar en la diferenciació cel·lular, i també són importants en alguns animals d'aigua dolça. Diverses isoformes del citocrom P450 poden oxidar l'anell del retinol, però no s'ha descrit cap enzim que metabolitzi els derivats oxidats als corresponents retinals i àcids retinoics. Les cinètiques dels enzims ADH1B1, ADH2B2 i ADH4 humanes, i també ADH1 i ADH4 de ratolí, indiquen que el 4-oxo-retinal i el 4-hidroxi-retinol són els substrats amb una eficiència catalítica més alta d'entre tots els retinoides, especialment pel que fa a les ADH4, mentre que els 3,4-dideshidroretinoides presenten una activitat similar a la dels tot-*trans*-retinoides. Les dades obtingudes *in vitro* recolzen l'existència d'una via metabòlica per a la formació dels àcids retinoics oxidats en l'anell a partir dels corresponents retinols, amb la participació de l'ADH.

Finalment, s'ha estudiat la influència del detergent Tween 80 en la cinètica de l'ADH amb retinoides. Hem comprovat que la presència de Tween 80 provoca una disminució de l'activitat que resulta en una aparent inhibició competitiva en les cinètiques de l'ADH per al tot-*trans*-retinol, amb un augment de la  $K_m$  i disminució de l'eficiència catalítica en augmentar la concentració del detergent. Això implica que els valors reals de  $K_m$  són molt inferiors als publicats fins ara, tradicionalment obtinguts en presència de 0,02 % de Tween 80. Així, les ADHs presenten valors de  $K_m$  pròxims als de les RDHs i, per tant, la contribució al metabolisme dels retinoides podria ser similar per a ambdós sistemes enzimàtics. Hem comprovat, espectrofotomètricament i per HPLC, que el Tween 80 manté l'estabilitat de la solució aquosa de retinoides, i que permet obtenir resultats ràpids, fiables, reproduïbles i comparables entre diferents ADHs.

## LLISTAT D'ARTICLES

Aquesta tesi es basa en els següents dos articles:

- Article I**      Martras, S., Alvarez, R., Martínez, S.E., Torres, D., Gallego, O., Porté, S., Duester, G., Farrés, J., de Lera, A. R., and Parés, X. (2004) The specificity of alcohol dehydrogenase with *cis*-retinoids. Activity with 11-*cis*-retinol and localitzation in retina. *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, pp. 1660 – 1670
- Article II**      Martras, S., Alvarez, R., Gallego, O., Domínguez, M., de Lera, A. R., Farrés, J., and Parés, X. (2004) Kinetics of human alcohol dehydrogenase with ring-oxidized retinoids. Effect of Tween 80. *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 430, pp. 210 – 217



## ABREVIATURES

ADH	alcohol deshidrogenasa
AKR	aldo-ceto reductasa
ALDH	aldehid deshidrogenasa
AR	aldosa reductasa
ARAT	aciltransferasa d'acil CoA:retinol
CRABP	proteïna citoplasmàtica unidora d'àcid retinoic
CRBP	proteïna citoplasmàtica unidora de retinol
HPLC	cromatografia líquida d'alta resolució
HSD	hidroxiesteroide deshidrogenasa
kDa	quilodalton
$k_{cat}$	constant catalítica
$K_m$	constant de Michaelis
LRAT	aciltransferasa de lecitina:retinol
MDR	deshidrogenasa/reductasa de cadena mitjana
NAD <sup>+</sup> /NADH	dinucleòtid de nicotinamida – adenina (oxidat/reduït)
NADP <sup>+</sup> /NADPH	dinucleòtid fosfat de nicotinamida – adenina (oxidat/reduït)
RAR	receptor d'àcid retinoic
RARE	element de resposta del DNA a àcid retinoic
RBP	proteïna unidora de retinol
RDH	retinol deshidrogenasa
RPE	epiteli pigmentat de la retina
RXR	receptor d'àcid 9- <i>cis</i> -retinoic
SDR	deshidrogenasa/reductasa de cadena curta
U	unitat internacional d'activitat enzimàtica
$\epsilon$	coeficient d'absortivitat molar
$\lambda$	longitud d'ona

## INTRODUCCIÓ

Les alcohol deshidrogenases presents en els éssers vius es troben distribuïdes en varies superfamílies d'oxidoreductases. Els enzims de cada superfamília són derivats d'un gen ancestral comú, que ha donat lloc a un sistema complex de famílies enzimàtiques, que es diferencien entre sí per la seva estructura i pel seu mecanisme catalític, però que tenen en comú, en general, l'activitat davant d'alcohols. Dues d'aquestes superfamílies, especialment importants en eucariotes, són les deshidrogenases/reductases de cadena mitjana (MDR) i les deshidrogenases/reductases de cadena curta (SDR) (Taula 1).

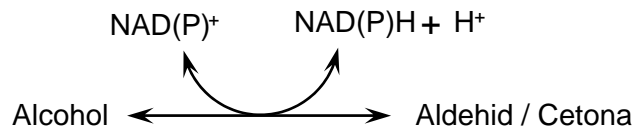
Taula 1

**Superfamílies de les alcohols deshidrogenases amb exemples d'enzims per a cada superfamília**

DE CADENA CURTA (short-chain, SDR) 250 AA		Alcohol deshidrogenasa de <i>Drosophila</i> Esteroid oxidoreductasa Retinoide oxidoreductasa	
DE CADENA MITJANA (medium-chain, MDR) 375 AA	Amb Zn	Formes dimèriques	Alcohol deshidrogenasa de vertebrats
		Formes tetramèriques	Alcohol deshidrogenasa de <i>S. cerevisiae</i> Sorbitol deshidrogenasa de mamífer
	Sense Zn		Quinona reductasa/ $\xi$ -cristal·lina Enoil reductasa
ACTIVADES PER Fe		1,2-propadiol deshidrogenasa d' <i>E. coli</i>	

En general, el terme alcohol deshidrogenasa (ADH) fa referència als enzims responsables de la interconversió, dependent de NAD(P)<sup>+</sup>, d'alcohols (especialment etanol) i aldehids/cetones (Alcohol:NAD oxidoreductasa; EC 1.1.1.1; ADH), procés essencial en sistemes tant procariotes com eucariotes (Figura 1). Això fa que les ADHs es trobin àmpliament distribuïdes en microorganismes, plantes i animals. En vertebrats, en particular, el terme alcohol deshidrogenasa (ADH) fa referència a les deshidrogenases/reductases de cadena mitjana (MDR) que contenen zinc.

Figura 1  
Reacció catalitzada  
per l'ADH



## LES ALCOHOL DESHIDROGENASASES DE VERTEBRATS

En vertebrats, l'ADH és un enzim citosòlic que pertany a la família de les deshidrogenases/reductases de cadena mitjana i que es localitza de forma abundant en fetge, on pot representar el 3 % de la proteïna soluble (Edenberg i Bosron, 1997). L'enzim es detecta també en la resta de teixits de forma més o menys extensa, i presenta activitat davant una àmplia varietat d'alcohols i aldehids.

### Propietats estructurals

Des del punt de vista estructural, l'ADH inicialment més estudiada ha estat la de fetge de cavall, ja que va ser la primera ADH que es va purificar i se'n va determinar l'estructura primària (Jörnvall, 1970), i també va ser la primera que es va cristal·litzar (Brändén et al., 1973). D'aquesta manera l'ADH de fetge de cavall es pren de model en l'estudi de les ADHs de vertebrats.

L'ADH està composta per dues subunitats de 350 – 400 residus d'aminoàcids, que formen un dímer de pes molecular aproximat de 80.000 dalton. Cada subunitat presenta un domini de fixació del coenzim i un domini catalític, separats per una escletxa que constitueix el centre actiu. Aquesta escletxa té una longitud de 15 – 20 Å, equivalent a la llargada d'una cadena alifàtica de 9 – 10 carbonis (Eklund i Brändén, 1987), i queda accessible gràcies al petit canvi conformacional que es produeix després de la unió del coenzim. En el dímer, els dos dominis de fixació del coenzim es situen en el nucli de la molècula, formant una regió d'interfase entre les dues subunitats constituïda per 12 plegaments en làmina β (Brändén et al., 1975) (Figura 2). Els dos dominis catalítics constitueixen la part externa del dímer, i contenen dos àtoms de zinc cadascun. Un d'aquests àtoms es situa a l'interior del domini catalític, i participa en la catàlisi. L'altre es situa en una regió superficial, i és essencial en el manteniment de l'estructura i l'estabilitat de l'enzim (Figura 2) (Brändén et al., 1975). Els residus que uneixen aquests àtoms de zinc es troben conservats en totes les ADHs de vertebrats. Així, el zinc catalític es coordina amb Cys 46, His 67 i Cys 174, i amb un quart lligand que pot ser una molècula d'aigua o el substrat. El zinc estructural es troba coordinat a les cisteïnes 97, 100, 103 i 111 (Brändén et al., 1975).

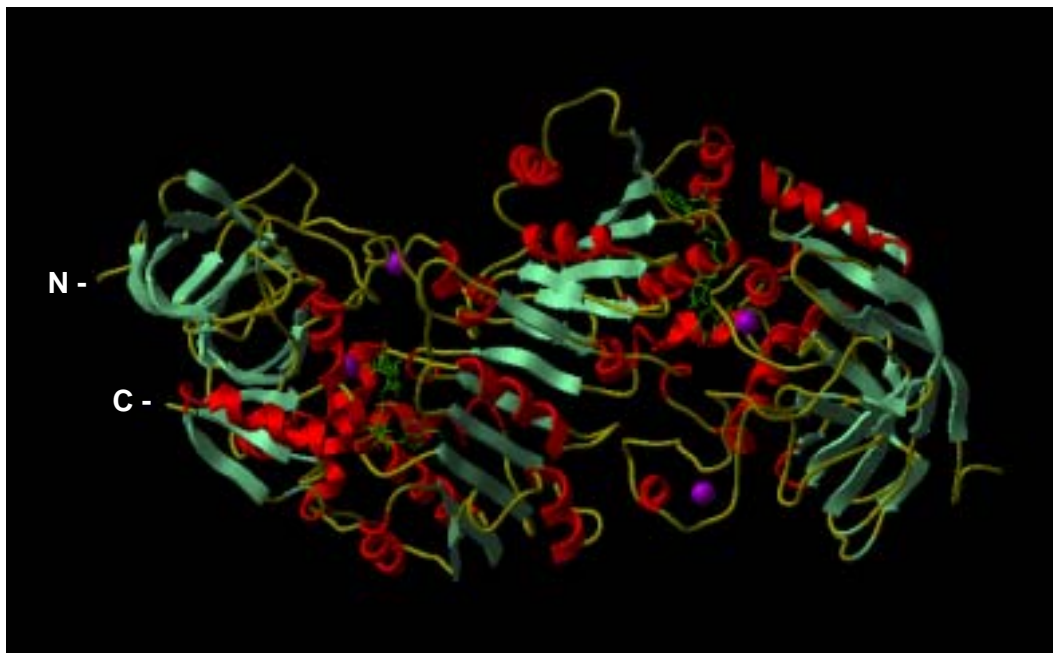


Figura 2

**Estructura de l'alcohol deshidrogenasa**

Es presenta l'estructura de l'ADH classe IV (ADH4) humana. L'estructuració de la cadena d'aminoàcids en hèlix  $\alpha$  s'indica de color vermell i en làmina  $\beta$  de color verd. També es mostren els àtoms de zinc (lila), i dues molècules de coenzim (verd) situades en el domini d'unió del coenzim de cada una de les subunitats de la proteïna. Així mateix també es mostra l'extrem N-terminal i l'extrem C-terminal d'una de les subunitats. La figura va ser creada amb el programa ICM (Molsoft LLC).

**Mecanisme catalític i cinètic**

El primer pas de la reacció de l'ADH és la unió del coenzim (Figura 3) a la proteïna. El coenzim es col·loca dins una llarga esclatxa situada entre el domini catalític i el domini d'unió del coenzim, interaccionant amb residus dels dos dominis. El pont pirofosfat del coenzim es col·loca a la zona mitjana de l'esclatxa, cosa que és possible per la presència de residus polars en aquesta zona, mentre que la part de la nicotinamida es situa a la part més interna de la proteïna, dirigida cap el zinc catalític i Cys 46 i 174 (Eklund i Brändén, 1987).

La unió del coenzim induïx el canvi de l'estructura més oberta de l'apo-enzim, a l'estructura més tancada de l'holo-enzim. En l'ADH1 de cavall, aquesta transició de conformacions es deu a una rotació del domini catalític de fins a  $10^\circ$  i una rotació en direcció contrària de  $1,5^\circ$  del domini d'unió del coenzim (Figura 4) (Eklund i Brändén, 1987). Aquestes rotacions estrenyen la separació entre els dos dominis, formant el lloc d'unió del substrat en forma de túnel. El zinc catalític amb els seus lligands es situen a la part interior d'aquest lloc d'unió del substrat, format per residus hidrofòbics amb l'excepció dels que coordinen el zinc, dels del coenzim i la Ser 48 (Figura 5), tots situats a la part més interna de l'anomenat túnel hidrofòbic.

Figura 3

**Molècula de NAD(P)**

Estructura del dinucleòtid de nicotinamida – adenina (NAD), indicant la posició del grup fosfat addicional en el dinucleòtid fosfat de nicotinamida – adenina (NADP). En el requadre, es mostra l'estructura de l'anell de nicotinamida reduït, que formaria la molècula de NAD(P)H.

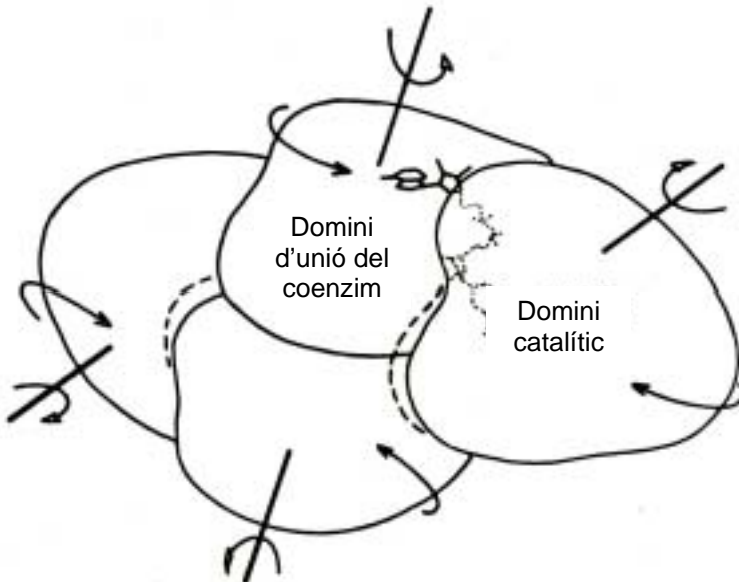
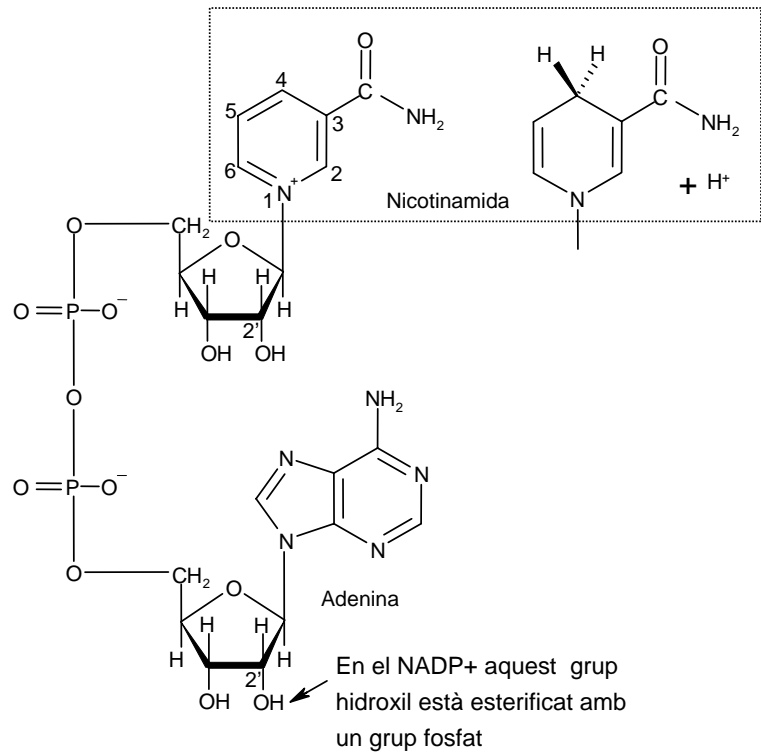


Figura 4

**Canvis conformacionals a l'alcohol deshidrogenasa**

Els dominis de cada subunitat a l'ADH1 de cavall giren en direccions oposades, l'un contra l'altre, a causa de la unió del coenzim. S'indiquen els eixos de rotació de cada subunitat i la situació del coenzim, la part del qual situada a l'interior de la proteïna està dibuixada amb línies discontinües (Eklund i Brändén, 1987).

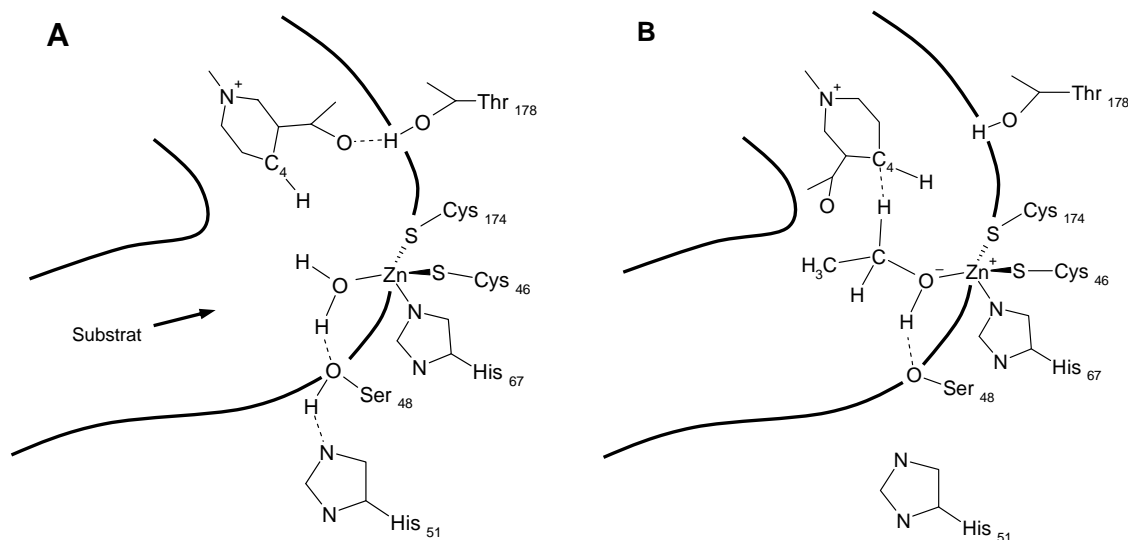


Figura 5

**Representació esquemàtica del lloc d'unió del substrat de l'alcohol deshidrogenasa**

Abans de l'entrada del substrat, una molècula d'aigua es troba coordinada a l'àtom de zinc catalític. La Ser 48 forma ponts d'hidrogen amb aquesta molècula d'aigua i amb la His 51 (A). La molècula d'aigua és desplaçada per la coordinació del substrat (etanol) amb el zinc, cosa que permet la pèrdua d'un  $H^+$  del substrat i la transferència d'hidrur del substrat al carboni  $C_4$  de l'anell de nicotinamida del coenzim (B).

El substrat s'uneix al zinc catalític desplaçant la molècula d'aigua que s'hi troba unida com a quart lligand (Figura 5), i provocant un descens del pKa de l'alcohol des de més de 14 fins a 6,5, aproximadament, cosa que facilita la desprotonació del substrat i la seva oxidació. L'abstracció d'aquest protó involucra el grup hidroxil de la Ser 48, el grup hidroxil de la posició 2' de la ribosa de la nicotinamida del coenzim (Figura 3), i el grup imidazol de la His 51, que constitueixen el sistema de transferència del protó al solvent. El següent pas de la catàlisi és la transferència d'hidrur desde el carboni  $C_1$  del substrat al carboni  $C_4$  de l'anell de nicotinamida del coenzim (Figura 5).

Variacions en els residus que formen part del túnel hidrofòbic, i en els residus que constitueixen el lloc d'unió del coenzim, són responsables de les diferents propietats cinètiques dins les ADHs. Així, l'especificitat del coenzim  $NAD^+$  o  $NADP^+$ , està determinada en part pel residu 223, Asp per als enzims  $NAD^+$ -dependents, o Gly o altres residus no àcids per als enzims  $NADP^+$ -dependents (Peralba et al., 1999). El residu Asp223 forma dos ponts d'hidrogen amb la ribosa de l'adenosina del  $NAD^+$ , afavorint la seva interacció amb l'enzim, però interfereix amb la càrrega negativa del 2'-fosfat del  $NADP^+$ . Altres residus del lloc d'unió del coenzim determinen l'afinitat pel coenzim, modificant la seva velocitat de dissociació, que en la majoria d'ADHs és el pas limitant de la reacció (Hurley et al., 1990, Stone et al., 1993), com per exemple el residu 47 (Arg en l'ADH1 de cavall). A l'hora de definir l'especificitat de substrat, són importants varis residus situats en el lloc d'unió del substrat, com per exemple les posicions 48 i 93, que determinen la possibilitat d'interacció amb alcohols secundaris i esteroides (Eklund et al., 1990, Hurley i Bosron, 1992). Per a la majoria de substrats i ADHs (p. ex. l'ADH1 de cavall), la reacció d'oxidació/reducció segueix un mecanisme seqüencial ordenat Bi Bi, on l'interacció dels substrats amb l'enzim segueix un ordre obligatori a

l'hora de formar el complex ternari i també és ordenada la sortida dels productes (Figura 6) (Theorell i Chance, 1951).

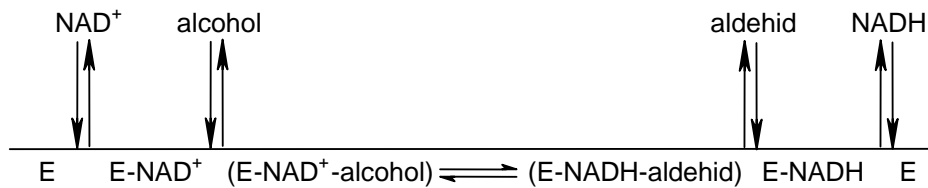


Figura 6

**Mecanisme cinètic seqüencial ordenat Bi Bi per a l'alcohol deshidrogenasa**

El mecanisme cinètic està compost per varis passos de reacció i, en general, la dissociació del coenzim és el pas limitant (Brändén et al., 1975), pel que la constant de velocitat d'aquest pas determina la constant catalítica de la reacció ( $k_{cat}$ ). El primer pas de la reacció és la unió del coenzim. Seguidament s'uneix el substrat, i es produeix la seva desprotonació i la transferència de l'hidrur, cosa que comporta l'oxidació de l'alcohol i la reducció del coenzim. Un cop finalitzada la catàlisi, s'allibera primer l'aldehid i finalment el coenzim.

### La família enzimàtica

En mamífers, la família ADH és un sistema enzimàtic complex, compost per múltiples formes moleculars que s'han agrupat en cinc classes (ADH1 – ADH5), d'acord amb les seves característiques enzimàtiques i estructurals (Jörnvall i Höög, 1995; Duester et al., 1999) (Taula 2). Almenys set gens diferents codifiquen l'ADH humana. S'han identificat nou tipus diferents de subunitats ( $\alpha$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\pi$ ,  $\chi$  i  $\sigma$ ), que donen lloc a les diferents formes moleculars de l'ADH humana. Les subunitats s'uneixen dins de cada classe formant homodímers, i en el cas de la classe I, també heterodímers. Les classes detectades en humans també es troben en altres mamífers, els quals presenten, en general, menys complexitat en la classe I.

Algunes de les classes d'ADH trobades en mamífers no s'ha detectat en altres grups de vertebrats. Per contra, s'ha descrit una classe en embrió de pollastre, anomenada ADH7 (Kedishvili et al., 1997), i una ADH dependent de NADP en estómac de granota, anomenada ADH8 (Peralba et al., 1999).

El principal criteri de classificació de les ADHs és la comparació de les diferents seqüències de proteïna, cosa que permet construir arbres filogenètics on cada classe s'agrupa en branques separades de la resta, i se'n poden deduir relacions evolutives (Figura 7).

Taula 2  
**Classes d'alcohol deshidrogenases en humans**

Classe	Nomenclatura actual			Nomenclatura antiga		
	Gen	Al·lel	Proteïna	Gen	Al·lel	Subunitat
I	<i>ADH1A</i>		ADH1A	<i>ADH1</i>		$\alpha$
	<i>ADH1B</i>	<i>ADH1B*1</i>	ADH1B1	<i>ADH2</i>	<i>ADH2</i> <sup>1</sup>	$\beta$ 1
		<i>ADH1B*2</i>	ADH1B2		<i>ADH2</i> <sup>2</sup>	$\beta$ 2
		<i>ADH1B*3</i>	ADH1B3		<i>ADH2</i> <sup>3</sup>	$\beta$ 3
	<i>ADH1C</i>	<i>ADH1C*1</i>	ADH1C1	<i>ADH3</i>	<i>ADH3</i> <sup>1</sup>	$\gamma$ 1
		<i>ADH1C*2</i>	ADH1C2		<i>ADH3</i> <sup>2</sup>	$\gamma$ 2
II	<i>ADH2</i>		ADH2	<i>ADH4</i>		$\pi$
III	<i>ADH3</i>		ADH3	<i>ADH5</i>		$\chi$
IV	<i>ADH4</i>		ADH4	<i>ADH6</i>		$\sigma$ o $\beta$ $\mu$
V	<i>ADH5</i>		– <sup>a</sup>	<i>ADH7</i>		– <sup>a</sup>

<sup>a</sup> No s'ha detectat.

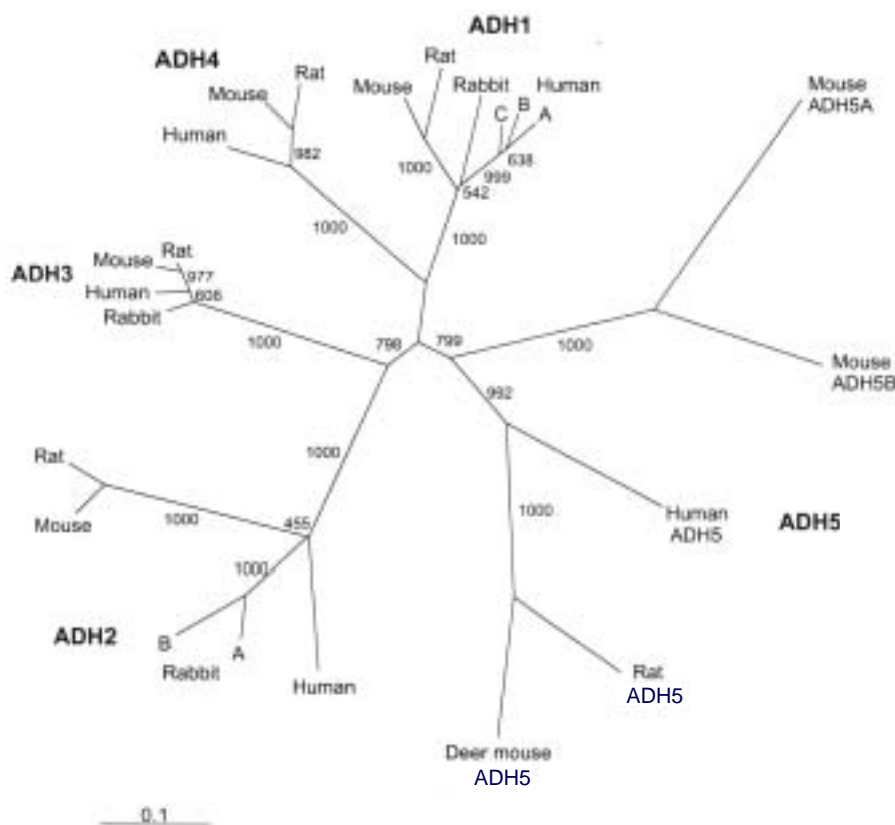


Figura 7  
**Arbre filogenètic sense arrel de diferents ADHs de mamífer**  
 Els números sobre les branques representen el resultat de l'anàlisi del bootstrap de 1000 replicats, i la llargada de les línies és proporcional a les distàncies de separació evolutiva. (Figura modificada de la ref. Höög et al., 2001).



El model evolutiu de les ADHs suggereix que l'ADH3 és la més conservada i ancestral de totes les classes ADH de cadena mitjana de vertebrats. Totes les ADHs han sorgit per duplicacions gèniques que s'han produït al llarg de l'evolució a partir d'aquest ancestre comú. La presència d'una classe mixta I/III en peixos (Danielsson et al., 1992) suggereix que l'ADH1 apareix a partir de la classe III al principi de l'evolució dels vertebrats. Línies evolutives originades abans dels peixos, com insectes (Danielsson et al., 1994) i cefalòpodes (Kaiser et al., 1993), contenen ADH3, però no ADH1. En amfibis ja es troba una ADH1 típica (Cederlund et al., 1991), que també es detecta en totes les línies originades posteriorment. En rosegadors trobem un únic enzim de classe I, tres isoenzims en fetge de cavall, i múltiples isoenzims en primats.

L'ADH2 d'estruç (Hjelmqvist et al., 1995) presenta propietats mixtes entre les classes I i II. Estructuralment correspon a una classe II, però presenta les característiques cinètiques de la classe I. Això induïx a pensar que el seu origen evolutiu es troba en una duplicació gènica a partir d'un gen ancestral comú amb la classe I. No es pot descartar però, una duplicació de la classe III, després de la separació de la classe I, com origen de la classe II (Jörnvall, 1994).

L'origen de l'ADH4 sembla una duplicació gènica a partir de l'ADH1 (Hoffmann et al., 1998, Peralba et al., 1999).

### ADH1

L'ADH1 és l'ADH clàssica, molt activa amb etanol, present en el fetge de tots els vertebrats, i molt sensible a la inhibició per 4-metilpirazole ( $K_i < 2 \mu\text{M}$ ). A part del fetge, també s'ha localitzat en altres òrgans com ronyó, pulmó i intestí entre d'altres (Julià et al., 1987; Boleda et al., 1989). L'enzim constitueix la major activitat per metabolitzar l'etanol ingerit. Els valors de  $K_m$  per a l'oxidació de l'etanol varien per als diferents isoenzims d'ADH1, però en general són més baixos que per a les altres classes d'ADHs. L'isoenzim que presenta una  $K_m$  més baixa per a l'etanol (50  $\mu\text{M}$ , pH 7,5) és el dímer de l'ADH1B1 ( $\beta_1\beta_1$ ), mentre que l'isoenzim format pel dímer de l'ADH1B2 ( $\beta_2\beta_2$ ), és el que presenta una major  $k_{\text{cat}}$  (800  $\text{min}^{-1}$ , pH 7,5).

La majoria dels isoenzims de la classe I catalitzen l'oxidació dels alcohols més eficientment a pH 10 – 11, mentre que la reducció dels aldehids és més favorable a pH 6 – 7. A part de l'activitat amb l'etanol, l'ADH1 presenta una àmplia especificitat de substrat, i és activa amb alcohols primaris i secundaris, alcohols aromàtics i diols (Pietruszko, 1979). D'altra banda, l'enzim presenta una  $K_m$  més baixa per als alcohols de cadena llarga que per als de cadena curta, mentre que la  $k_{\text{cat}}$  és manté constant. Això fa que l'eficiència catalítica ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) sigui més alta per a alcohols de cadena llarga. Entre els substrats fisiològics de l'ADH1 trobem  $\omega$ -hidroxiàcids grassos (Björkhem, 1972; Boleda et al., 1993), aldehids formats en la peroxidació lipídica com el 4-hidroxinonenal (Boleda et al., 1993), 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ -esteroides (McEvily et al., 1988), alguns metabolits de la dopamina, noradrenalina i serotonina (Mårdh i Vallee, 1986; Svensson et al., 1999) i retinoides (Boleda et al., 1993; Yang et al., 1994). El paper fisiològic de l'ADH1 en el metabolisme de l'etanol i dels retinoides s'ha demostrat gràcies a l'estudi de ratolins transgènics *Adh1* *-/-* que, encara que viables, mostren una major sensibilitat a la intoxicació per etanol i retinol (Deltour et al., 1999b; Molotkov et al., 2002a; Molotkov et al., 2002b).

### ADH2

L'ADH2 es localitza principalment en el fetge, però també s'han observat nivells, encara que baixos, de mRNA en estómac, pàncrees i intestí prim (Estonius et al., 1996). Aquesta classe d'ADH presenta una  $K_m$

més alta per a l'etanol i menys sensibilitat a la inhibició per 4-metilpirazole que l'ADH1. Degut a la presència en fetge i l'activitat amb etanol, s'ha proposat que l'ADH2 pot participar en el metabolisme hepàtic de l'etanol, contribució que pot arribar a ser del 40 % en casos d'intoxicació alcohòlica greu (Li et al., 1977), però en general, l'ADH2 mostra més activitat per als alcohols i aldehids hidrofòbics (Ditlow et al., 1984).

Entre els substrats fisiològics de l'ADH2 es troben els retinoides (Yang et al., 1994; Popescu i Napoli, 2000), 4-hidroxi-alquenals (Sellin et al., 1991),  $\omega$ -hidroxiàcids grassos (Ditlow et al., 1984) i intermedis dels metabolisme de la noradrenalina i la serotonina (Mårdh i Vallee, 1986; Svensson et al., 1999).

### ADH3

L'ADH3 és un enzim present en tots els teixits de tots els organismes eucariotes i en molts procariotes, i s'ha identificat com a formaldehid deshidrogenasa dependent de glutatió (Koivusalo et al., 1989). Evolutivament, l'ADH3 és l'ADH més antiga, a partir de la qual han emergit i evolucionat la resta d'ADHs de vertebrats. L'ADH3 mostra seqüència, estructura i funció molt conservades en tots els organismes on hi és present. (Jörnvall et al., 2001). L'enzim no es satura amb alcohols i aldehids de cadena curta, com l'etanol, i és pràcticament insensible a la inhibició amb 4-metilpirazole. L'ADH3 presenta activitat amb alcohols de cadena llarga (Parés i Vallee, 1981) i amb  $\omega$ -hidroxiàcids grassos (Wagner et al., 1984), però la seva principal funció fisiològica és protegir la cèl·lula de la toxicitat del formaldehid. Aquest compost en forma lliure és molt reactiu ja que pot formar enllaços metilèns estables amb amides i amines, i per tant, es pot unir a proteïnes i DNA. L'enzim no interacciona amb el formaldehid directament, sinó que ho fa amb el tiohemiacetal S-hidroximetilglutatió (HMGSH), que es forma per reacció espontània del formaldehid amb el glutatió (GSH), oxidant-el a S-formilglutatió (Uotila i Koivusalo, 1974a). Aquest producte és hidrolitzat posteriorment a format i GSH per l'acció de l'enzim S-formilglutatió hidrolasa (Uotila i Koivusalo, 1974b). Una altra activitat important de l'ADH3 és la reducció del S-nitrosoglutatió, compost que resulta de la reacció espontània entre GSH i òxid nítric (NO) (Jensen et al., 1998).

Recentment, estudis amb ratolins *Adh3* *-/-*, han suggerit que l'ADH3 participa en la formació d'àcid retinoic, tot i que *in vitro* l'activitat de l'ADH3 amb retinoides és extremadament baixa (Molotkov et al., 2002c).

### ADH4

L'ADH4 es troba distribuïda en diferents mucoses, teixits epitelials i òrgans externs, com la mucosa bucal, esòfag, tracte gastrointestinal, ull, pell i òrgans sexuals, però no en fetge (Moreno i Parés, 1991). L'enzim presenta activitat amb etanol i amb compostos aromàtics, però té una major eficiència catalítica pels substrats de cadena lineal mitjana i llarga. A pH 7,5, la  $K_m$  de l'ADH4 per a tots els substrats alifàtics és més alta que la de l'ADH1 i l'ADH2, però els valors de  $k_{cat}$  de l'ADH4 també són els més alts d'entre totes les ADHs humanes. L'ADH4 mostra una sensibilitat a la inhibició per 4-metilpirazole intermitja entre l'ADH1 i l'ADH2.

L'ADH4 és especialment activa amb aldehids produïts en la peroxidació lipídica (*trans*-2-hexenal i 4-hidroxinonenal) i  $\omega$ -hidroxiàcids grassos (Boleda et al., 1993; Allali-Hassani et al., 1998). Si es té en compte la seva distribució i especificitat de substrat, es suggereix que l'ADH4 podria tenir un paper protector com a primera tanca metabòlica davant alcohols i aldehids tòxics.

L'ADH4 també és molt activa amb els retinoides (Boleda et al., 1993; Yang et al., 1994; Allali-Hassani et al., 1998), i s'ha proposat que pot tenir una funció en la síntesi de l'àcid retinoic, durant el desenvolupament i en el manteniment i protecció dels teixits epitelials.

D'altra banda, l'alta activitat amb l'etanol i la presència de l'ADH4 en estómac han fet que es proposés l'implicació de l'enzim en el metabolisme de primer pas de l'etanol ingerit en humans (first – pass metabolism) (Yin et al., 1990; Moreno i Parés, 1991; Seitz et al., 1993).

#### *Altres ADHs*

L'ADH5 s'ha detectat a nivell genòmic en humans. S'ha localitzat el seu mRNA principalment en fetge, però també en intestí i ronyó (Yasunami et al., 1991; Estonius et al., 1996; Strömberg i Höög, 2000). Aquest enzim no s'ha pogut purificar mai a partir de teixit, i estudis d'expressió de la proteïna no han permès de trobar-ne els possibles substrats (Strömberg i Höög, 2000).

En rosegadors, s'ha identificat un cDNA en fetge i ronyó que inicialment s'havia assignat a una altra classe d'ADH, anomenada ADH6 (Zheng et al., 1993). Aquest cDNA donaria lloc a una ADH amb un extrem N-terminal més llarg que la resta d'ADHs. Com l'ADH5, no s'ha detectat mai la proteïna, i tampoc se n'ha trobat el substrat quan s'ha expressat la proteïna *in vitro* (Strömberg i Höög, 2000). Com que la identitat seqüencial entre enzims de la classe ADH6 és molt baixa, de l'ordre de la identitat entre la classe ADH5 i ADH6, s'ha proposat que aquests enzims serien membres de la mateixa classe (ADH5), constituïda per enzims molt divergents (Höög et al., 2001).

L'ADH7 és una classe d'ADH que s'ha detectat en pollastre, i que presenta activitat amb etanol i retinoides (Kedishvili et al., 1997).

En vertebrats, també s'ha detectat una altra ADH, l'ADH8, amb propietats diferenciades de la resta d'ADHs, ja que és l'única de la família ADH amb especificitat pel coenzim NADP(H) (Peralba et al., 1999; Rosell et al., 2003). L'enzim, detectat en estómac de granota, presenta activitat amb retinoides, i probablement funciona com a reductasa, tenint un possible paper en l'emmagatzematge de derivats de la vitamina A (Peralba et al., 1999; Duester, 2000).

### **LES DESHIDROGENASES / REDUCTASES DE CADENA CURTA**

Les deshidrogenases/reductases de cadena curta (short-chain dehydrogenase/reductase, SDR) presenten subunitats enzimàtiques d'aproximadament 250 residus, amb un pes molecular de 25–30 kDa, i caracteritzades per un centre actiu amb el motiu YXXXX, sense ió metàl·lic en la seva estructura, a diferència de les ADHs (Jörnvall et al., 1995).

Aquests enzims presenten activitat amb molts alcohols i aldehids fisiològics, entre els que destaquen els hidroxiesteroides i també els retinoides (Duester, 2000). Majoritàriament, són enzims microsomals i, segons les diferents famílies, utilitzen NAD(H) o bé NADP(H) com a coenzim.

L'activitat d'aquests enzims amb retinoides, igual que ADH1, ADH2, ADH3 i sobretot ADH4, ha fet sorgir un debat sobre la participació relativa de cada família enzimàtica en el metabolisme de la vitamina A. Per això, a continuació s'amplia la descripció de les SDR actives amb retinoides, informació que serà important en el desenvolupament de la discussió d'aquest treball.

### Retinol deshidrogenases de la superfamília SDR

No existeix una classificació ni una nomenclatura ordenada per a les SDRs actives amb retinoides. En general es poden dividir en dos grans grups, les retinol deshidrogenases que es localitzen principalment en fetge, encara que també en altres òrgans (RoDHs i CRADs), i les retinol deshidrogenases oculars (RDH5, retSDR1 i prRDH), relacionades amb el cicle visual.

#### RoDHs

S'han descrit les retinol deshidrogenases RoDH1, RoDH2 i RoDH3, que s'han localitzat només en rosegadors (Chai et al., 1995a; Chai et al., 1995b; Chai et al., 1996). Aquests tres enzims microsòmals s'han detectat principalment en fetge, i en menys quantitat la RoDH1 i RoDH2 també en ronyó, pulmó, cervell i testicles (Chai et al., 1995a; Chai et al., 1995b). Les tres proteïnes mostren més afinitat pel NADP(H) que pel NAD(H). Aquest fet, juntament amb l'activitat amb el tot-*trans*-retinal, fa suposar que podrien intervenir majoritàriament en la reducció fisiològica de retinol (Duester, 2000). S'ha proposat que les SDRs poden tenir un paper important en el metabolisme de retinoides en base a l'activitat *in vitro* de la RoDH1 amb el complex format per retinol i la proteïna unidora de retinol CRBP-I, forma en la qual es troba majoritàriament el retinol en la cèl·lula (Boerman i Napoli, 1995).

En humans, s'ha descrit la RoDH4, enzim microsomal que a diferència de les RoDH1, RoDH2 i RoDH3 de rosegadors, utilitza preferentment NAD(H) (Gough et al., 1998), encara que presenta similar especificitat de substrat, amb més activitat pels compostos tot-*trans* que pels isòmers *cis*. Aquest enzim s'ha detectat en fetge, adult i fetal, i en pulmó fetal.

#### CRADs

Dues SDR microsòmals, anomenades *cis*-retinol/androgen deshidrogenases, s'han identificat en rosegadors, la CRAD1 (Chai et al., 1997), localitzada principalment en ronyó, fetge, i cor, i amb menys quantitat en pulmó, cervell i testicles, i la CRAD2, localitzada en fetge, però també en pulmó, ronyó i cervell (Su et al., 1998). Aquests dos enzims presenten més afinitat pel NAD(H) que pel NADP(H), i respecte a l'activitat amb retinoides, mostren preferència pels *cis*-retinoides sobre els isòmers tot-*trans*.

#### RDH5

Aquesta retinol deshidrogenasa s'ha detectat en ratolí, bou i en humans. L'enzim es localitza en l'epiteli pigmentat de la retina (Simon et al., 1995; Driessen et al., 1995), però també en altres teixits, com fetge, ronyó i cervell (Romert et al., 1998; Gamble et al., 1999). És un enzim microsomal que utilitza NAD(H) com a coenzim i que presenta activitat amb els derivats 11-*cis*- i el 9-*cis*- del retinol i del retinal (Gamble et al., 1999). La funció fisiològica més important de la RDH5 és intervenir en la regeneració del pigment visual 11-*cis*-retinal, per oxidació dependent de NAD del 11-*cis*-retinol, reacció que es produeix en l'epiteli pigmentat de la retina. Mutacions puntuals en el gen que codifica la RDH5 retarden l'adaptació a la foscor i causen *fundus albipunctatus*, que es relacionarien amb un metabolisme deficient del 11-*cis*-retinol (Yamamoto et al., 1999). Estudis amb ratolins *knock-out* per a la RDH5 no han confirmat la importància de la proteïna en el cicle visual, i els ratolins tenen una visió normal, encara que presenten una acumulació superior a la normal d'esters de *cis*-retinol a la retina (Driessen et al., 2000; Shang et al., 2002).

*retSDR1*

La *retSDR1* és un enzim microsomal que utilitza NADPH i redueix el tot-*trans*-retinal a tot-*trans*-retinol. Es localitza en els cons de la retina i la seva funció fisiològica és reduir el tot-*trans*-retinal, format per fotoisomerització a partir del 11-*cis*-retinal unit a la rodopsina. Després d'aquesta reducció, el tot-*trans*-retinol format és transportat a l'epiteli pigmentat de la retina, on es completa el cicle visual (Haeseleer et al., 1998).

*prRDH*

En el segment exterior de cons i de bastons s'ha localitzat una altra SDR associada a membrana, amb la mateixa activitat que la *retSDR1*, anomenada *prRDH*. L'enzim, que també utilitza NADPH, s'ha detectat en bou i en humans, i mostra més activitat amb el tot-*trans*-retinal que amb 11-*cis*-retinal (Rattner et al., 2000).

**LES ALDO-CETO REDUCTASES**

Les aldo-ceto reductases (AKRs) són oxidoreductases presents en vertebrats, plantes, llevats, protozous i bacteris. Són enzims majoritàriament dependents de NADP(H), i presenten activitat amb aldehids alifàtics i aromàtics, esteroides, prostaglandines i compostos hidrocarbonats policíclics (Jez et al., 1997).

Les AKRs són enzims monomèrics, amb cadenes polipeptídiques d'aproximadament 320 aminoàcids. Presenten una estructura terciària en forma de barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, que constitueix un nucli conservat entre les AKRs i és la base estructural per a la unió del coenzim. El perfil de la butxaca d'unió del substrat ve definit pels llaços externs que són variables i s'adapten a un gran nombre de substrats.

**AKRs amb activitat amb retinoides**

Entre les formes caracteritzades en vertebrats, les famílies d'AKRs més estudiades són les de l'aldosa reductasa (AR), l'aldehid reductasa i la hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD). Enzims de les famílies AR i 3 $\alpha$ -HSD presenten activitat amb retinoides, cosa que suggereix la seva participació en el metabolisme d'aquests compostos juntament amb les ADHs i les SRDs.

*AR*

L'aldosa reductasa (AR) ha estat descrita en diverses espècies de mamífer (home, rata, ratolí, bou, conill i porc), i es localitza principalment en ronyó, múscul, placenta i en l'epiteli pigmentat de la retina (Sato et al., 1993). Presenta activitat amb hexoses, pentoses, isocorticoesteroides, el derivat del colesterol isocaproaldehid i aldehids derivats de la peroxidació lipídica. Recentment s'ha descrit que l'AR humana (AKR1B1) redueix el tot-*trans*-, el 9-*cis*- i el 13-*cis*-retinal, però no presenta activitat amb el tot-*trans*-retinol (Crosas et al., 2003, Gallego et al., resultats no publicats).

Aquest enzim resulta de molt d'interès per la seva relació amb la diabetis. La seva capacitat de reduir glucosa a sorbitol (Wermuth et al., 1982) i la sobreexpressió del gen AR en malalts diabètics, ha generat la hipòtesi que correlaciona l'increment d'AR amb el desenvolupament de complicacions secundàries de la diabetis, com són retinopatia, nefropatia, neuropatia i, en general, disfuncions vasculares.

*AR-like*

Tot i ser un grup d'enzims proper a l'AR, l'AR-like presenta propietats cinètiques diferents. Així, mostra molt poca o nul·la eficiència catalítica vers la glucosa. Aquests enzims també poden participar en el metabolisme dels retinoides, ja que s'ha descrit una AR-like en pollastre, AKR1B12, dependent de NADP(H) que mostra activitat amb etanol i amb retinoides, principalment amb 9-*cis*-retinal (Crosas et al., 2001). L'AR-like humana, AKR1B10, també presenta activitat amb retinoides, ja que redueix el tot-*trans*-, el 9-*cis*- i el 13-*cis*-retinal (Crosas et al., 2003). Aquest enzim també és actiu amb el tot-*trans*-retinol, encara que menys que amb el tot-*trans*-retinal (Gallego et al., resultats no publicats).

*3 $\alpha$ -HSD*

En rata s'ha localitzat una 3 $\alpha$ -HSD, mentre que en humans s'han identificat quatre enzims estructuralment relacionats a la 3 $\alpha$ -HSD. Els enzims corresponen a la 3 $\alpha$ -HSD tipus 1 (AKR1C4), la 3 $\alpha$ (17 $\beta$ )-HSD tipus 2 (AKR1C3), la 3 $\alpha$ -HSD tipus 3 (AKR1C2) i la 20 $\alpha$ (3 $\alpha$ )-HSD (AKR1C1). Tots els enzims són dependents de NAD(P)(H) i actuen com a 3-, 17- i 20-cetoesteroide reductasa, i com a 3 $\alpha$ -, 17 $\beta$ - i 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, de manera que la seva funció és modular els nivells d'activitat d'andrògens, estrògens i progestines (Penning et al., 2000). En concret, AKR1C4 i AKR1C3 estan implicades en el metabolisme hepàtic d'hormones esteroides, mentre que l'AKR1C2 està implicada en el metabolisme i transport de l'àcid biliar (Penning et al., 2000). Aquesta família enzimàtica, però, també pot estar relacionada amb el metabolisme de retinoides, ja que s'ha determinat que AKR1C3 i AKR1C7 presenten activitat amb el tot-*trans*-retinal (Endo et al., 2001, Gallego et al., resultats no publicats).

**METABOLISME DE L'ALCOHOL**

Quan es parla d'alcohol hom es refereix generalment a l'etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, alcohol etílic), que és el principal alcohol de les begudes alcohòliques. L'alcohol és una droga, ja que segons la definició de l'Organització Mundial de la Salut (OMS), una droga és tota substància química que introduïda en l'organisme pot produir modificacions diverses en el funcionament del cos. En concret, l'alcohol està classificat com a droga depressora del sistema nerviós central, però tot i que es tracta d'una droga amb alt poder addictiu, té un alta tolerància social i està àmpliament present i acceptada dins la nostra cultura occidental.

**Absorció, distribució i eliminació de l'etanol**

L'alcohol ingerit s'absorbeix ràpidament a l'intestí prim, i en menor grau, també a l'estómac i a l'intestí gruixut. L'absorció es prolonga mentre hi hagi un gradient de concentració d'etanol entre el sistema gastrointestinal i la sang. El nivell màxim d'alcohol en sang s'assoleix entre 30 i 90 min després de la ingesta de la beguda. La velocitat de l'absorció depèn de varis factors (Forman, 1988), entre els que destaquen:

*la concentració d'etanol:* si augmenta el gradient de concentració d'etanol, l'absorció és més eficaç.

*la velocitat del consum:* l'alcoholèmia en sang és major si es beu una sola dosi que varies espaiades en el temps.

*el tipus de beguda:* suposant una concentració d'alcohol igual, l'etanol de les begudes destil·lades com el whisky o la ginebra per exemple, s'absorbeix més ràpidament que el del vi o la cervesa,

perquè compostos químics que acompanyen a les begudes fermentades (acetaldehid, metanol, pentanol, àcid benzoic, ...) en retarden l'absorció.

*presència de menjar a l'estómac:* la presència de menjar alenteix el buidatge gàstric i per tant, l'absorció de l'etanol.

Després de ser absorbit, l'etanol és portat al fetge per la circulació portal abans d'entrar en la circulació general, és a dir, primer penetra a la vena porta, travessa el fetge i surt per la vena hepàtica cap el cor, que l'envia als pulmons i després de retornar al cor, passa a la circulació perifèrica (Tam, 1993). El volum petit, i les característiques alhora polars i liposolubles de la molècula d'etanol, li permeten creuar les membranes cel·lulars i distribuir-se en l'organisme proporcionalment a la quantitat d'aigua de cada teixit. D'aquesta manera, la quantitat d'alcohol en sang és més elevada que la del múscul, fetge o cervell (Abel, 1982). Després que s'hagi completat la distribució de l'etanol en els teixits, l'alcoholèmia baixa de forma lineal amb el temps (Li, 1983), degut a que es metabolitza i s'elimina a una velocitat aproximada de 0,1 g d'alcohol per cada Kg de pes i hora.

El 2–10 % de l'etanol s'elimina, sense ser metabolitzat, principalment per l'orina, l'aire respirat i la suor. L'etanol es metabolitza principalment en fetge, amb una contribució del 75 %, mentre que la resta s'elimina pel metabolisme extrahepàtic de teixits com l'estómac, l'intestí, pulmons i ronyons. S'ha estimat que la capacitat metabòlica de l'etanol del fetge és de 2 mmol/min, mentre que el metabolisme extrahepàtic és de 0,4 mmol/min (Li, 1977).

Cal assenyalar també la presència d'una certa quantitat d'etanol endogen, que prové de les fermentacions de la flora bacteriana intestinal.

Les diferències en la capacitat de cada individu per metabolitzar l'etanol es deuen a diferències en 1) el sistema enzimàtic de l'alcohol deshidrogenasa i de l'aldehid deshidrogenasa, que fan variar les propietats cinètiques dels enzims responsables de l'eliminació de l'etanol, 2) la concentració d'aquests enzims en la cèl·lula, i 3) la velocitat de restauració de l'estat redox de la cèl·lula (Plapp, 1994).

L'etanol és eliminat per oxidació a acetaldehid, al qual se li atribueixen molts dels efectes tòxics de l'alcohol. L'acetaldehid té un elevat poder mutagènic, i a més, degut a la seva capacitat per reaccionar amb grups amino i sulfhidril lliures de les proteïnes, pot provocar la formació d'adductes que poden generar anticossos i la inactivació d'enzims.

Les cèl·lules hepàtiques disposen de tres sistemes enzimàtics per oxidar l'etanol que es localitzen en compartiments subcel·lulars diferents. La via principal d'oxidació és la de l'ADH, que es troba en el citosol, però també hi contribueixen el citocrom P450 2E1 (sistema d'oxidació de l'etanol microsomal, MEOS), localitzat en el reticle endoplasmàtic, i la catalasa, que es troba en els peroxisomes (Lieber, 1987). L'acetaldehid produït és oxidat a acetat per acció de l'aldehid deshidrogenasa (ALDH) principalment també en el fetge, en una reacció irreversible. Una petita part de l'acetaldehid, però, pot alliberar-se a la sang, arribant a concentracions no superiors a 3  $\mu$ M. La major part de l'acetat s'allibera a la circulació sanguínia i assoleix nivells de 1–2 mM. L'acetil-CoA sintetasa activa l'acetat, que pot llavors entrar en el cicle de Krebs per produir energia, aigua i diòxid de carboni (Figura 8).

*Via de l'alcohol deshidrogenasa*

L'enzim ADH, principalment hepàtic però també present en diferents òrgans del cos, és responsable d'aproximadament el 90 % de l'oxidació de l'etanol (Figures 1 i 8), per acció de les diferents formes enzimàtiques que s'han descrit anteriorment.

*Via del citocrom P450*

El principal enzim responsable del metabolisme microsomal de l'etanol és el citocrom P450 2E1 (CYP2E1), que es localitza en el reticle endoplasmàtic i utilitza NADPH com a coenzim (Lieber i DeCarli, 1972) (Figura 8). El citocrom P450 és un sistema general de desintoxicació, format per múltiples citocroms que s'indueixen per moltes substàncies (Lieber, 1987). El citocrom P450 2E1 presenta una  $K_m$  relativament alta per a l'etanol (aproximadament 10 mM) (Kunitoh et al., 1993), de manera que la seva contribució pot ser important a dosis altes d'alcohol, arribant a contribuir en un 10 % del seu metabolisme. L'etanol indueix el citocrom P450 2E1, que també metabolitza altres drogues, carcinògens i xenobiòtics. Aquest fet pot contribuir a un efecte sinèrgic de la toxicitat d'altres compostos a causa de l'etanol. A més, el citocrom també genera radicals lliures, que podrien tenir un paper en els efectes tòxics de l'alcohol (Ishii i Thurman, 1996).

*Via de la catalasa*

La catalasa (EC 1.2.1.6) està involucrada en l'oxidació d'alcohols per produir els corresponents aldehids en els peroxisomes, utilitzant aigua oxigenada com a co-substrat (Figura 8). El pas limitant d'aquesta reacció és la baixa concentració d' $H_2O_2$  a l'organisme, compost tòxic. És per això que, en general, la contribució de la catalasa en el metabolisme de l'etanol és baixa, malgrat que l'enzim presenti una baixa  $K_m$  per l'etanol (0,6 mM).

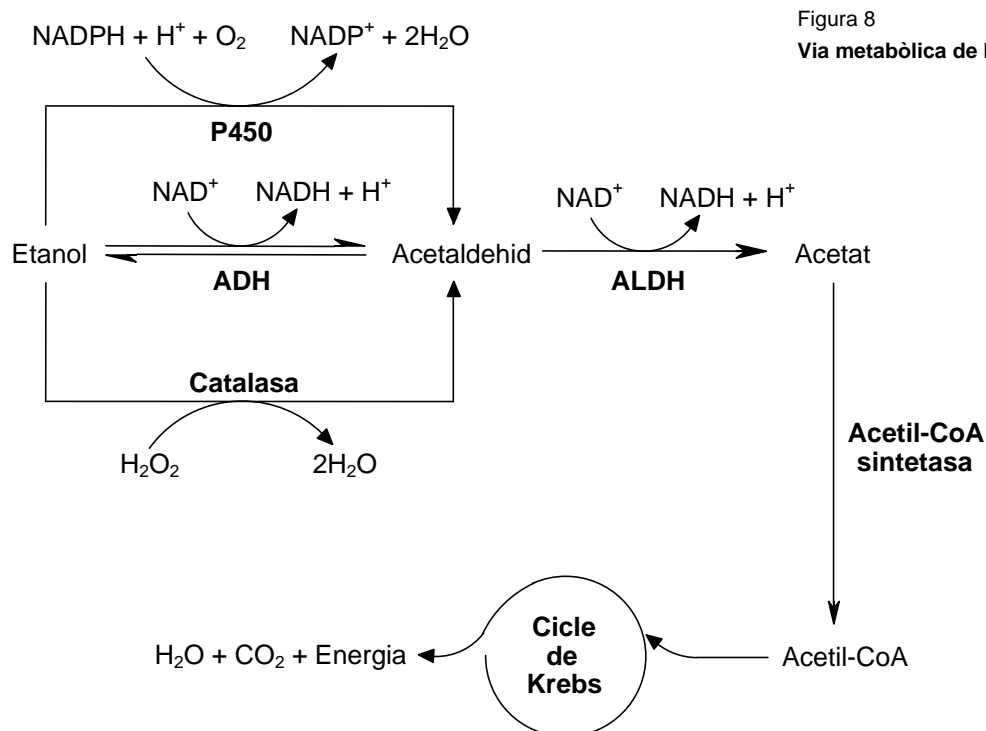


Figura 8  
Via metabòlica de l'etanol



### Efectes de l'alcohol

Els efectes de l'alcohol varien segons les persones i les quantitats ingerides. Després de beure alcohol, aquest arriba al cervell i provoca els símptomes d'embriaguesa en els seus diversos graus. En un primer moment té un efecte estimulador i desinhibidor, cosa que fa que faciliti la comunicació i les relacions interpersonals, però després passa a ser depressor. Com que es tracta d'una substància de fàcil accés, l'hàbit pot desenvolupar-se des de la joventut, però el perill es troba en el fet que cada vegada es necessiten dosis més altes per aconseguir l'efecte desitjat. La intoxicació etílica aguda provoca alteracions de la visió i de la percepció, llenguatge embarbussat, trastorns de la coordinació, confusió mental i desorientació, reducció de la capacitat autocrítica, canvis absurds de l'estat d'humor i emotivitat (depressió, eufòria,...), afectació de la memòria i empobriment de les funcions del pensament. En intoxicacions greus, aquests símptomes s'agreugen amb irritabilitat, agressivitat, amnèsia, i fins i tot pèrdua del coneixement, coma i mort per depressió cardiorespiratòria.

El consum abusiu d'alcohol de forma continuada, comporta l'aparició de la dependència psíquica i física. En aquests casos, la interrupció del consum de begudes alcohòliques dóna lloc a l'aparició de la síndrome d'abstinència o *delirium tremens*, caracteritzat principalment per visions, al·lucinacions, tremolors a tot el cos i inquietud psicomotriu. La intoxicació etílica crònica afecta sobretot el fetge i el sistema nerviós central. Existeix risc de desenvolupar dany hepàtic amb un consum de 30 g diaris d'alcohol, que pot ser sever a partir de 120 g per dia. Un gram d'alcohol aporta 7 kcal, de manera que l'alcohol és el combustible amb el que funcionen molts alcohòlics, però en tractar-se de calories buides, que només subministren energia, comporta un dèficit nutricional, especialment de proteïnes i vitamines, que també pot contribuir als efectes tòxics de l'alcohol. Els canvis en el fetge produïts per l'alcohol poden donar lloc a fetge gras (esteatosi, acumulació de lípids en forma de gotes en les cèl·lules hepàtiques), hepatitis alcohòlica (inflamació del fetge), i cirrosi (el fetge perd cèl·lules hepàtiques funcionals, que són substituïdes per teixit fibrós, amb formació de nòduls que comprimeixen la circulació dins el fetge). La fibrosi que comporta la cirrosi dificulta la circulació portal a través del fetge, de manera que la pressió venosa de la vena porta i les seves branques augmenta, cosa que pot donar lloc a varius esofàgiques, que es poden ulcerar i sagnar, produint hemorràgies digestives. La cirrosi és un procés irreversible que provoca la mort de l'individu.

Els efectes sobre el sistema nerviós central poden donar lloc a canvis de caràcter, alteracions de la memòria, confusió mental, i fins i tot, malalties mentals irreversibles, amb una disminució de les capacitats psíquiques, físiques i intel·lectuals de l'individu.

### METABOLISME DELS RETINOIDES

El terme 'vitamina A', fa referència a qualsevol compost que posseeixi l'activitat biològica del retinol, mentre que el terme 'retinoides' és un concepte modern que inclou tant les formes naturals com les sintètiques de la vitamina A, amb o sense activitat biològica.

El tot-*trans*-retinol, alcohol primari de pes molecular 286, és el compost bàsic a partir del qual s'originen tots els retinoides. L'estructura química prové de la unió de quatre grups isoprenoides, formant un anell ciclohexè i una cadena alifàtica amb cinc dobles enllaços conjugats, a l'extrem de la qual hi ha un grup polar que dóna caràcter amfipàtic a la molècula (Figura 9). Segons si el grup hidrofílic és alcohol, aldehid o àcid, es formen els principals retinoides: retinol, retinal o àcid retinoic, respectivament.

El retinol i els seus derivats són compostos hidrofòbics inestables, que s'oxiden fàcilment en presència d'oxigen i que es degraden per efecte de la llum, que indueix la isomerització dels dobles enllaços. Aquestes característiques obliguen a manipular els retinoides en atmosfera inert i sota llum vermella.

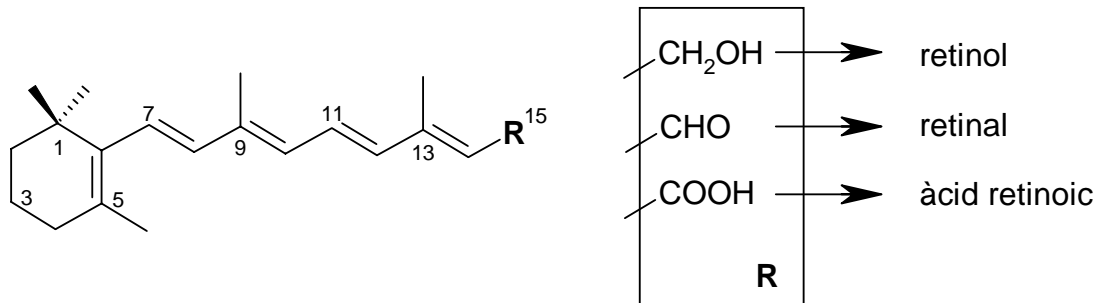


Figura 9

**Estructura química dels retinoides**

S'indica el número dels carbonis de la cadena principal, i la naturalesa de grup hidrofílic (R), que dona lloc als diferents retinoides.

**Importància fisiològica dels retinoides**

Els retinoides són essencials en el procés de la visió i, a través de la regulació de l'expressió gènica, també són imprescindibles en processos de diferenciació, proliferació i apoptosi. En concret, els retinoides participen en el desenvolupament i el manteniment de les funcions de molts processos biològics, com la reproducció (espermatogènesi, concepció, formació de la placenta), l'embriogènesi (definició dels eixos del cos i de les extremitats, desenvolupament del sistema nerviós), i el manteniment d'epitelis, d'ossos i del sistema immunitari (Figura 10) (Napoli, 1996).

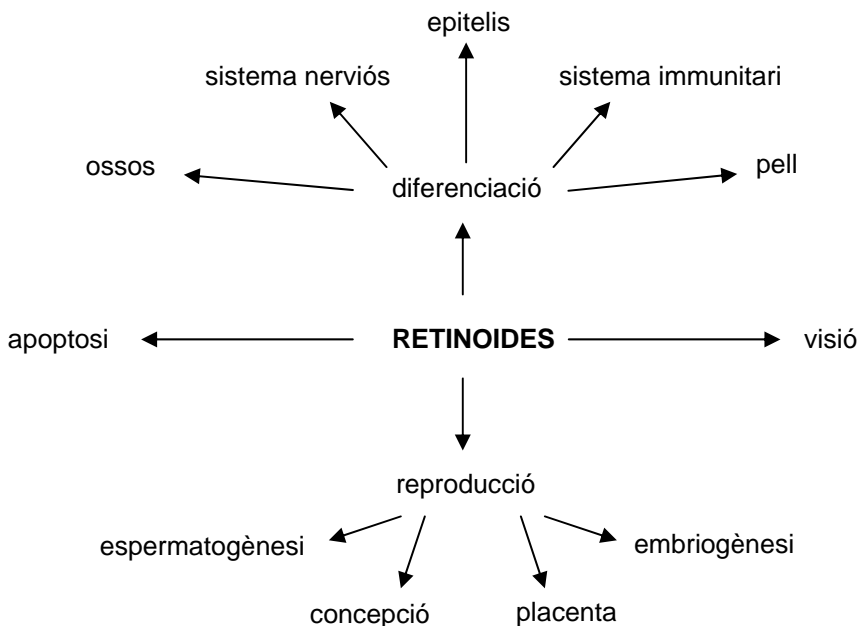


Figura 10  
**Importància fisiològica dels retinoides**

Els retinoides són importants en la visió, en l'apoptosi i en processos de reproducció i diferenciació.

La vitamina A s'obté de la dieta a través d'aliments d'origen animal, com la llet, els ous, la mantega i el fetge, i també en forma de provitamina A o carotens provinents de verdures verdes i grogues, com la pastanaga, els espinacs o l'enciam. Existeix un requeriment diari de consum de vitamina A, ja que tant l'excés com la deficiència de vitamina A provoquen diversos símptomes i malfuncionaments.

El retinol és el precursor dels retinoides funcionals: l'àcid tot-*trans*-retinoic, l'àcid 9-*cis*-retinoic, l'11-*cis*-retinal, l'àcid 3,4-dideshidroretinoic i també l'anhidroretinol, el 14-hidroxi-4,14-*retro*-retinol, l'àcid 4-oxo-retinoic i el 4-oxo-retinol (Collins and Mao, 1999) (Figura 11). Tot i que la forma predominant del retinol és la tot-*trans*, existeixen cinc isòmers més del retinol a nivell fisiològic, que són l'11-*cis*, el 13-*cis*, el 9,13-di-*cis*, el 9-*cis* i el 11,13-di-*cis* (Collins and Mao, 1999).

Degut a les seves implicacions fisiològiques, els retinoides també tenen importància farmacològica ja que s'utilitzen en el tractament de certes dermatitis i cert tipus de leucèmies. S'investiga el paper terapèutic que podrien tenir els retinoides davant certs tipus de càncer. S'ha demostrat que la deficiència de vitamina A augmenta la susceptibilitat al càncer en els epitelis respiratoris, la glàndula mamària, la bufeta urinària i la pell, de manera que la progressió de les cèl.lules malignes es fa més lenta, s'atura, o fins i tot reverteix en administrar retinoides a animals d'experimentació.

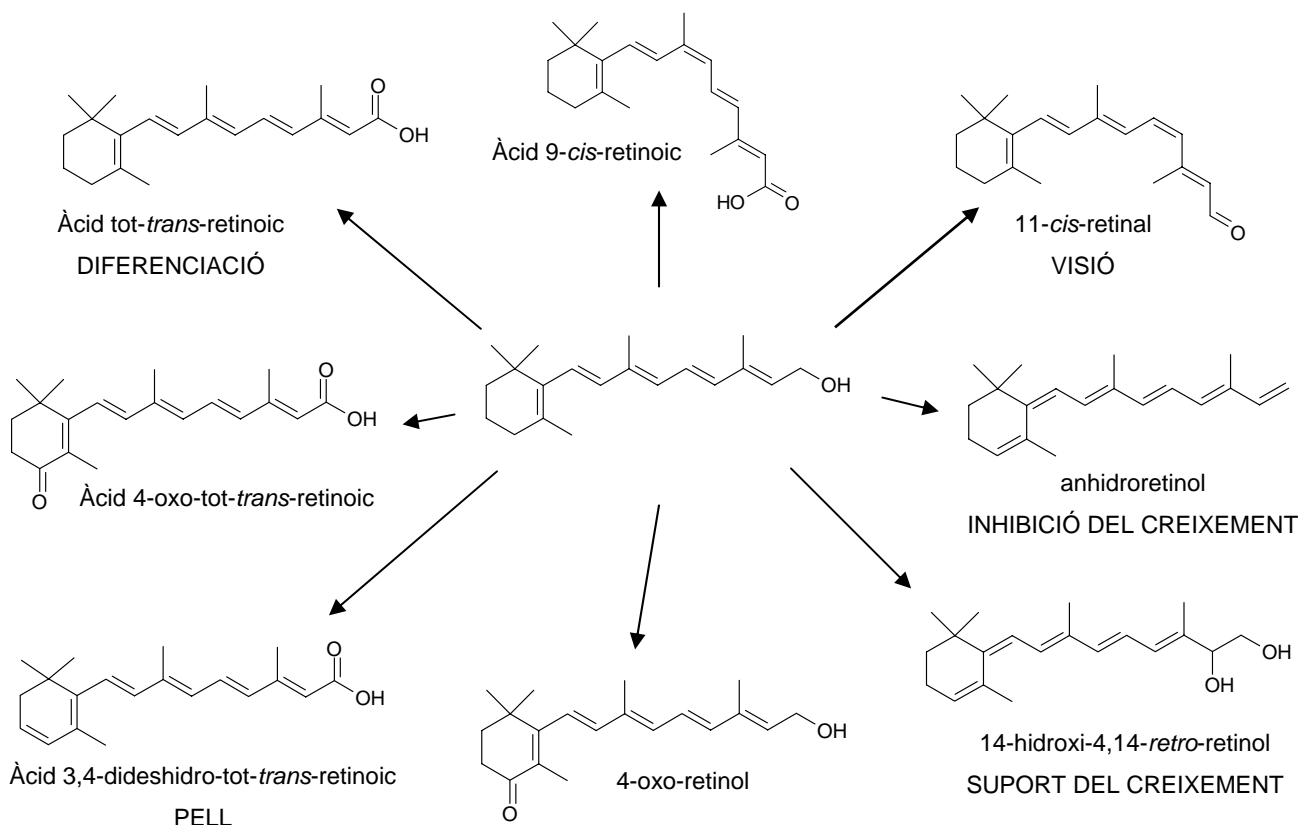


Figura 11

**Estructura i funció dels retinoides**

Estructura dels retinoides biològicament actius, amb la seva principal funció.

*La deficiència de vitamina A*

La deficiència de vitamina A (hipovitaminosi A) i les seves conseqüències es manifesten en situacions de fam i malnutrició, tal com les que es troben actualment en molts països del tercer món i amb persones alcohòliques en països desenvolupats. La relació entre factors de la dieta i certes malalties ja es coneixia fa 3500 anys, quan els antics egipcis recomanaven el tractament tòpic amb fetge de bou sobre els ulls per als casos de ceguesa nocturna. Aquest símptoma, relacionat amb la deficiència de vitamina A, també va ser descrit per Hipòcrates (460 – 327 a.C.), que recomanava l'ús tòpic de fetge, i també la seva ingesta. El símptoma i el tractament també és descrit per la medicina xinesa (s. VII d.C.) i per la medicina àrab (s. IX d.C.).

A part de la ceguesa nocturna, la deficiència de vitamina A provoca sequedat i queratinització de la conjuntiva i de la còrnia. També afecta altres teixits, ja que pot provocar queratinització del pulmó, del tracte gastrointestinal i de l'epiteli del tracte urinari i hiperqueratosi de la pell. La deficiència de vitamina A augmenta la susceptibilitat a infeccions i retarda el creixement en nens. Fins i tot pot produir la mort. La hipovitaminosi A materna resulta en un increment de la mortalitat fetal i en malformacions congènites que afecten sobretot el cor, l'ull, i els sistemes respiratori, urogenital i circulatori. Totes aquestes disfuncions poden ser previngudes amb suplement de vitamina A (Ross et al., 2000).

*Toxicitat de la vitamina A*

L'excés de vitamina A, de la mateixa manera que la seva deficiència, també és perjudicial i provoca una síndrome tòxica que es coneix amb el nom d'hipervitaminosi A. Aquesta síndrome, que pot ser aguda o crònica, pot aparèixer per l'ingesta de medicaments que continguin retinoides, tals com l'àcid 13-*cis*-retinoic (Accutane®, Roaccutan®) que s'utilitzen en el tractament de malalties de la pell com l'acne, o per ingestió de dietes enriquides en vitamina A. El retinol en excés s'acumula en el fetge, i provoca alteracions de la funció hepàtica. La hipervitaminosi A també origina altres trastorns, com danys a les mucoses oculars i bucals, pell seca i irritació cutània que provoca descamació i èczema, caiguda del cabell, dolors musculars i de cap, somnolència, irritabilitat i vòmits. A part, l'àcid retinoic és teratogènic, i l'excés de vitamina A causa malformacions en el fetus que afecten sobretot el cor, el crani i l'esquelet, les extremitats, els ulls i les estructures craniofacials (Ross et al., 2000).

**Absorció, distribució i emmagatzematge del retinol**

La vitamina A s'incorpora al cos a partir de la ingestió de fruites i vegetals principalment, que contenen  $\beta$ -carotè, precursor de retinol, o bé per la ingestió d'aliments animals que contenen retinoides, en general en forma d'esters. Els  $\beta$ -carotens ingerits són absorbits en el lumen intestinal per difusió passiva, i en els enteròcits són escindits donant lloc a dues molècules de retinal, que després són reduïdes a retinol per una retinal reductasa (Blomhoff et al., 1991). Aquesta reducció és produïda per una reductasa citosòlica, encara que s'ha proposat també que un enzim de la membrana microsomal podria reduir el retinal si aquest forma un complex amb una proteïna citosòlica unidora de retinol, típica d'intestí (CRBP-II). Els esters de retinol, en canvi, són hidrolitzats en el lumen intestinal per lipases no específiques, de manera que el retinol que prové d'esters és absorbit pels enteròcits per difusió (Blomhoff et al., 1991). En els enteròcits, el retinol format o absorbit és esterificat, formant principalment palmitat, oleat i estearat de retinol, degut a l'acció de dos enzims: la LRAT (lecitina:retinol aciltransferasa), que esterifica el retinol unit a la proteïna CRBP-II, i l'ARAT

(acil CoA:retinol aciltransferasa) que, en casos d'excés de vitamina A, esterifica el retinol no complexat (Blomhoff, 1994).

Juntament amb triacilglicerols, fosfolípids, esters de colesterol, i altres molècules liposolubles, els esters de retinol són empaquetats en el reticle endoplasmàtic formant els quilomicrons, que són secretats al sistema limfàtic, i després a la circulació general fins al fetge. Durant la circulació dels quilomicrons, es produeixen un seguit de reaccions catabòliques (p. ex. hidròlisi dels triacilglicerols) i processos com la transferència de part dels fosfolípids i d'altres compostos des dels quilomicrons a lipoproteïnes o membranes cel·lulars, que condueixen a la formació dels quilomicrons residuals. Aquests quilomicrons, que contenen encara la major part dels esters de retinol, s'uneixen a receptors de la superfície de les cèl·lules parenquimàtiques del fetge (hepatòcits) i són absorbits per aquestes cèl·lules. Els esters de retinol són hidrolitzats a retinol en els hepatòcits, i el retinol format s'uneix a una proteïna unidora de retinol (RBP). El complex és transferit a les cèl·lules estrellades del fetge. En aquestes cèl·lules, el retinol s'uneix a la proteïna unidora de retinol CRBP-I, cosa que permet l'esterificació del retinol per l'enzim LRAT. El fetge és la reserva principal de vitamina A del cos, on es localitza el 50 – 80 % del retinol total. D'aquest retinol, el 90 – 95 % es localitza en les cèl·lules estrellades, majoritàriament en forma d'esters de retinol (Blomhoff, 1994).

Quan el retinol és requerit per cèl·lules i teixits, es mobilitza a partir de les cèl·lules hepàtiques, i es secreta a la circulació general, però en tractar-se d'una molècula liposoluble ho fa unit a una proteïna unidora de retinol (RBP). La proteïna RBP es complexa alhora a la proteïna transtiretina (TTR), per reduir la filtració glomerular del retinol. El mecanisme de captació del retinol per les cèl·lules no és ben conegut, i es discuteix la intervenció de mecanismes no específics per captar retinol lliure o, alternativament, amb la implicació de receptors de membrana per a la proteïna RBP, per captar el complex retinol–RBP. La major part del retinol que entra a les cèl·lules es recicla cap al plasma, mentre que una petita part es metabolitza a retinoides actius com l'àcid retinoic, s'esterifica per ser emmagatzemat, o es catabolitza per ser excretat del cos. En general, el retinol és la forma majoritària de vitamina A que circula per la sang, però també hi circulen altres retinoides a concentració més baixa, com l'àcid tot-*trans*-retinoic, que ho fa unit a albúmina (Blomhoff, 1994).

### **Metabolisme i mecanisme d'acció dels retinoides**

La formació de l'àcid retinoic, la forma activa del retinol, implica dues etapes d'oxidació. La primera oxidació, de retinol a retinal, és una reacció reversible que constitueix el pas limitant de la via, mentre que la segona oxidació, de retinal a àcid retinoic, és una reacció irreversible (Figura 12). En el citoplasma, el retinol, el retinal i l'àcid retinoic es troben units a proteïnes citoplasmàtiques d'unió de retinoides (CRBP, per al retinol i retinal, CRABP per a l'àcid retinoic), que els estableixen, i impedeixen l'agregació i la interacció amb altres molècules com els fosfolípids de les membranes.

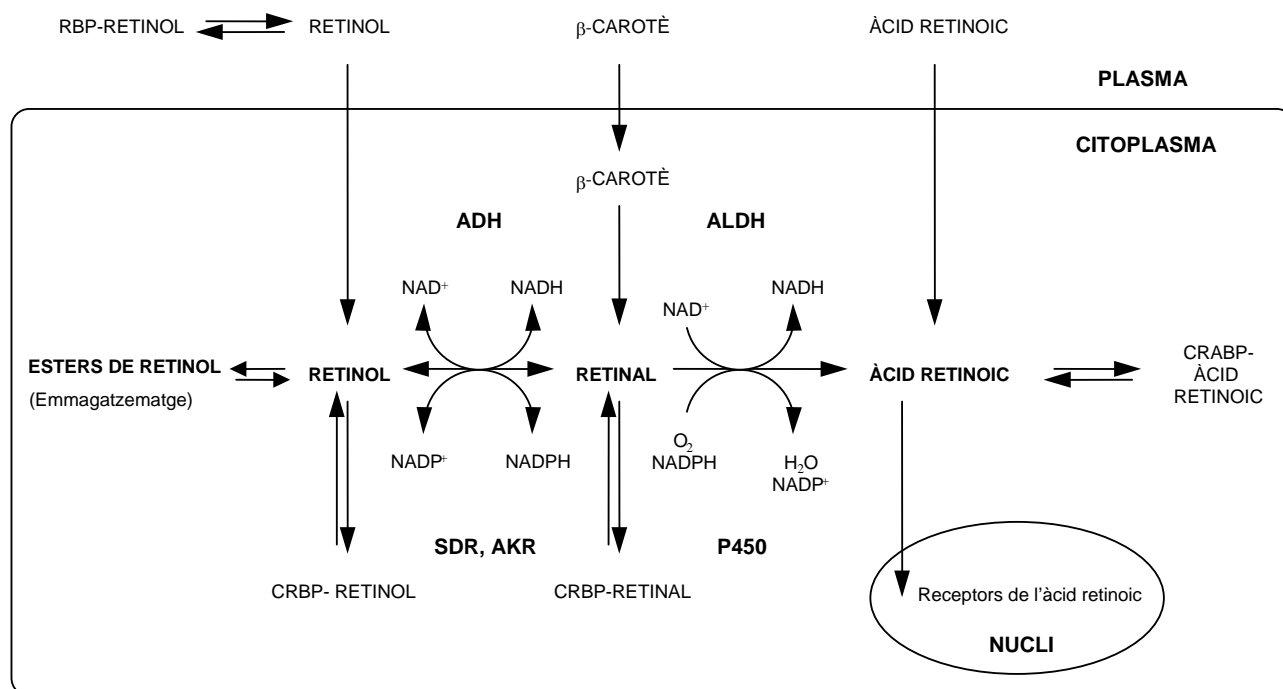


Figura 12

**Mecanisme proposat per a la síntesi de l'àcid retinoic i l'emmagatzemament de retinoides**

El retinol és transportat en el plasma unit a la proteïna RBP, abans d'entrar dins les cèl·lules. En el citoplasma, el retinol pot ser esterificat, o oxidat a àcid retinoic. Aquesta oxidació es produeix a través de dues reaccions consecutives d'oxidació, la primera de retinol a retinal, on l'ADH hi té un paper important, i la segona de retinal a àcid retinoic (Figura modificada de Duester, 1996).

*Oxidació del retinol*

S'ha proposat que dos grups d'enzims són responsables de l'oxidació del retinol a retinal: alcohol deshidrogenases de cadena mitjana i deshidrogenases/reductases de cadena curta (SDRs) conegudes com retinol deshidrogenases (Duester, 2000). Recentment, però, s'ha demostrat que alguns enzims de la família de les aldo-ceto reductases també oxiden retinols (Crosas et al., 2001, 2003, Gallego et al., resultats no publicats).

ADH1, ADH2 i ADH4 oxiden diferents isòmers de retinol *in vitro* en presència de  $\text{NAD}^+$  (Figura 12). De totes les ADHs, l'enzim més actiu amb retinoides és l'ADH4. Durant el desenvolupament embrionari de ratolins, la colocalització de l'expressió dels gens de l'ADH1 i/o de l'ADH4 amb l'aparició d'àcid retinoic, suggereix un paper actiu d'aquests enzims en la síntesi de l'àcid retinoic (Ang et al., 1996a, Haselbeck i Duester, 1998). Aquesta colocalització també es dona en epitelis que requereixen àcid retinoic per al seu funcionament, com l'epidermis (Haselbeck et al., 1997), les mucoses de l'esòfag i l'estómac (Haselbeck i Duester, 1997), i el tracte reproductiu masculí (Deltour et al., 1997). D'altra banda, estudis genètics amb ratolins *knockout* han demostrat la participació *in vivo* de l'ADH1, l'ADH4 i també de l'ADH3 en el metabolisme de retinoides (Deltour et al., 1999b, Molotkov et al., 2002c). Aquests estudis semblen demostrar que la funció de l'ADH1 en el metabolisme de retinoides és de protecció contra la toxicitat del retinol, mentre que l'ADH4 té un paper important en la síntesi de l'àcid retinoic durant el desenvolupament embrionari, perquè a més de la colocalització de la proteïna i de la síntesi de l'àcid retinoic esmentada anteriorment, s'observa un descens de la supervivència fetal en estat de deficiència de vitamina A dels ratolins *knockout* respecte als silvestres (Deltour et al., 1999a, Molotkov et al., 2002a). També s'ha relacionat l'ADH3, anomenada formaldehid

deshidrogenasa, amb el metabolisme del retinol perquè ratolins *knockout* presenten un menor pes corporal que es normalitza amb un suplement de vitamina A a la dieta (Molotkov et al., 2002c). S'ha comprovat *in vitro* que l'activitat de l'ADH3 és 1400 vegades inferior a la de l'ADH1 i 4000 vegades inferior a la de l'ADH4 amb tot-*trans*-retinol, però la distribució de l'ADH3 en tots els teixits, a diferència de la resta d'ADHs, li pot conferir un paper especial en el metabolisme dels retinoides (Molotkov et al., 2002c). L'ADH2 malgrat que és activa amb retinol (Yang et al., 1994, Svensson et al., 1999), representa només un 2 % de l'activitat retinol deshidrogenasa citosòlica del fetge. A més presenta importants diferències cinètiques entre espècies, i per això es pensa que no deu tenir una funció conservada evolutivament com a retinol deshidrogenasa.

Les retinol deshidrogenases/reductases de cadena curta (SDR) són enzims microsomals capaços d'oxidar retinol o de reduir retinal, utilitzant NAD<sup>+</sup>(H) o NADP<sup>+</sup>(H) com a coenzim, respectivament (Figura 12). S'han descrit diverses retinol deshidrogenases (RoDH1, RoDH2, RoDH3 i RoDH4) i *cis*-retinol/androgen deshidrogenases (CRAD1 i CRAD2), que es troben, en general, de forma majoritària en fetge. Es creu que poden tenir un paper més important que les ADHs en el metabolisme de retinoides, degut a que moltes d'elles utilitzen com a substrat el retinol unit a la proteïna CRBP (holo-CRBP), que és la forma majoritària amb la que es troba el retinol dins la cèl·lula. Tot i això, existeixen dubtes sobre aquest fet, perquè les retinol deshidrogenases de cadena curta també presenten activitat amb esteroides, i ratolins *knockout* per a la CRBP-I presenten una disminució de l'emmagatzemament de retinol en forma d'esters de retinol, però no sembla alterat el seu metabolisme a àcid retinoic (Ghyselinck et al., 1999).

#### *Reducció del retinal*

S'ha descrit que les alcohol deshidrogenases (ADH), les retinol deshidrogenases/reductases de cadena curta (SDR) i algunes aldo-ceto reductases (AKR) (aldoses reductases (AR), aldoses reductases-*like* (AR-*like*) i 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenases (3 $\alpha$ -HSD)) presenten activitat amb retinals (Allali-Hassani et al., 1998, Duester, 2000, Crosas et al., 2003, Gallego et al., resultats no publicats). Les AR i les 3 $\alpha$ -HSD estudiades presenten només activitat retinal reductasa, i no són actives amb retinol, però la resta d'enzims són capaços d'oxidar el retinol i reduir el corresponent retinal. S'ha proposat, però, que les retinol deshidrogenases que utilitzen preferentment NAD(H), actuarien en l'oxidació del retinol, mentre que les que utilitzen NADP(H), tindrien la funció de retinal reductases (Duester, 2000).

#### *Oxidació del retinal*

L'oxidació de retinal a àcid retinoic és una reacció irreversible que implica enzims de la família de les aldehyd deshidrogenases (ALDH) i dels citocroms P450.

S'han descrit tres ALDH citosòliques que oxiden retinal *in vitro* utilitzant NAD<sup>+</sup> com a cofactor, anomenades ALDH1A1 (ALDH1 en humans, AHD2 en ratolí, RALDH1 en rata), ALDH1A2 (ALDH11 en humans, RALDH2 en rata, V2 en retina d'embrió de ratolí) i ALDH1A3 (ALDH6 en humans, RALDH3 en rossegadors, V1 en retina d'embrió de ratolí). Recentment s'ha descrit una nova forma, ALDH8A1 (ALDH12 en humans, RALDH4 en ratolí) més activa amb 9-*cis*- que amb tot-*trans*-retinal (Lin et al., 2003). Aquestes ALDH es localitzen en teixits on es requereix àcid retinoic durant el desenvolupament embrionari, i també en teixits epitelials on es requereix àcid retinoic per al seu manteniment en la vida adulta, així com en retina (Duester, 2000). A més, la importància de les ALDH en el metabolisme de retinoides es reflecteix en estudis genètics: la sobreexpressió de la RALDH1 demostra que aquest enzim participa en el metabolisme del retinal a àcid

retinoic *in vivo* (Ang and Duester, 1999), i ratolins *knockout* per a la RALDH2 pateixen una deficiència d'àcid retinoic que produeix la mort dels embrions, demostrant que aquests enzims són essencials per a la funció dels retinoides (Niederreither et al., 1999).

Alguns enzims de la família dels citocroms P450, com el P450 1A1 i el 1A2 també han estat involucrats en la reacció d'oxidació del retinal a àcid retinoic. Aquests enzims microsomals metabolitzen el tot-*trans*- i el 9-*cis*-retinal als corresponents àcid retinoics, però també són capaços d'oxidar l'anell ciclohexè en la posició C4 de l'àcid retinoic, del retinal i del retinol (Duester, 1996, Roberts et al., 1992, Raner et al., 1996, Tomita et al., 1996). D'altra banda, s'ha observat que l'expressió del gen del citocrom P450 1A1 s'inicia a partir del dia 7 de gestació en embrions de ratolí, indicant que podria tenir un paper en la síntesi de l'àcid retinoic durant l'embriogènesi (Duester, 1996).

#### Acció de l'àcid retinoic

L'acció biològica de la vitamina A, amb excepció del cycle visual, és produïda per l'àcid retinoic. Els àcids tot-*trans*- i 9-*cis*-retinoic activen els receptors RAR i RXR, que pertanyen a la superfamília dels receptors d'hormones esteroides/tiroïdals/vitamina D/retinoides (Napoli, 1996). Cada família de receptors de retinoides està constituïda per tres tipus de receptors, anomenats  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , que presenten una distribució diferent segons el teixit. Els RARs funcionen com a heterodímers unint-se a un RXR, i reconeixen tant l'àcid tot-*trans*-retinoic com l'àcid 9-*cis*-retinoic. En canvi, els RXRs també homodimeritzen, i només interaccionen amb l'àcid 9-*cis*-retinoic (Figura 13). Els receptors RXR també són capaços de formar heterodímers amb altres receptors, com el de l'hormona tiroïdal (RXR-TR) o el de la vitamina D (RXR-DR). L'existència de les diferents famílies i tipus de receptors de retinoides i les possibilitats múltiples de dimerització entre ells i amb altres receptors, explica la complexitat del control de l'expressió gènica produïda per retinoides, així com la diversitat d'efectes que produeixen (Napoli, 1996).

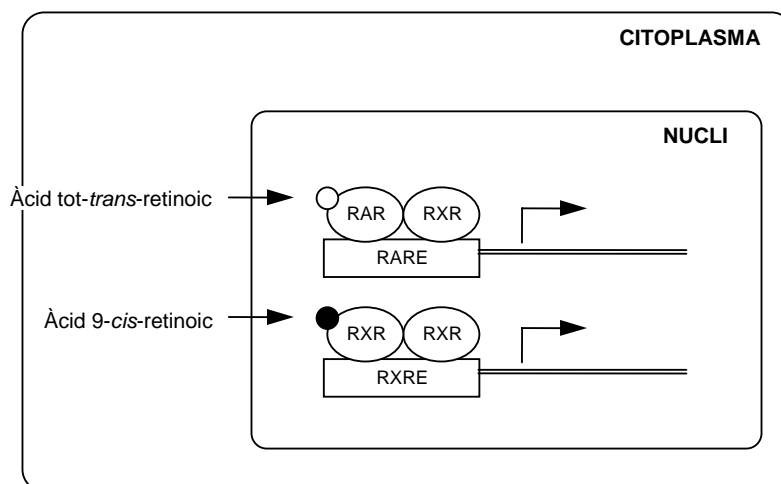


Figura 13

#### Model del mecanisme d'acció dels retinoides

Els àcids tot-*trans*- i 9-*cis*-retinoic interaccionen amb els corresponents receptors (RAR, RXR), formant dímers, abans d'unir-se als elements de resposta a àcid retinoic (RARE, RXRE) que desencadenaran la funció requerida.

Cada complex retinoide-receptor actua sobre la transcripció gènica, unint-se a un element de resposta a àcid retinoic del DNA, RARE o RXRE, que es situa en la regió promotora de gens diana. Molts d'aquests elements de resposta consisteixen en una repetició directa d'una seqüència de 6 parells de bases (5'



(A/G)G(G/T)TCA), separats per una seqüència variable d'un a cinc parells de bases (Gudas, 1994). La varietat de seqüències dels elements de resposta permet donar lloc a múltiples respostes diferents d'activació o supressió de la transcripció gènica.

Els receptors RAR i RXR presenten una distribució tissular específica, diferenciada durant el desenvolupament embrionari i en l'adult, cosa que suggereix una funció específica per a cadascun d'ells en la regulació de la transcripció de gens específics. D'altra banda, ratolins amb mutacions en els RARs i els RXRs presenten defectes en el desenvolupament, el que demostra que aquests receptors són essencials en el control del senyal dels retinoides, perquè el seu malfuncionament produeix els mateixos efectes que els observats en cas de deficiència de vitamina A (Lohnes et al., 1994, Mendelsohn et al., 1994, Sucov et al., 1994, Kastner et al., 1994).

L'àcid retinoic regula de manera directa o indirecta més de 530 gens (Balmer and Blomhoff, 2002). D'aquests gens, n'hi ha que estan relacionats amb el metabolisme i acció dels retinoides, com són els gens de les proteïnes CRBP I i II (*rbp1* i *rbp2*), de la CRABP I i II (*crabp1* i *crabp2*), dels receptors RAR (*RARA*, *RARB*, *RARG*) i del citocrom P450RAI o CYP26A1 (*cyp26*). L'àcid retinoic també regula gens amb dominis homeobox, com són *hoxa1*, *HOXA4*, *hoxb1*, *hoxb4*, *hoxd4*, *cdx1* i *pit1* (Balmer and Blomhoff, 2002). L'expressió ordenada d'aquests gens durant el desenvolupament està implicada en la definició dels eixos anterior-posterior del cos central, de les extremitats i de les estructures craniofacials (Means and Gudas, 1995).

### El cicle visual

Els retinoides són imprescindibles en el fenomen de la visió. El primer pas d'aquest procés en vertebrats s'inicia quan un fotó de llum és absorbit per l'11-*cis*-retinal unit a l'opsina (rodopsina = opsina + 11-*cis*-retinal) provocant la isomerització de l'11-*cis*-retinal a tot-*trans*-retinal. Aquesta isomerització es produeix en el segment exterior dels cons i bastons, les cèl·lules fotoreceptores, i desencadena la fototransducció, una cascada d'esdeveniments que porten a la generació d'un senyal elèctric cap el nervi òptic. L'impuls nerviós generat és dirigit cap el cervell, on s'interpreta generant la visió.

En vertebrats, la regeneració de l'11-*cis*-retinal a partir del tot-*trans*-retinal es produeix a través del cicle visual (Figura 14). Després de la fotoisomerització de l'11-*cis*-retinal a tot-*trans*-retinal, la base de Schiff que forma el tot-*trans*-retinal amb l'opsina, s'hidrolitza i el tot-*trans*-retinal és reduït a tot-*trans*-retinol per acció de la retinol deshidrogenasa dels fotoreceptors (prRDH), enzim de membrana, dependent de NADPH, que pertany a la superfamília SDR (McBee et al., 2001). El tot-*trans*-retinal accedeix a l'enzim prRDH per difusió des de l'espai intradiscal de les cèl·lules fotoreceptores, però una petita part es transporta per unió a una proteïna específica, el cassette transportador dependent d'ATP o ABCR. Mutacions en el transportador ABCR s'han relacionat amb malalties de la retina, com la malaltia d'Stargardt (desordre autosòmic recessiu que es manifesta normalment abans dels 20 anys i es caracteritza per degeneració macular amb pèrdua de la visió central) i la retinosi pigmentària (malaltia que es manifesta amb degeneració de les cèl·lules fotoreceptores, provocant ceguesa nocturna i una progressiva pèrdua de la visió perifèrica). El tot-*trans*-retinol format es transporta a l'epiteli pigmentat de la retina (RPE) creuant l'espai extracel·lular que el separa de les cèl·lules fotoreceptores (Figura 14), unit a la proteïna d'unió de l'espai interfotoreceptor (IRBP) (McBee et al., 2001).

En el RPE, el tot-*trans*-retinol és esterificat per acció de l'enzim lecitina:retinol aciltransferasa (LRAT). Aquests esters, podrien ser substrats d'un enzim, encara no identificat, amb activitat isomerohidrolasa (ISOM), que utilitzaria l'energia de l'hidròlisi de l'ester per isomeritzar el tot-*trans*-retinol a 11-*cis*-retinol (Figura 14). L'11-*cis*-retinol format és oxidat a 11-*cis*-retinal per acció de l'11-*cis*-retinol deshidrogenasa (RDH5), una SDR (Figura 14). Fins a l'obtenció del ratolí *knockout* per a aquest enzim semblava que la RDH5 era essencial en el cycle visual, ja que mutacions puntuals causen *fundus albipunctatus* (ceguesa nocturna hereditària que es caracteritza per l'aparició de taques grogues difoses en el fons de l'ull i per una adaptació retardada a la foscor) (Yamamoto et al., 1999). El ratolí *knockout* per a aquesta proteïna presenta un cycle visual normal, amb una acumulació però, d'esters d'11 i 13-*cis*-retinol. D'aquesta manera es demostra que hi ha altres enzims o mecanismes capaços de suplir la funció de la RDH5 (Cideciyan et al., 2000, Driessen et al., 2000). D'altra banda, existeix el sistema RGR, proteïna G de retina acoblada a receptor, que isomeritza el tot-*trans*-retinal a 11-*cis*-retinal per acció de la llum (Figura 14). Finalment, l'11-*cis*-retinal retorna a les cèl·lules fotoreceptores, utilitzant els mateixos mecanismes amb els que és transportat el tot-*trans*-retinol per creuar l'espai interfotoreceptor (McBee et al., 2001) (Figura 14).

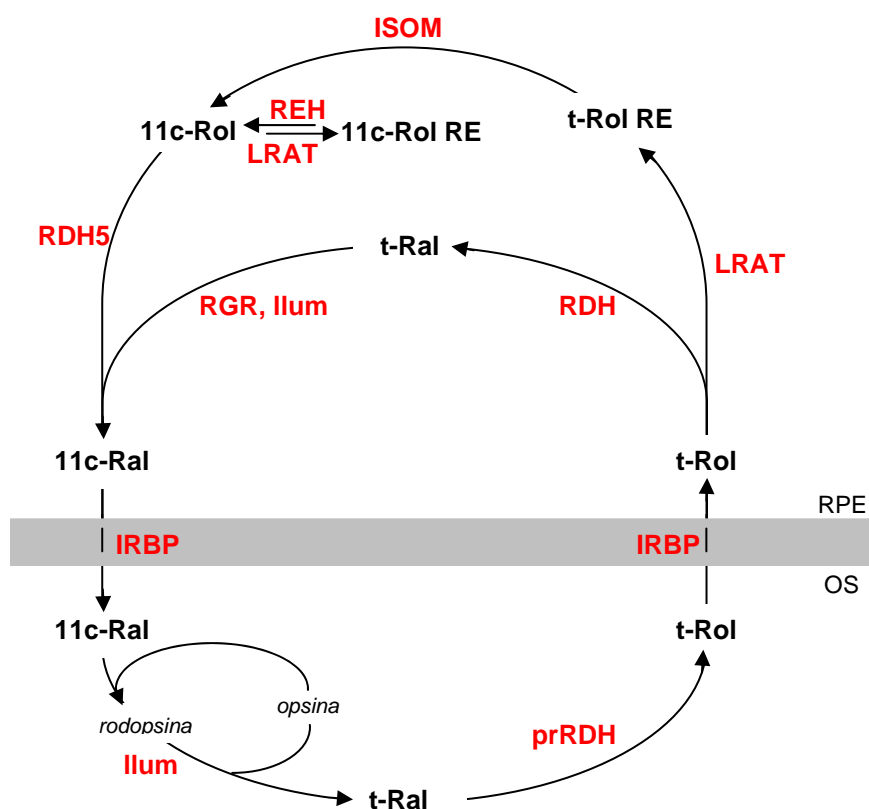


Figura 14

**El cycle visual**

Les reaccions transcorren en el segment exterior de les cèl·lules fotoreceptores (OS), i en les cèl·lules de l'epiteli pigmentat de la retina (RPE). Aquestes cèl·lules estan separades per l'espai interfotoreceptor assenyalat a la figura per la secció en gris. La rodopsina és un complex covalent d'11-*cis*-retinal i la proteïna opsina. El cycle visual comença amb la fotoisomerització d'aquest 11-*cis*-retinal per la llum a tot-*trans*-retinal. La isomerització provoca la dissociació del complex, i es produeix la reducció del tot-*trans*-retinal a tot-*trans*-retinol. En l'epiteli pigmentat de la retina es completa el cycle visual, amb la regeneració de l'11-*cis*-retinal. OS, segment exterior de les cèl·lules fotoreceptores; RPE, epiteli pigmentat de la retina; IRBP, proteïna unidora de retinol/retinal de l'espai interfotoreceptor; 11c-Ral, 11-*cis*-retinal; t-Ral, tot-*trans*-retinal; 11c-Rol, 11-*cis*-retinol; t-Rol, tot-*trans*-retinol; t-Rol RE, ester de tot-*trans*-retinol; 11c-Rol RE, ester d'11-*cis*-retinol; prRDH, RDH5, RDH, retinol deshidrogenases de cadena curta; LRAT, lecitina:retinol aciltransferasa; REH, retinil ester hidrolasa; ISOM; isomerohidrolasa; RGR, proteïna G de retina acoblada a receptor.

## EFECTE DE L'ALCOHOL EN EL METABOLISME DELS RETINOIDES

L'alcohol és un agent teratogènic, que ingerit durant l'embaràs pot provocar disfuncions cognitives i deficiències mentals de diversos graus i anomalies morfològiques. També existeixen evidències que el consum d'alcohol durant l'embaràs augmenta el risc de patir un avortament espontani. Les conseqüències de l'abús de l'alcohol durant la gestació, en els fetus que sobreviuen i els nens que neixen, es coneixen amb el nom de síndrome alcohòlica fetal (FAS). Els pacients presenten en general anomalies en el sistema nerviós central, que inclouen retard mental de mitjà a moderat, microcefàlia, alteració de la funció cognitiva i problemes conductuals i irritabilitat durant la infància. També presenten retard de creixement tant pre- com postnatal, una fisonomia característica i major risc de patir malformacions a altres parts del cos.

El període més crític per a l'efecte de l'etanol ingerit sembla trobar-se entre la quarta i la desena setmana d'embaràs, però els efectes observats depenen, entre altres factors, de les concentracions d'etanol assolides en sang, la freqüència de la ingesta, el tipus de beguda, l'estat nutricional i el grau de funcionalitat hepàtica materna, i la capacitat de metabolitzar alcohol per part del fetus i de la placenta.

Els mecanismes pels quals l'alcohol afecta el fetus, causant principalment defectes craniofacials, no són clars i existeixen varies hipòtesis que intenten explicar-los. Una d'elles suggereix que l'etanol inhibeix la primera reacció de la síntesi d'àcid retinoic, catalitzada per l'ADH (Figura 15) (Deltour et al., 1996, Duester, 1998, Zachman and Grummer, 1998). *In vitro*, l'etanol és un inhibidor competitiu de l'oxidació del retinol catalitzada pels diferents isoenzims de l'ADH1 humana ( $K_i = 0,037 - 3,8 \text{ mM}$ , Han et al., 1998) i per l'ADH4 de rata ( $K_i = 0,6 \text{ M}$ , Julià et al., 1986) i humana ( $K_i = 6-10 \text{ mM}$ , Allali-Hassani et al., 1998). Concentracions d'etanol de 10–30 mM, que s'assoleixen després d'una ingestió moderada-alta de begudes alcohòliques, són suficients per inhibir l'oxidació del retinol pels enzims humans. Aquesta hipòtesi està recolzada per les similituds que existeixen entre els efectes de la FAS i les malformacions provocades en casos d'excés o deficiència de vitamina A. S'ha demostrat que el tractament amb etanol d'embrions de guatlla provoca els mateixos efectes que la deficiència de vitamina A, i que l'àcid retinoic prevé els efectes de l'etanol (Zachman and Grummer, 1998). Així doncs, l'etanol alteraria la síntesi de l'àcid retinoic, disminuint-ne la formació i provocant danys en teixits que el requereixen per al seu desenvolupament i funcionament.

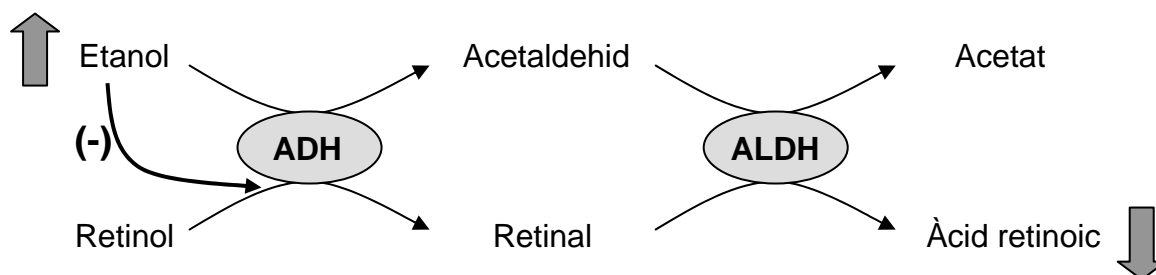


Figura 15

### Hipòtesi d'un mecanisme per explicar la síndrome d'alcoholisme fetal (FAS)

L'etanol ingerit, actuant com a inhibidor competitiu de la reacció d'oxidació del retinol a retinal catalitzada per l'ADH, podria provocar una disminució de la concentració de l'àcid retinoic en teixits on és essencial per al seu correcte desenvolupament.

## OBJECTIUS DE LA TESI

L'alta activitat de l'alcohol deshidrogenasa (ADH) amb retinoides, i la colocalització de diferents formes de l'enzim amb l'àcid retinoic en epitelis i durant el desenvolupament embrionari, suggereixen que l'ADH pot tenir un paper important en el metabolisme dels retinoides. L'ADH presenta activitat amb els isòmers tot-*trans*- i 9-*cis*- del retinol i del retinal, però es desconeix quina activitat presenta l'enzim amb altres isòmers, com els 11-*cis*-, que són essencials en el procés de la visió. D'altra banda, existeixen altres derivats fisiològics de la vitamina A menys estudiats, els retinoides oxidats a l'anell ciclohexè de la molècula, que són potencialment substrats de l'enzim. Així, els objectius concrets per ampliar el coneixement de l'especificitat de l'ADH amb retinoides són:

- Expressió, purificació i caracterització dels enzims de ratolí ADH1 i ADH4 i dels humans ADH1B1, ADH2B2 i ADH4, i del seu mutant ADH4 M141L.
- Síntesi de retinols utilitzant hidrur de bor i sodi, a partir dels corresponents retinals, i la seva caracterització per HPLC.
- Caracterització completa de l'activitat ADH amb tot-*trans*-retinoides i tots els possibles isòmers *cis* (7-*cis*-, 9-*cis*-, 11-*cis*- i 13-*cis*-) en la cadena alifàtica del retinol i retinal, utilitzant els enzims de ratolí ADH1 i ADH4 i els humans, ADH1B1, ADH2B2 i ADH4.
- Estudi cinètic i per modelatge molecular de l'especificitat de l'ADH4 pel l'11-*cis*-retinol, utilitzant l'ADH4 humana, el mutant ADH4 M141L i l'ADH1B1.
- Localització de l'ADH4 en retina per relacionar el metabolisme de retinoides i la presència de l'enzim, amb possibles funcions fisiològiques.
- Estudi de l'activitat de l'ADH amb derivats oxidats en l'anell ciclohexè.
- Estudi de l'efecte del detergent Tween 80 sobre l'activitat de l'ADH i sobre l'estabilitat de solucions aquoses de retinol.

## ARTICLE I

*Contribució de S. Martras en aquest treball:*

- Obtenció i clonatge del cDNA de totes les ADHs estudiades (ADHs humanes ADH1B1, ADH1B2, i ADH4 i el seu mutant M141L, i ADHs de ratolí ADH1 i ADH4) en el vector d'expressió pGEX-4T-2.
- Expressió i purificació de totes les ADHs estudiades.
- Caracterització de les ADHs de ratolí (ADH1 i ADH4) amb alcohols alifàtics.
- Obtenció de retinols a partir dels corresponents retinals per reducció amb borhidru de sodi.
- Determinació de les constants cinètiques de les ADHs amb retinoides.
- Interpretació dels resultats obtinguts en el modelatge molecular fet per D. Torres.
- Col·laboració amb la Dra. S. E. Martínez per localitzar l'ADH en retina i en l'epiteli pigmentat de la retina. Interpretació dels resultats obtinguts.
- Redacció de la primera versió de l'article.

# The specificity of alcohol dehydrogenase with *cis*-retinoids

## Activity with 11-*cis*-retinol and localization in retina

Silvia Martras<sup>1</sup>, Rosana Alvarez<sup>2</sup>, Susana E. Martínez<sup>1</sup>, Dámaso Torres<sup>1</sup>, Oriol Gallego<sup>1</sup>, Gregg Duester<sup>3</sup>, Jaume Farrés<sup>1</sup>, Angel R. de Lera<sup>2</sup> and Xavier Parés<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain;

<sup>2</sup>Department of Organic Chemistry, Universidad de Vigo, Pontevedra, Spain; <sup>3</sup>OncoDevelopmental Biology Program, Burnham Institute, La Jolla, CA, USA

Studies in knockout mice support the involvement of alcohol dehydrogenases ADH1 and ADH4 in retinoid metabolism, although kinetics with retinoids are not known for the mouse enzymes. Moreover, a role of alcohol dehydrogenase (ADH) in the eye retinoid interconversions cannot be ascertained due to the lack of information on the kinetics with 11-*cis*-retinoids. We report here the kinetics of human ADH1B1, ADH1B2, ADH4, and mouse ADH1 and ADH4 with all-*trans*-, 7-*cis*-, 9-*cis*-, 11-*cis*- and 13-*cis*-isomers of retinol and retinal. These retinoids are substrates for all enzymes tested, except the 13-*cis* isomers which are not used by ADH1. In general, human and mouse ADH4 exhibit similar activity, higher than that of ADH1, while mouse ADH1 is more efficient than the homologous human enzymes. All tested ADHs use 11-*cis*-retinoids efficiently. ADH4 shows much higher  $k_{\text{cat}}/K_m$  values for 11-*cis*-retinol oxidation than for

11-*cis*-retinal reduction, a unique property among mammalian ADHs for any alcohol/aldehyde substrate pair. Docking simulations and the kinetic properties of the human ADH4 M141L mutant demonstrated that residue 141, in the middle region of the active site, is essential for such ADH4 specificity. The distinct kinetics of ADH4 with 11-*cis*-retinol, its wide specificity with retinol isomers and its immunolocalization in several retinal cell layers, including pigment epithelium, support a role of this enzyme in the various retinol oxidations that occur in the retina. Cytosolic ADH4 activity may complement the isomer-specific microsomal enzymes involved in photopigment regeneration and retinoic acid synthesis.

**Keywords:** alcohol dehydrogenase; enzyme kinetics; retina; retinoid metabolism; retinol dehydrogenase.

Retinoids are essential in several physiological processes such as development, growth and cellular maintenance [1,2]. The active forms of retinol are its oxidized derivatives all-*trans*- and 9-*cis*-retinoic acid which perform their function through the binding to specific nuclear receptors [3,4]. Retinoic acids are synthesized by two enzymatic reactions which include retinol oxidation to retinal, and oxidation of retinal to retinoic acid. Two types of enzymes have been implicated in the first reaction: the alcohol dehydrogenases (ADH) of the medium-chain dehydrogenase/reductase family and the retinol dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family [5]. In mammals, ADH is a cytosolic NAD<sup>+</sup>-dependent enzyme formed by two subunits of 40 kDa, with two zinc atoms per subunit [6].

Genomic studies indicate that five ADH classes (ADH1–ADH5) exist in mammals [7]. It is well established that ADH1 and ADH4 [5,8], and to a lesser extent ADH2 [9], are involved in retinoid metabolism. Recently, it has been proposed that ADH3, the ubiquitous enzyme responsible for formaldehyde elimination, could also have a role in retinoic acid generation *in vivo* [10]. Nevertheless, the high activity toward retinoids and the spatiotemporal colocalization of ADH1 and ADH4 with retinoic acid during embryogenesis and in adult tissues [11,12], suggest a major role of these two enzymes in retinoid metabolism. Null-mutant mice to ADH1 or ADH4 show a normal development, but a reduced retinol oxidation, and indicate that each enzyme plays a distinct role *in vivo* [8].

Retinol dehydrogenases of the SDR family are enzymes of 25–38 kDa per subunit and, in contrast to ADH, do not require a metal ion in the active site [13]; they are microsomal enzymes and use NAD(H) or NADP(H) [5]. Some retinol dehydrogenases can oxidize retinol bound to cellular retinoid binding protein (CRBP), which constitutes the major form of retinol within the cell [5,14,15]. However, disruption of the *CRBPI* gene has shown that the CRBP protein is essential for retinyl ester storage, but not for retinoic acid synthesis [16], supporting the notion that enzymes which do not use CRBP-retinol, such as ADH [17], could contribute to retinoid metabolism.

11-*cis*-retinal bound to opsin is the chromophore of the retina. The absorption of one photon produces the

Correspondence to X. Parés, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

Fax: + 34 93 5811264, Tel.: + 34 93 5813026,

E-mail: xavier.pares@uab.es

**Abbreviations:** ADH, alcohol dehydrogenase; CRALBP, cellular retinaldehyde binding protein; CRBP, cellular retinol binding protein; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; RPE, retinal pigment epithelium; SDR, short-chain dehydrogenase/reductase.

(Received 3 November 2003, revised 18 December 2003, accepted 26 February 2004)

isomerization of 11-*cis*-retinal to all-*trans*-retinal, which constitutes the first step of the vision process [18]. A series of reactions, known as the visual cycle, will then regenerate 11-*cis*-retinal. All-*trans*-retinol dehydrogenase, an SDR enzyme, reduces the all-*trans*-retinal formed to all-*trans*-retinol in the rod outer segments. The retinoid is then transported to the retinal pigment epithelium (RPE) where the visual cycle is completed. All-*trans*-retinol could be stored there as retinyl esters, isomerized to 11-*cis*-retinol, and finally oxidized to 11-*cis*-retinal [18]. In addition, 11-*cis*-retinal has to be produced in the retina to generate the photopigments of cones [19] and of the photosensitive ganglion cells [20]. Finally, oxidation of all-*trans*-retinol is also required for the synthesis of retinoic acid, necessary for retina functions [21–23]. Although different microsomal SDR retinol dehydrogenases have been proposed to play an essential role in each oxidation step [18,19], cytosolic ADH4 has been purified from retina [24] and its activity has been detected in RPE [25].

In the present report, we have determined the kinetic constants of ADH1 and ADH4 toward *cis*-retinol and *cis*-retinal isomers. We used the human enzymes, because of their biomedical interest, but also the mouse ADHs as much is known on the involvement of ADH in retinol metabolism from the knockout experiments, but little information was available on the mouse ADH kinetics with retinoids [26]. An important finding has been the demonstration of 11-*cis*-retinol dehydrogenase activity in both ADH1 and ADH4 enzymes, which suggests a contribution of ADH in the photopigment regeneration. This has been further supported by the immunolocalization of ADH4 in the RPE and in several retinal cell layers. We have also explored the molecular basis of the ADH4 specificity with retinoids by docking simulations on the crystallographic structures.

## Experimental procedures

### Preparation of full-length cDNAs for human and mouse ADHs

Human ADH1B1 cDNA, cloned in the vector pT4 [27], was a gift from J.-O. Höög (Karolinska Institute, Stockholm). We designed two primers to amplify the full-length cDNA by polymerase chain reaction and introduced restriction sites (underlined) for *Bam*HI at the 5' end (5'-CTAT CGGATCCATGAGCACAGCAGGAAAAG-3') and for *Eco*RI at the 3' end (5'-CCACTTGAAATTCTCAAACGTCAGGACGGT-3'). Double digestion with *Bam*HI and *Eco*RI allowed the cloning in the expression vector pGEX-4T-2 (Amersham Pharmacia Biotech). Human ADH1B2 cDNA was prepared from ADH1B1 cDNA using the ADH1B1 cDNA cloned in the expression vector pGEX-4T-2 as follows. Based on the Quickchange™ Site-Directed Mutagenesis Kit method (Stratagene), we designed two primers (5'-GAATCTGTCACACAGATGACCACGTGG-3', amino acid positions 44–52 and 5'-GTCATCTGTGTGA CAGATTCCTACAGCC-3', amino acid positions 42–50) to introduce the mutation R47H by PCR. Mutated nucleotides are underlined.

The cDNA encoding for human ADH4 was amplified by PCR using as a template the full-length cDNA cloned into the vector pET-5a [28], and two primers to introduce the

same restriction sites as in the case of ADH1B1 (5'-CTA TCGGATCCATGGGCACTGTTGGAAAAG-3' and 5'-CCACTTGAAATTCTCAAACGTCAGGACCGT-3'), for the cloning into pGEX-4T-2. The same mutagenesis protocol as that used to prepare human ADH1B2, was followed for the ADH4 M141L mutant, using two specific primers (5'-CACCACCTTCCTGAACACCAGTACATT TAC-3', amino acid positions 138–146, and 5'-CTGGTG TTCAGGAAGTGGTGGACTGGTTTG-3', amino acid positions 134–144), and the ADH4 cDNA cloned in the expression vector pGEX-4T-2 as a template. Mouse ADH1 and ADH4 cDNA, both cloned in the vector pGEX-4T-2, were prepared as reported by Deltour *et al.* [29]. Full-length cDNAs were sequenced by Oswel Research Products Ltd (University of Southampton, UK).

### Expression and purification of ADH proteins

*Escherichia coli* BL21 cells, containing human ADH1B1, ADH1B2, ADH4, ADH4 M141L mutant, or mouse ADH1 or ADH4 cDNA, cloned in pGEX-4T-2, were grown in 2 L of 2× YT medium until stationary phase, at 25 °C. Zinc sulfate (10 μM) was added prior to induction with 0.1 mM isopropyl thio-β-D-galactoside (Roche Molecular Biochemicals), for 15 h at 22 °C. Cells were centrifuged at 2800 g, for 15 min at 4 °C, and pellets were frozen at –80 °C to facilitate cell lysis. Pellets were thawed and resuspended in 100 mM Tris/HCl, pH 7.0, 2.5 mM dithiothreitol (Sigma), 10% glycerol, 0.2 M sodium chloride, 10 μM zinc sulfate, and incubated with lysozyme (1 mg·mL<sup>-1</sup>, Sigma), for 30 min in an ice bath. The suspension was sonicated and the resulting homogenate was incubated with 1% (v/v) Triton X-100 for 30 min, and then treated with DNase (1 μg·mL<sup>-1</sup>, Roche Molecular Biochemicals) for 30 min at room temperature, to reduce sample viscosity. The homogenate was then centrifuged at 16 000 g for 30 min. The supernatant, containing the ADH-glutathione-S-transferase fusion protein, was incubated with Glutathione-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech), for 15 h at room temperature, and after washing with 100 mM Tris/HCl, pH 7.0, 2.5 mM dithiothreitol, 10% glycerol, 0.2 M sodium chloride, 10 μM zinc sulfate, the elution of the ADH was performed by thrombin digestion (10 U·mg<sup>-1</sup> protein, Amersham Pharmacia Biotech), for 15 h at room temperature. Protein homogeneity was checked by electrophoresis on SDS/PAGE followed by the Coomassie® Brilliant Blue (Sigma) stain technique. Protein concentration was determined by a dye binding assay (Bio-Rad) using bovine serum albumin as standard [30].

### Enzyme kinetics

Standard ADH activity was determined by measuring the change in NADH absorbance at 340 nm ( $\epsilon_{340}^{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) in a Varian Cary 400 spectrophotometer, at 25 °C. One unit (U) of ADH activity is defined as the amount of enzyme required to produce 1 μmol NADH per min at 25 °C. Activity was determined in 0.1 M glycine/NaOH, pH 10.5, for all ADHs except for ADH1B2 that was determined in 0.1 M glycine/NaOH, pH 8.5. The following cofactor and substrate concentrations were used:

2.4 mM NAD<sup>+</sup> (Sigma) and 30 mM ethanol for human ADH1B1 and ADH1B2; 2.4 mM NAD<sup>+</sup> and 100 mM ethanol for human ADH4; 0.3 mM NAD<sup>+</sup> and 10 mM ethanol for mouse ADH1; 2.4 mM NAD<sup>+</sup> and 2.5 M ethanol for mouse ADH4.

Commercially available retinoids were obtained from Sigma. 7-*cis*-retinal was prepared from the corresponding methyl 7-*cis*-retinoate, obtained by Suzuki cross-coupling, as described by Alvarez *et al.* [32]. 11-*cis*-retinol resulted from a highly stereoselective Wittig reaction [33], and it was used to prepare 11-*cis*-retinal by oxidation with MnO<sub>2</sub> [34]. For the synthesized retinoids, the retinals were the forms of storage. Synthesis of 7-*cis*-retinol, 9-*cis*-retinol and 11-*cis*-retinol were performed by reduction of the corresponding aldehydes with sodium borohydride immediately before use. The purity of the products was checked by reverse-phase HPLC [28]. The calculated molar absorption coefficients in the assay buffer were  $\epsilon_{329} = 25\,800\text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  for 11-*cis*-retinol,  $\epsilon_{380} = 19\,000\text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  and  $\epsilon_{400} = 15\,600\text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  for 11-*cis*-retinal and  $\epsilon_{376} = 25\,100\text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  and  $\epsilon_{400} = 17\,800\text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  for 7-*cis*-retinal. Because molar absorption coefficients for 7-*cis*-retinol in any organic solvent were not found in the literature, we determined a value in ethanol of  $\epsilon_{315} = 42\,000\text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ , which served to calculate an  $\epsilon_{318} = 40\,900\text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  in the assay buffer.

Activity with retinoids was determined by following the change in absorbance at 400 nm, using the molar absorption coefficients described above and those previously published [31]. Retinoid (3 mg) was dissolved in 250  $\mu\text{L}$  acetone, and 175  $\mu\text{L}$  of this solution was diluted in 25 mL of 0.1 M sodium phosphate, pH 7.5, 0.02% Tween-80. Retinoid solutions were prepared under dim red light and were kept protected from light at 4 °C, to prevent degradation. The final acetone concentration in the assay was lower than 0.12 mM.

Retinol oxidation was measured with 2.4 mM NAD<sup>+</sup> or 0.3 mM NAD<sup>+</sup> (mouse ADH1) using 1 cm pathlength cuvettes, while retinal reduction was measured with 1 mM NADH (Sigma) or 0.77 mM NADH (human ADH4) in 0.2 cm pathlength cuvettes. Retinoid concentration ranged from  $0.1 \times K_m$  to  $10 \times K_m$ . Activities were measured from the initial slope of the progress curves, registered for 3 min. During this time, the activity rate was linear. No photoisomerization of 11-*cis*-retinal to all-*trans*-retinal was detected during the assay, as assessed by the UV visible absorption spectra. Kinetic constants were calculated using the GRAFIT program (version 5.0, Erithacus Software Limited, Horley, Surrey, UK), and the reported results were expressed as the mean  $\pm$  S.E.M of at least three independent determinations. Catalytic constant ( $k_{\text{cat}}$ ) values were calculated using an  $M_r$  of 80 000 for the ADH dimer.

### Substrate-docking simulations

Docking simulations were performed in a Silicon Graphics Indigo 2 R10000 workstation, using the icm program (version 2.7, Molsoft LLC, 1997; La Jolla, CA, USA). Crystallographic coordinates of human ADH4 [35] were used to simulate its interaction with all-*trans*, 9-*cis* and 11-*cis* isomers of retinol and retinal. Crystallographic coordinates of human ADH1B1 [36] and of the mutant M141L [37] were used to simulate their interaction with 11-*cis*-retinal. In all

cases, a nonrigid docking based on a Monte Carlo procedure was employed with 500 000 iterative cycles, allowing free movement of the rotatable bonds of the substrate and of the  $\chi$  angles of the residues inside a 5 Å radius from the docked substrate, and using distance restraints as described previously [31].

### Immunohistochemistry

Adult Sprague–Dawley rats were used. Animal protocols were approved by the Ethical Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona. After decapitation, eyes were immediately dissected and washed in NaCl/P<sub>i</sub> (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3, 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl). Lens were removed and the eye samples were immersed in 4% (w/v) paraformaldehyde (freshly prepared in NaCl/P<sub>i</sub>) for 12 h. Eyes were embedded in paraffin and sliced into serial 8  $\mu\text{m}$  sections using a Leica microtome, attached to coated microscope slides. Sections were dried at 37 °C for at least 12 h. Eye sections were dewaxed with xylene and hydrated through a graded series of decreasing ethanol concentrations (100% to 30%), followed by treatment with 0.5% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 20 min to eliminate endogenous peroxidase activity. Then, the sections were incubated with purified polyclonal antibodies against mouse ADH4 (1 : 100 dilution) [12], for 1 h. The ADH4 antibodies were highly specific for ADH4; they did not recognize ADH1 or ADH3, and only the ADH4 band was observed in a Western blot of eye homogenate [12]. The bound primary antibody was visualized by the Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Inc.), using biotinylated antirabbit IgG as a second antibody and a complex avidin-biotin conjugated with peroxidase. 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) was used as a chromogenic reagent. Sections were incubated, for 10 min, in NaCl/Tris (0.25 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl) containing 0.05% (w/v) 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.033% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tissues were then rinsed in NaCl/Tris, dehydrated and mounted using a xylene-based medium (ENTELLAN® neu, Merck).

Negative immunostaining controls were made by the preadsorption of the ADH4 antibody with an excess of purified recombinant ADH4, or by the omission of the primary antibody. Slides containing adjacent sections were stained with hematoxylin (Vector Laboratories, Inc.), dehydrated through a graded series of ethanol concentrations, followed by two xylene washes, and cover-slipped with ENTELLAN® neu. Examination of eye sections and image acquisition of immunohistochemical results were performed as reported previously [38].

## Results

### Expression and purification of ADHs

Human ADH1B1, ADH1B2, ADH4 and ADH4 M141L, and mouse ADH1 and ADH4 have been expressed at high levels in *E. coli* BL21 cells and purified to homogeneity. The usual yield of pure protein obtained, ranged from 0.1 mg·L<sup>-1</sup> culture for mouse ADH4 to 4–5 mg·L<sup>-1</sup> culture for human ADH4 and mouse ADH1. Specific activities, measured under standard conditions, were 0.2 U·mg<sup>-1</sup> for



human ADH1B1 and 15 U·mg<sup>-1</sup> for human ADH1B2, values comparable with those reported elsewhere [39,40]. In contrast, specific activities for mouse ADH1 (3.1 U·mg<sup>-1</sup>) and mouse ADH4 (130 U·mg<sup>-1</sup>) were higher than those reported previously for enzymes purified from mouse tissues [41]. The specific activities for human ADH4 and ADH4 M141L were 67 U·mg<sup>-1</sup> and 36 U·mg<sup>-1</sup>, respectively.

### Kinetic constants of mouse enzymes toward aliphatic alcohols

The kinetic constants with ethanol and hexanol, for the recombinant ADH1 and ADH4, were determined at pH 7.5 and 10.5 (Table 1). For both enzymes, the  $K_m$  values with hexanol were much lower than those with ethanol, resulting in a higher catalytic efficiency for the substrate with the longer carbon chain; a general property of mammalian ADH. Mouse ADH1 showed similar kinetic properties to rat ADH1 [42] and to human ADH1C [40]. Mouse ADH4 showed similar kinetic constants to rat ADH4 but it exhibited much higher  $K_m$  values for ethanol, at pH 7.5, than the human enzyme [31,42].

### Kinetic constants with retinoids

Kinetic constants with all-*trans*-retinol and all-*trans*-retinal, and with the *cis*-isomers of retinol and retinal (7-*cis*-, 9-*cis*-, 11-*cis*- and 13-*cis*-), were determined for human and mouse ADH1 and ADH4 enzymes (Tables 2 and 3, respectively). Except for the 13-*cis* isomers, all enzymes showed similar  $K_m$  values for all retinoids assayed, ranging from 8 to 35  $\mu$ M for retinols and from 4 to 28  $\mu$ M for retinals. However, ADH4 exhibited, in general, higher  $k_{cat}$  values than ADH1, thus having higher catalytic efficiencies ( $k_{cat}/K_m$ ). Mouse ADH1 was the best class I ADH tested, in terms of catalytic efficiency, followed by human ADH1B2. Human ADH1B1 was a poor enzyme toward retinoids, with catalytic constants being lower than 2 min<sup>-1</sup>. The ADH4 enzymes from the two species showed similar kinetic properties.

All tested ADH1 and ADH4 enzymes used 11-*cis*-retinoids. Human and mouse ADH4 efficiently oxidized 11-*cis*-retinol, while the ADH1 enzymes showed lower activity (Table 2). All enzymes exhibited comparable activity for the two reaction directions with any retinol/retinal pair, except ADH4 with 11-*cis*-retinoids. Interestingly, the

two ADH4 enzymes showed an 8-fold higher  $k_{cat}/K_m$  value with 11-*cis*-retinol than with 11-*cis*-retinal (Tables 2 and 3), while the  $K_m$  values were comparable. ADH4 therefore exhibits a strong and unique specificity for the 11-*cis*-retinol oxidation over the 11-*cis*-retinal reduction.

Previously we reported that ADH4 had no activity toward 13-*cis*-isomers [28,31]. However, by using a higher enzyme concentration (above 30  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>) in the assay, we show here that human ADH4 is in fact also active with 13-*cis*-retinoids, although with low  $k_{cat}$  values (Tables 2 and 3). Human ADH1 enzymes were not found to be active with 13-*cis*-retinoids, although a low activity had been previously reported with 13-*cis*-retinal [43].

7-*cis*-retinoids have not been described physiologically, but their kinetic study gives an estimate of the effect of the *cis*-bond position on the substrate specificity of human ADH4. The 7-*cis*- and 9-*cis*-retinol and retinal isomers were the most active substrates, in terms of  $k_{cat}/K_m$ , for ADH4, followed by 11-*cis*-retinol (Tables 2 and 3). In contrast, ADH1 generally exhibited more activity toward all-*trans*-retinoids.

### The specificity of human ADH4 with retinoids

The structural basis for the retinoid specificity of ADH4, was studied by docking all-*trans*-, 9-*cis*- and 11-*cis*- isomers of retinol and retinal into human ADH4-NAD(H) binary complex (Fig. 1). In all cases, except for 11-*cis*-retinal, retinoids are properly placed in the substrate-binding pocket, with an atomic distance between the functional oxygen atom and the catalytic Zn shorter than 3.16 Å. Moreover, the distance between the O atom of retinoids and the C4 of the nicotinamide ring, involved in the hydride transfer, is lower than 4.83 Å. In contrast, both distances are notably increased in the docked 11-*cis*-retinal, suggesting that the distinct location of the substrate in the binding pocket of ADH4 is the reason for the low activity observed with this retinal isomer.

The interaction of 11-*cis*-retinal with ADH1B1 was also studied and compared with that of ADH4 (Fig. 2A–D). 11-*cis*-retinal was well placed in the ADH1B1 substrate-binding pocket, as suggested by the short distance to the catalytic Zn (Figs 2C,D), in contrast to what is observed in ADH4 (Figs 2A,B). The middle region of the substrate-binding pocket of ADH4 is characterized by two Met residues at positions 57 and 141, resulting in a narrow space in comparison to ADH1B1, where these two residues are Leu. On the other hand, docking studies

**Table 1.** Kinetic constants for recombinant mouse alcohol dehydrogenases. Activities were determined in 0.1 M sodium phosphate (pH 7.5) or 0.1 M glycine (pH 10.5), using 0.3 mM NAD<sup>+</sup> for ADH1 or 2.4 mM NAD<sup>+</sup> for ADH4, at 25 °C.

Substrate	Constant	Units	pH 7.5		pH 10.5	
			ADH1	ADH4	ADH1	ADH4
Ethanol	$K_m$	(mM)	0.48 ± 0.09	1625 ± 370	0.83 ± 0.06	255 ± 60
	$k_{cat}$	(min <sup>-1</sup> )	115 ± 5	2480 ± 225	265 ± 5	12900 ± 905
	$k_{cat}/K_m$	(mM <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	240 ± 45	1.5 ± 0.4	320 ± 25	51 ± 13
Hexanol	$K_m$	(mM)	0.085 ± 0.003	1.9 ± 0.1	0.006 ± 0.001	0.63 ± 0.03
	$k_{cat}$	(min <sup>-1</sup> )	27 ± 1	1850 ± 500	230 ± 5	5190 ± 105
	$k_{cat}/K_m$	(mM <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	315 ± 15	970 ± 90	36200 ± 7000	8230 ± 400

**Table 2. Kinetic constants of alcohol dehydrogenases with retinol isomers.** Activities were determined in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.5, 0.02% Tween-80, using 2.4 mM NAD<sup>+</sup> (0.3 mM for mouse ADH1), at 25 °C. NA, no activity up to 150 μM substrate; ND, not determined.

Substrate	Constant	Units	Human			Mouse	
			ADH1B1	ADH1B2	ADH4	ADH1	ADH4
all- <i>trans</i> -retinol	$K_m$	(μM)	30 ± 8	33 ± 9	15 ± 4 <sup>a</sup>	31 ± 5	23 ± 4
	$k_{cat}$	(min <sup>-1</sup> )	1.7 ± 0.1	15 ± 1	67 ± 10 <sup>a</sup>	55 ± 3	125 ± 5
	$k_{cat}/K_m$	(mM <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	57 ± 16	455 ± 130	4500 ± 1370 <sup>a</sup>	1775 ± 300	5480 ± 990
7- <i>cis</i> -retinol	$K_m$	(μM)	ND	ND	27 ± 3	ND	ND
	$k_{cat}$	(min <sup>-1</sup> )			425 ± 15		
	$k_{cat}/K_m$	(mM <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )			15740 ± 1815		
9- <i>cis</i> -retinol	$K_m$	(μM)	11 ± 3	23 ± 5	36 ± 4 <sup>a</sup>	8 ± 1.1	21 ± 3
	$k_{cat}$	(min <sup>-1</sup> )	0.89 ± 0.06	3.6 ± 0.4	475 ± 44 <sup>a</sup>	23 ± 1	340 ± 15
	$k_{cat}/K_m$	(mM <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	81 ± 23	160 ± 40	13200 ± 2020 <sup>a</sup>	2900 ± 455	16100 ± 2400
11- <i>cis</i> -retinol	$K_m$	(μM)	35 ± 7	18 ± 4	28 ± 5	34 ± 9	23 ± 6
	$k_{cat}$	(min <sup>-1</sup> )	0.85 ± 0.04	9.5 ± 1.0	190 ± 20	25 ± 2	225 ± 5
	$k_{cat}/K_m$	(mM <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	24 ± 5	530 ± 55	6790 ± 1400	735 ± 205	9740 ± 2550
13- <i>cis</i> -retinol	$K_m$	(μM)	NA	NA	26 ± 3	ND	ND
	$k_{cat}$	(min <sup>-1</sup> )			0.76 ± 0.02		
	$k_{cat}/K_m$	(mM <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )			29 ± 3		

<sup>a</sup> Data taken from [28].**Table 3. Kinetic constants of alcohol dehydrogenases with retinal isomers.** Activities were determined in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.5, 0.02% Tween-80, using 1 mM NADH (0.77 mM for human ADH4), at 25 °C. NA, no activity up to 150 μM substrate; ND, not determined.

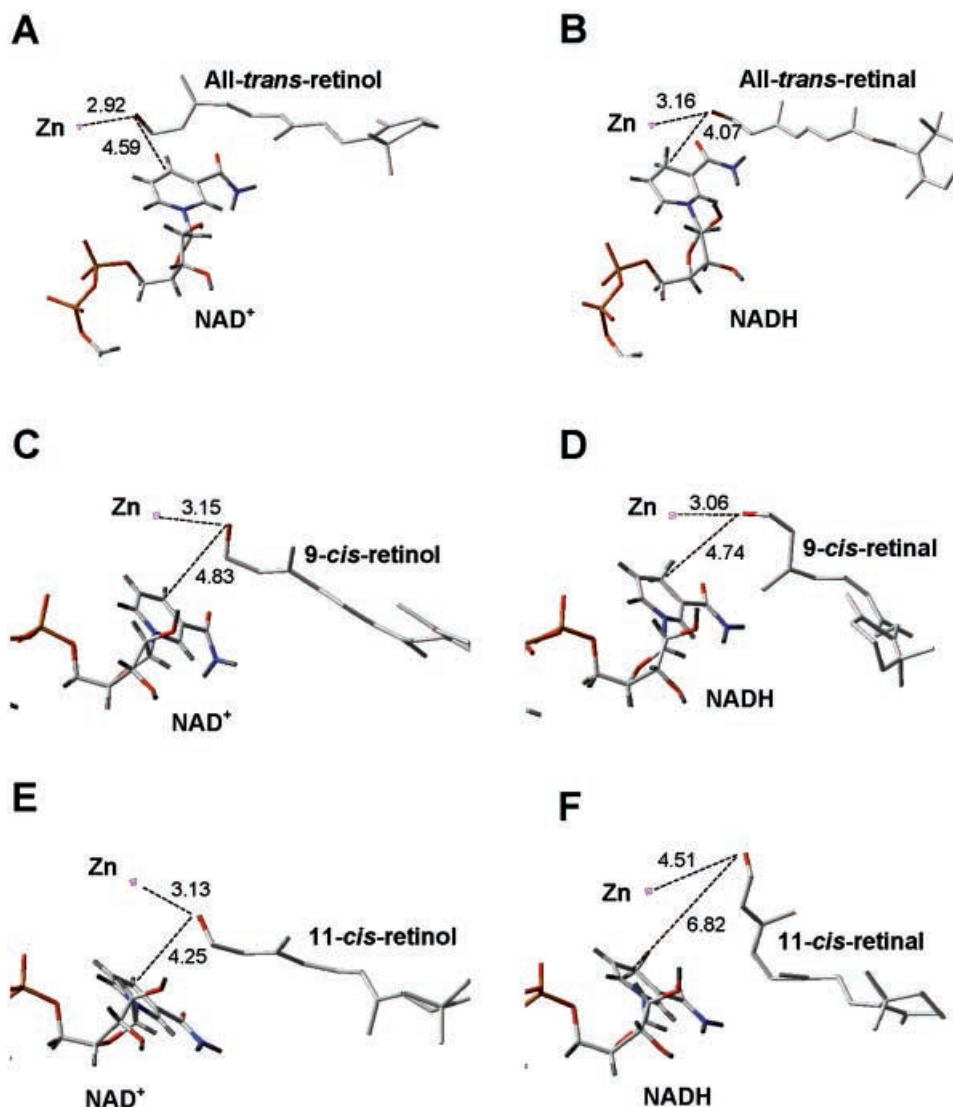
Substrate	Constant	Units	Human			Mouse	
			ADH1B1	ADH1B2	ADH4	ADH1	ADH4
all- <i>trans</i> -retinal	$K_m$	(μM)	11 ± 2	12 ± 3	34 ± 6 <sup>a</sup>	9.3 ± 1.1	11 ± 2
	$k_{cat}$	(min <sup>-1</sup> )	1.1 ± 0.1	33 ± 3	110 ± 25 <sup>a</sup>	19 ± 1	33 ± 2
	$k_{cat}/K_m$	(mM <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	100 ± 20	2750 ± 730	3300 ± 960 <sup>a</sup>	2045 ± 265	3000 ± 525
7- <i>cis</i> -retinal	$K_m$	(μM)	ND	ND	8 ± 2	ND	ND
	$k_{cat}$	(min <sup>-1</sup> )			80 ± 5		
	$k_{cat}/K_m$	(mM <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )			10000 ± 2610		
9- <i>cis</i> -retinal	$K_m$	(μM)	11 ± 2	4.1 ± 0.9	21 ± 5 <sup>a</sup>	13 ± 2	15 ± 2
	$k_{cat}$	(min <sup>-1</sup> )	1.8 ± 0.2	2.7 ± 0.1	190 ± 25 <sup>a</sup>	17 ± 1	190 ± 5
	$k_{cat}/K_m$	(mM <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	165 ± 35	660 ± 145	8980 ± 2350 <sup>a</sup>	1310 ± 215	12800 ± 1740
11- <i>cis</i> -retinal	$K_m$	(μM)	15 ± 3	16 ± 4	21 ± 3	26 ± 7	28 ± 3
	$k_{cat}$	(min <sup>-1</sup> )	0.31 ± 0.02	3.4 ± 0.1	18 ± 2	7.4 ± 0.5	34 ± 1
	$k_{cat}/K_m$	(mM <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	21 ± 4	215 ± 55	860 ± 155	285 ± 80	1215 ± 135
13- <i>cis</i> -retinal	$K_m$	(μM)	NA	NA	25 ± 6	ND	ND
	$k_{cat}$	(min <sup>-1</sup> )			11 ± 1		
	$k_{cat}/K_m$	(mM <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )			440 ± 115		

<sup>a</sup> Data taken from [28].

showed that the *cis* bond of 11-*cis*-retinoids is facing residues 57 and 141, indicating that they could have a key role in the interaction with 11-*cis*-retinoids. To check this possibility, 11-*cis*-retinal was docked to the human ADH4 M141L crystallographic structure (Figs 2E,F). The M141L substitution widens the middle part of the hydrophobic tunnel. As a result, the reactive group of 11-*cis*-retinal was found best oriented, and placed at a productive distance from the catalytic Zn.

To examine the influence of residue 141 on the kinetics of ADH4 with retinoids, the human ADH4 M141L mutant

was prepared, purified to homogeneity and characterized. The kinetic constants toward ethanol and hexanol (Table 4) were comparable to those previously reported for this mutant [37]. Thus, it showed half of the catalytic efficiency of the wild-type enzyme, while the  $K_m$  values did not change. Kinetic constants toward different retinoid isomers were also determined (Table 4). ADH4 M141L showed high catalytic efficiency toward all-*trans*- and 9-*cis*-retinoids and, in contrast to ADH4, it had similar catalytic efficiencies toward 11-*cis*-retinol and 11-*cis*-retinal. Thus, while ADH4 showed a strong preference for 11-*cis*-retinol oxidation over



**Fig. 1. Docking of retinol and retinal isomers to human ADH4.** Schematic representation of human ADH4 bound to different isomers of retinol [(A) all-*trans*-; (C) 9-*cis*-; (E) 11-*cis*-] and retinal [(B) all-*trans*-; (D) 9-*cis*-; (F) 11-*cis*-] is shown with the simultaneous binding of NAD<sup>+</sup> for docked retinol, or NADH for retinal. Dashed lines represent atomic distances (in Å) from the oxygen atom of the retinoid functional group to the catalytic Zn and to the C4 of the coenzyme.

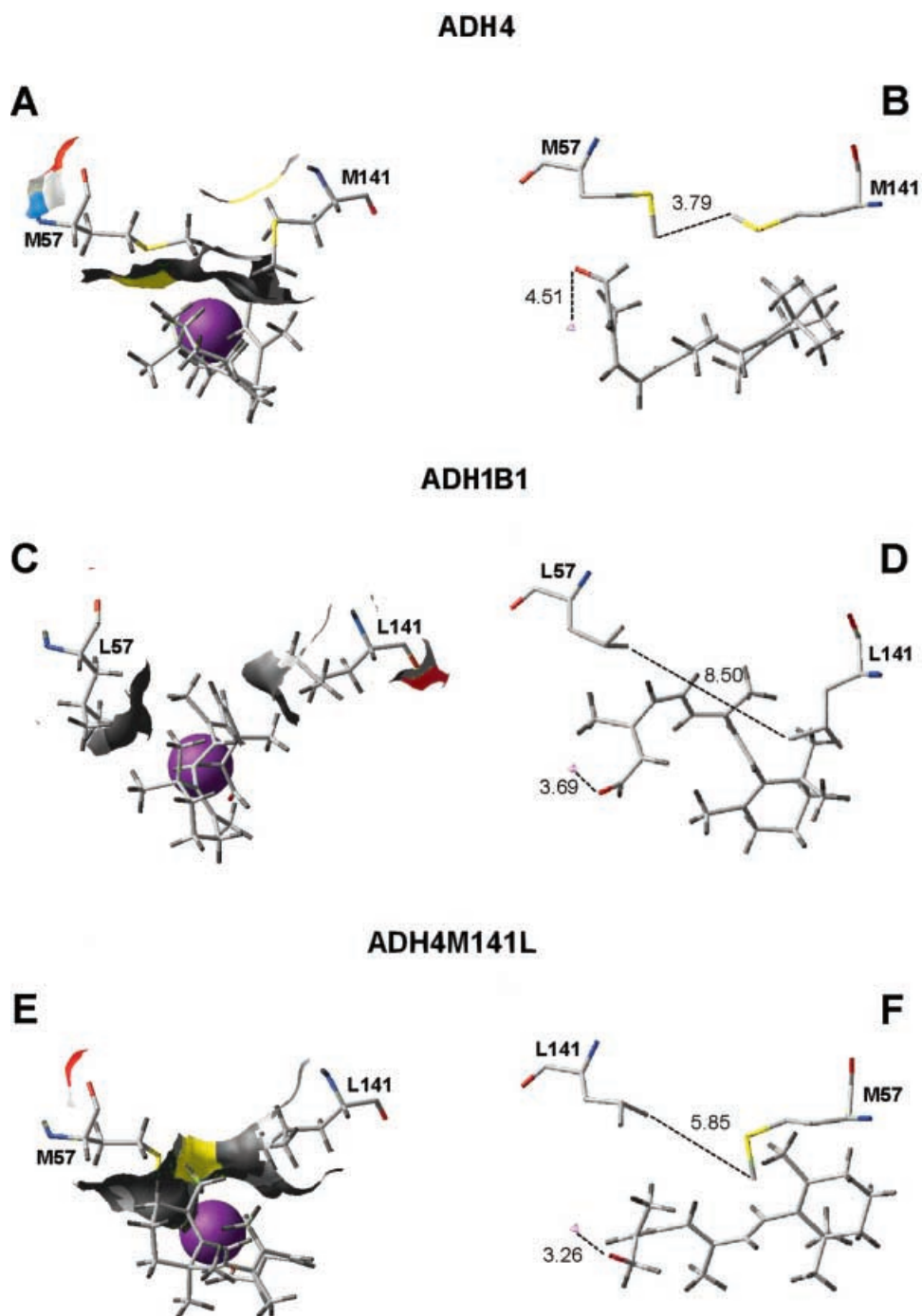
11-*cis*-retinal reduction, this was not observed in ADH1 enzymes or in the ADH4 M141L mutant. The middle region of the substrate-binding pocket (namely position 141) is therefore essential to define the higher specificity of ADH4 for the oxidation direction, in the interconversion of 11-*cis*-retinoids.

#### Localization of ADH4 in retina

ADH4 has been immunolocalized in rat eye sections, using mouse-ADH4 polyclonal antibodies. The enzyme was detected in the RPE and it was widely distributed in the inner layers of the retina (Fig. 3). ADH4 was present in the outer nuclear, inner nuclear, inner plexiform and ganglion cell layers. The signal was absent in the choroid and outer plexiform layer, and in the outer and inner segments of the photoreceptor cells.

#### Discussion

We have here presented a complete kinetic characterization of recombinant human and mouse ADH1 and ADH4 with retinoids. From these results and previous reports on the human [28,43] and rat [31,42] enzymes, it can be concluded that in mammals ADH4 uses retinoids more efficiently than ADH1. In contrast, activity with ethanol is lower for ADH4. The remarkable difference in  $K_m$  values for ethanol showed by rodent ADH4 (approximately 2 M) ([31] and this work) and human ADH4 (40 mM) [44], has been related to a single residue exchange (Val294 in human vs. Ala294 in the rat and mouse ADH4), which makes the active site wider in the rodent ADH4, resulting in a decreased affinity toward ethanol [31]. This substitution has apparently not affected the activity with retinoids, because human and rat ADH4 [31,42], and now also the mouse enzyme, show high



**Fig. 2.** Docking of 11-*cis*-retinal to human ADH4, ADH1B1 and ADH4 M141L. (A), (C) and (E), representation of 11-*cis*-retinal in the substrate-binding pocket of ADH4, ADH1B1 and ADH4 M141L, respectively, viewed from the outer part to the inner part of the hydrophobic tunnel, where the catalytic Zn atom is found (shown as van der Waals radius sphere). Residues 57 and 141 are visualized with their accessible surface. The wideness of the hydrophobic tunnel, measured as the atomic distance between the two residues is high for ADH1B1 (C), low for ADH4 (A) and intermediate for the mutant (E). (B), (D) and (F), schematic representation of an almost lateral view of the substrate-binding pocket with 11-*cis*-retinal docked to human ADH4, ADH1B1 and ADH4 M141L, respectively, showing the atomic distances (in Å) from the Zn atom to the oxygen of the substrate, and between residues 57 and 141.

catalytic efficiencies with these substrates, which supports a physiological role more related to the redox transformations of large substrates, like retinoids, rather than the metabolism of short-chain alcohols.

The involvement of ADH4 in specific retinoid metabolism is supported by the kinetic studies (present work and [28,43,45,46]), by its presence in several epithelial cells that require retinoic acid for differentiation [47], by its

**Table 4. Kinetic constants of human ADH4 M141L.** Activities were determined in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.5, using 2.4 mM NAD<sup>+</sup> for alcohol oxidation or 0.77 mM NADH for aldehyde reduction, at 25 °C. 0.02% Tween-80 was present in the assay with retinoids.

Substrate	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )
Ethanol	40000 ± 4000	1105 ± 25	28 ± 3
Hexanol	48 ± 7	440 ± 10	9145 ± 1355
all- <i>trans</i> -retinol	9 ± 2	20 ± 2	2220 ± 540
9- <i>cis</i> -retinol	29 ± 3	100 ± 5	3450 ± 395
11- <i>cis</i> -retinol	24 ± 4	40 ± 2	1670 ± 290
all- <i>trans</i> -retinal	17 ± 3	31 ± 2	1825 ± 345
9- <i>cis</i> -retinal	22 ± 3	45 ± 1	2045 ± 280
11- <i>cis</i> -retinal	8 ± 1	18 ± 1	2250 ± 310
13- <i>cis</i> -retinal	27 ± 7	7.1 ± 0.7	265 ± 75

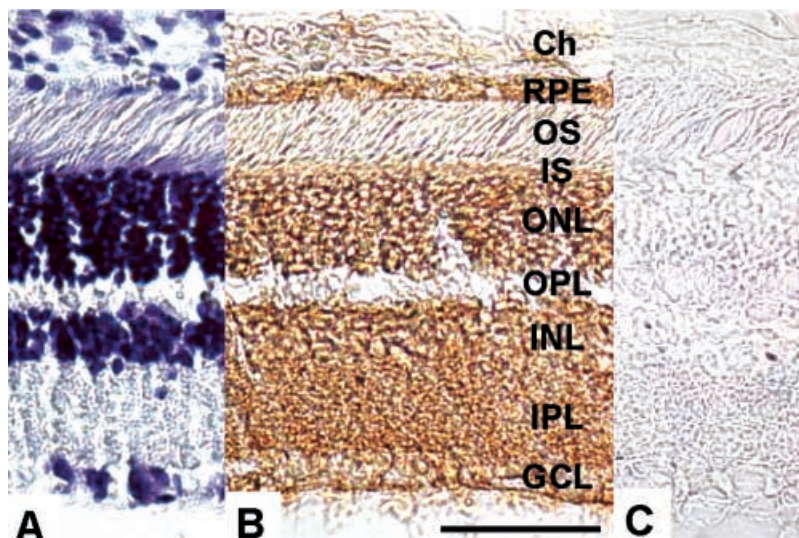
colocalization with retinoic acid during development [11,12] and by the decrease of retinoic acid production in the ADH4 knockout mice [8]. Nevertheless, although ADH4 is usually more efficient, the activity of ADH1 with retinoids should not be neglected, particularly for human ADH1B2 and mouse ADH1. This is consistent with a role of ADH1 in the clearance of retinoid excess as proposed from knockout studies in mouse [48].

Activity of ADH with 11-*cis*-retinoids had not been reported before. ADH1 and ADH4 reversibly transform 11-*cis*-retinol to 11-*cis*-retinal with high efficiency. This is a relevant result because it provides the possibility for ADH of being involved in the photopigment regeneration. In this regard emphasis will be put on ADH4 in the present discussion, because this is the major ADH form in the mammalian eye tissues [25]. ADH4 efficiently uses 11-*cis*-retinol, but it shows a comparatively poor reductase activity with 11-*cis*-retinal. The enzyme exhibits an 8-fold higher catalytic efficiency for 11-*cis*-retinol oxidation than for 11-*cis*-retinal reduction while it shows only about 1.5 times more activity for retinol oxidation with other isomers, and ADH1 catalytic efficiency is similar in the two directions with all retinoids tested. In fact, ADH4 is the only reported

case among mammalian ADHs, and with any alcohol/aldehyde pair, in which a strong preference for the oxidation reaction is observed at physiological pH. Two factors can contribute to this specificity of ADH4: the structure of 11-*cis*-retinal and the distinct ADH4 substrate-binding pocket. 11-*cis*-retinal is unique among retinal isomers in that it shows a helical geometry in the region C11 to C13 which might, in part, be responsible for its fast photoisomerization, thus explaining its selection as the chromophore of the visual pigments [49,50]. This special conformation is not a limiting feature for the binding to ADH1, with a wide hydrophobic tunnel in the active site, but 11-*cis*-retinal cannot interact with ADH4 in a highly productive manner. Docking studies show that the 11-*cis* position is placed between the residues 57 and 141 of the pocket. In ADH4 these two residues are Met, defining a narrow region in comparison to ADH1, where these two residues are Leu. The substitution of Met141 by a Leu, results in a wider substrate-binding pocket, which allows proper binding of 11-*cis*-retinal, as kinetic and docking studies with ADH4 M141L have demonstrated. Thus, the region defined by position 141 is essential for conferring the specificity of 11-*cis*-retinol oxidation over 11-*cis*-retinal reduction in ADH4. This specificity provides additional support for the involvement of ADH4 in the physiological 11-*cis*-retinol oxidation in the eye.

In the RPE an isomerohydrolase catalyzes the formation of 11-*cis*-retinol from all-*trans*-retinyl ester [51]. An 11-*cis*-retinol dehydrogenase (RDH5) is then believed to be essential in the production of 11-*cis*-retinal, as mutations in its gene are associated with the eye disorder fundus albipunctatus [18,52,53], while knockout mice for this gene accumulate 11-*cis*-retinyl esters in the eye [54,55]. However, the knockout animals have normal vision indicating that other enzymes must exist in the RPE, capable of oxidizing 11-*cis*-retinol, and thus completing the visual cycle. We have localized ADH4 protein in the RPE by immunohistochemistry, consistent with the ADH4 activity previously found in this epithelium [25]. Thus, the presence in the RPE, the high activity with 11-*cis*-retinol, and the specificity for the oxidation direction of the reaction, suggest a participation of ADH4 in the rhodopsin regeneration pathway. With

**Fig. 3. Localization of ADH4 in rat retina by immunohistochemistry.** (A) Retina section stained with hematoxylin. (B) Immunolocalization of ADH4 in retina. ADH4 is detected in the retinal pigment epithelium (RPE) and it is extensively distributed in the retina. ADH4 is found in the outer (ONL) and the inner (INL) nuclear layers, in the inner plexiform layer (IPL) and in the ganglion cell layer (GCL), but it is not detected in the choroid (Ch), in the outer plexiform layer (OPL) and in the photoreceptor outer (OS) and inner (IS) segments. (C) No signal is found when sections are incubated with the biotinylated rabbit IgG antibody without preincubation with the ADH4 antibody. Calibration bar (50  $\mu\text{m}$ ) shown in (B) applies to all panels.



respect to the relative contribution of each enzyme, the microsomal RDH5 seems to play a major role because of its low  $K_m$  (2.5–7.5  $\mu\text{M}$  [56]) and its capacity of using 11-*cis*-retinol bound to cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) [56,57]. Comparatively, the cytosolic ADH4 shows a higher  $K_m$  (28  $\mu\text{M}$ ) and uses less efficiently the retinoid bound to CRALBP [57]. However, this could be in part compensated by a 40-fold higher  $k_{\text{cat}}$  for ADH4 (200  $\text{min}^{-1}$  vs. 5  $\text{min}^{-1}$  for RDH5 [56]). Preliminary results on both, ADH4 knockout mice and ADH4/RDH5 double knockout mice, indicate mild effects on vision, suggesting the existence of several enzymes with a redundant function [58].

ADH4 may also be involved in other retinoid metabolism steps in RPE. Thus, acting as an all-*trans*-retinol dehydrogenase, it could provide the all-*trans*-retinal to the retinal G protein-coupled receptor opsin, an isomerase which can convert all-*trans*-retinal to the *cis* isomer by photoisomerization [59].

Retinoic acid is important in the function of neural retina. It has been related to eye development [21] and it has been proposed to act as a neuromodulator [23]. The localization of ADH4 in almost all parts of the neural retina, together with the presence of receptors and other proteins related to retinoic acid [21,60,61], indicate a complex retinoid metabolism and signaling in retina, with the probable participation of ADH4 in mammals. Moreover, as RDH5 is not present in neural retina [53], ADH4 could contribute to the 11-*cis*-retinol dehydrogenase activity responsible for the regeneration of cone photopigments, in addition to a specific microsomal enzyme [19], and finally, ADH4 may be involved in providing 11-*cis*-retinal to the photopigments of the photosensitive retinal ganglion cells that set the circadian clock [20].

In conclusion, human and rodent ADH1 and ADH4 show a wide specificity toward retinoids, using efficiently the all-*trans* and most of the *cis* isomers of retinol and retinal, including the 11-*cis*-retinoids involved in photosensitivity. Kinetic properties and its localization in many retinal cell layers support the involvement of ADH4 in the retinol oxidation reactions of retina as a cytosolic activity, complementary to the more specific and membrane-bound SDR enzymes.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish Dirección General de Investigación (BMC2002-02659, BMC2003-09606 and SAF2001-3288), Generalitat de Catalunya (2001SGR 00198) and National Institutes of Health (EY13969).

## References

- Blomhoff, R. (1994) Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr. Rev.* **52**, S13–S23.
- Clagett-Dame, M. & DeLuca, H.F. (2002) The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Ann. Rev. Nutr.* **22**, 347–381.
- Allenby, G., Bocqel, M.-T., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Resenberger, M., Lovey, A., Kastner, P., Grippo, J.F., Chambon, P. & Levin, A.A. (1993) Retinoic acid receptors and retinoid-

- receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 30–34.
- Chambon, P. (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**, 940–954.
- Duester, G. (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function. Production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4315–4324.
- Eklund, H. & Brändén, C.-I. (1987) Alcohol dehydrogenase. In *Biological Macromolecules and Assemblies* (Jurnak, F.A. & McPherson, A., eds), Vol. 3, pp. 73–142. John Wiley & Sons Inc, London.
- Szalai, G., Duester, G., Friedman, R., Jia, H., Lin, S., Roe, B.A. & Felder, M.R. (2002) Organization of six functional mouse alcohol dehydrogenase genes on two overlapping bacterial artificial chromosomes. *Eur. J. Biochem.* **269**, 224–232.
- Molotov, A., Deltour, L., Foglio, M.H., Cuenca, A.E. & Duester, G. (2002) Retinol/ethanol drug interaction during acute alcohol intoxication in mice involves inhibition of retinol metabolism to retinoic acid by alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **277**, 13804–13811.
- Höög, J.-O., Hedberg, J.J., Strömberg, P. & Svensson, S. (2001) Mammalian alcohol dehydrogenase – functional and structural implications. *J. Biomed. Sci.* **8**, 71–76.
- Molotov, A., Fan, X., Deltour, L., Foglio, M.H., Martras, S., Farrés, J., Parés, X. & Duester, G. (2002) Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase *Adh3*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 5337–5342.
- Ang, H.L., Deltour, L., Hayamizu, T.F., Zgombic-Knight, M. & Duester, G. (1996) Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. *J. Biol. Chem.* **271**, 9526–9536.
- Haselbeck, R.J. & Duester, G. (1997) Regional restriction of alcohol/retinol dehydrogenases along the mouse gastrointestinal epithelium. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **21**, 1484–1490.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrián, S., González-Duarte, R., Jeffery, J. & Ghosh, D. (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**, 6003–6013.
- Napoli, J.L., Posch, K.C. & Burns, R.D. (1992) Microsomal retinal synthesis: retinol vs. holo-CRBP as substrate and evaluation of NADP, NAD and NADPH as cofactors. *Biochim. Biophys. Acta* **1120**, 183–186.
- Lapshina, E.A., Belyaeva, O.V., Chumakova, O.V. & Kedishvili, N.Y. (2003) Differential recognition of the free versus bound retinol by human microsomal retinol/sterol dehydrogenases: characterization of the holo-CRBP dehydrogenase activity of RoDH-4. *Biochemistry* **42**, 776–784.
- Ghyselinck, N.B., Bavik, C., Sapin, V., Mark, M., Bonnie, D., Hindelang, C., Dierich, A., Nilsson, C.B., Hakansson, H., Sauvants, P., Azaïs-Braesco, V., Frasson, M., Picaud, S. & Chambon, P. (1999) Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J.* **18**, 4903–4914.
- Kedishvili, N.Y., Gough, W.H., Davis, W.I., Parsons, S., Li, T.-K. & Bosron, W.F. (1998) Effect of cellular retinol-binding protein on retinol oxidation by human class IV retinol/alcohol dehydrogenase and inhibition by ethanol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 191–196.
- McBee, J.K., Palczewski, K., Baehr, W. & Pepperberg, D.R. (2001) Confronting complexity: the interlink of phototransduction and retinoid metabolism in the vertebrate retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **20**, 469–529.
- Mata, N.L., Radu, R.A., Clemmons, R.S. & Travis, G.H. (2002) Isomerization and oxidation of vitamin A in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight. *Neuron* **36**, 69–80.

20. Berson, D.M., Dunn, F.A. & Motoharu, T. (2002) Photo-transduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* **295**, 1070–1073.
21. McCaffery, P., Wagner, E., O'Neil, J., Petkovic, M. & Dräger, U.C. (1999) Dorsal and ventral retinal territories defined by retinoic acid synthesis, break-down and nuclear receptor expression. *Mech. Dev.* **82**, 119–130.
22. Bitzer, M., Feldkaemper, M. & Schaeffel, F. (2000) Visually induced changes in components of the retinoic acid system in fundal layers of the chick. *Exp. Eye Res.* **70**, 97–106.
23. Weiler, R., Pottek, M., He, S. & Vaney, D.I. (2000) Modulation of coupling between retinal horizontal cells by retinoic acid and endogenous dopamine. *Brain Res. Rev.* **32**, 121–129.
24. Julià, P., Farrés, J. & Parés, X. (1983) Purification and partial characterization of a rat retina alcohol dehydrogenase active with ethanol and retinol. *Biochem. J.* **213**, 547–550.
25. Julià, P., Farrés, J. & Parés, X. (1986) Ocular alcohol dehydrogenase in the rat: regional distribution and kinetics of the ADH-1 isoenzyme with retinol and retinal. *Exp. Eye Res.* **42**, 305–314.
26. Plapp, B.V., Mitchell, J.L. & Berst, K.B. (2001) Mouse alcohol dehydrogenase 4: kinetic mechanism, substrate specificity and simulation of effects of ethanol on retinoid metabolism. *Chemico-Biol. Interact.* **130–132**, 445–456.
27. Hedén, L.-O., Höög, J.-O., Larsson, K., Lake, M., Lagerholm, E., Holmgren, A., Vallee, B.L., Jörnvall, H. & Von Bahr-Lindström, H. (1986) cDNA clones coding for the  $\beta$ -subunit of human liver alcohol dehydrogenase have differently 3'-non-coding regions. *FEBS Lett.* **194**, 327–332.
28. Allali-Hassani, A., Peralba, J.M., Martras, S., Farrés, J. & Parés, X. (1998) Retinoids,  $\omega$ -hydroxyfatty acids and cytotoxic aldehydes as physiological substrates, and H<sub>2</sub>-receptor antagonists as pharmacological inhibitors, of human class IV alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.* **426**, 362–366.
29. Deltour, L., Haselbeck, R.J., Ang, H.L. & Duester, G. (1997) Localization of class I and class IV alcohol dehydrogenases in mouse testis and epididymis: potential retinol dehydrogenases for endogenous retinoic acid synthesis. *Biol. Reprod.* **56**, 102–109.
30. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
31. Crosas, B., Allali-Hassani, A., Martínez, S.E., Martras, S., Persson, B., Jörnvall, H., Parés, X. & Farrés, J. (2000) Molecular basis for differential substrate specificity in class IV alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **275**, 25180–25187.
32. Alvarez, R., Domínguez, B. & de Lera, A. (2001) An expedient stereocontrolled synthesis of 7-*cis*-retinoids. *Synth. Commun.* **31**, 2083–2087.
33. Hosoda, A., Taguchi, T. & Kobayashi, Y. (1987) Highly cis-selective Wittig reaction of oxido-allylic phosphorane with aldehyde. An efficient synthesis of 11-*cis*-retinoids. *Tetrahedron Lett.* **28**, 65–68.
34. Fatiadi, A.J. (1976) Active manganese dioxide oxidation in organic chemistry – part I. *Synthesis* **2**, 65–104.
35. Xie, P., Parssons, S.H., Speckhard, D.C., Bosron, W.F. & Hurley, T.D. (1997) X-ray structure of human class IV  $\sigma\sigma$  alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**, 18558–18563.
36. Hurley, T.D., Bosron, W.F., Hamilton, J.A. & Amzel, L.M. (1991) Structure of human  $\beta_1\beta_1$  alcohol dehydrogenase: catalytic effects of non-active-site substitutions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 8149–8153.
37. Xie, P.T. & Hurley, T.D. (1999) Methionine-141 directly influences the binding of 4-methylpyrazole in human  $\sigma\sigma$  alcohol dehydrogenase. *Protein Sci.* **8**, 2639–2644.
38. Vaglenova, J., Martínez, S.E., Porté, S., Duester, G., Farrés, J. & Parés, X. (2003) Expression, localization and potential physiological significance of alcohol dehydrogenase in the gastrointestinal tract. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2652–2662.
39. Wagner, F.W., Burger, A.R. & Vallee, B.L. (1983) Kinetic properties of human liver alcohol dehydrogenase: oxidation of alcohols by class I isoenzymes. *Biochemistry* **22**, 1857–1863.
40. Yin, S.-J., Bosron, W.F., Magnes, L.J. & Li, T.-K. (1984) Human liver alcohol dehydrogenase: purification and kinetic characterization of the  $\beta_2\beta_2$ ,  $\beta_2\beta_1$ ,  $\alpha\beta_2$ , and  $\beta_2\gamma_1$  'oriental isoenzymes'. *Biochemistry* **23**, 5847–5853.
41. Algar, E.M., Seeley, T.-L. & Holmes, R.S. (1983) Purification and molecular properties of mouse alcohol dehydrogenase isozymes. *Eur. J. Biochem.* **137**, 139–147.
42. Boleda, M.D., Saubi, N., Farrés, J. & Parés, X. (1993) Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation,  $\omega$ -hydroxyfatty acids, and retinoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 85–90.
43. Yang, Z.-N., Davis, G.J., Hurley, T.D., Stone, C.L., Li, T.-K. & Bosron, W.F. (1994) Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **18**, 587–591.
44. Moreno, A. & Parés, X. (1991) Purification and characterization of a new alcohol dehydrogenase from human stomach. *J. Biol. Chem.* **266**, 1128–1133.
45. Han, C.L., Liao, C.S., Wu, C.W., Hwang, C.L., Lee, A.R. & Yin, S.J. (1998) Contribution to first-pass metabolism of ethanol and inhibition by ethanol for retinol oxidation in human alcohol dehydrogenase family. *Eur. J. Biochem.* **254**, 25–31.
46. Yin, S.-J., Chou, C.-F., Lai, C.-L., Lee, S.-L. & Han, C.-L. (2003) Human class IV alcohol dehydrogenase: kinetic mechanism, functional roles and medical relevance. *Chem. Biol. Interact.* **143–144**, 219–227.
47. Ang, H.L., Deltour, L., Zgombic-Knight, M., Wagner, M.A. & Duester, G. (1996) Expression patterns of class I and class IV alcohol dehydrogenase genes in developing epithelia suggest a role for alcohol dehydrogenase in local retinoic acid synthesis. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **20**, 1050–1064.
48. Molotkov, A., Fan, X. & Duester, G. (2002) Excessive vitamin A toxicity in mice genetically deficient in either alcohol dehydrogenase Adh1 or Adh3. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2607–2612.
49. Bifone, A., de Groot, H.J.M. & Buda, F. (1996) Ab initio molecular dynamics of retinals. *Chem. Phys. Lett.* **248**, 165–172.
50. Buss, V., Weingart, O. & Sugihara, M. (2000) Fast photoisomerization of a rhodopsin model – an ab initio molecular dynamics study. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 2784–2786.
51. Deigner, P.S., Law, W.C., Canada, F.J. & Rando, R.R. (1989) Membranes as the energy source in the endergonic transformation of vitamin A to 11-*cis*-retinol. *Science* **244**, 968–971.
52. Yamamoto, H., Simon, A., Eriksson, U., Harris, E., Berson, E.L. & Dryja, T.P. (1999) Mutations in the gene encoding 11-*cis* retinol dehydrogenase cause delayed dark adaptation and fundus albipunctatus. *Nature Genet.* **22**, 188–191.
53. Cideciyan, A.V., Haeseleer, F., Fariss, R.N., Aleman, T.S., Jang, G.F., Verlinde, C.L., Marmor, M.F., Jacobson, S.G. & Palczewski, K. (2000) Rod and cone visual cycle consequences of a null mutation in the 11-*cis*-retinol dehydrogenase gene in man. *Vis. Neurosci.* **17**, 667–678.
54. Driessen, C.A.G.G., Winkens, H.J., Hoffmann, K., Kuhlmann, L.D., Janssen, B.P.M., van Vugt, A.H.M., van Hooser, J.P., Wieringa, B.E., Deutman, A.F., Palczewski, K., Ruether, K. & Janssen, J.J.M. (2000) Disruption of the 11-*cis*-retinol dehydrogenase gene leads to accumulation of *cis*-retinols and *cis*-retinyl esters. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4275–4287.

55. Shang, E., Lai, K., Packer, A.I., Paik, J., Blaner, W.S., Vieira, M.M., Gouras, P. & Wolgemuth, D.J. (2002) Targeted disruption of the mouse *cis*-retinol dehydrogenase gene: visual and nonvisual functions. *J. Lipid. Res.* **43**, 590–597.
56. Golovleva, I., Bhattacharya, S., Wu, Z., Shaw, N., Yang, Y., Andrabi, K., West, K.A., Burstedt, M.S., Forsman, K., Holmgren, G., Sandgren, O., Noy, N., Qin, J. & Crabb, J.W. (2003) Disease-causing mutations in the cellular retinaldehyde binding protein tighten and abolish ligand interactions. *J. Biol. Chem.* **278**, 12397–12402.
57. Saari, J.C. & Bredberg, D.L. (1982) Enzymatic reduction of 11-*cis*-retinal bound to cellular retinal-binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* **716**, 266–272.
58. Donmoyer, C.M., Lai, K., Kong, J., Duester, G., Molotkov, A., Blaner, W.S. & Gouras, P. (2002) Impairment of dark adaptation in *ADH4*<sup>-/-</sup> *RDH5*<sup>-/-</sup> double knockout mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, E-Abstract 3681.
59. Chen, P., Lee, T.D. & Fong, H.K.W. (2001) Interaction of 11-*cis*-retinol dehydrogenase with the chromophore of retinal G protein-coupled receptor opsin. *J. Biol. Chem.* **276**, 21098–21104.
60. De Leeuw, A.M., Gaur, V.P., Saari, J.C. & Milam, A.H. (1990) Immunolocalization of cellular retinol-, retinaldehyde- and retinoic acid-binding proteins in rat retina during pre- and post-natal development. *J. Neurocytol.* **19**, 253–264.
61. Milam, A.H., Possin, D.E., Huang, J., Fariss, R.N., Flannery, J.G. & Saari, J.C. (1997) Characterization of aldehyde dehydrogenase-positive amacrine cells restricted in distribution to the dorsal retina. *Vis. Neurosci.* **14**, 601–608.

### Supplementary material

The following material is available from <http://blackwellpublishing.com/products/journals/suppmat/EJB/EJB4058/EJB4058sm.htm>

**Fig. S1.** Absorbance spectra of 11-*cis*-retinal (A) and all-*trans*-retinal (B) dissolved in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.0, 0.02% Tween-80, at 25 °C.



## ARTICLE II

*Contribució de S. Martras en aquest treball:*

- Obtenció i clonatge del cDNA de totes les ADHs estudiades (ADHs humanes ADH1B1, ADH1B2, i ADH4) en el vector d'expressió pGEX-4T-2.
- Expressió i purificació de totes les ADHs estudiades.
- Obtenció de retinols a partir dels corresponents retinals per reducció amb borhidrur de sodi.
- Determinació de les constants cinètiques de les ADHs amb retinoides.
- Estudi de l'estabilitat dels retinoides en solució aquosa en presència de Tween 80.
- Redacció de la primera versió de l'article.

## Kinetics of human alcohol dehydrogenase with ring-oxidized retinoids: effect of Tween 80

Sílvia Martras<sup>a</sup>, Rosana Álvarez<sup>b</sup>, Oriol Gallego<sup>a</sup>, Marta Domínguez<sup>b</sup>, Ángel R. de Lera<sup>b</sup>,  
Jaume Farrés<sup>a</sup>, Xavier Parés<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Department of Organic Chemistry, Universidad de Vigo, E-36200 Vigo, Pontevedra, Spain

Received 6 May 2004, and in revised form 1 July 2004

Available online 24 August 2004

### Abstract

Human alcohol dehydrogenases (ADH1 and ADH4) actively use retinoids oxidized at the cyclohexenyl ring (4-oxo-, 4-hydroxy-, and 3,4-didehydro-retinoids), which are functional compounds in several cells and tissues (i.e., in human skin). Remarkably, activities with 4-oxo-retinal and 4-hydroxy-retinol ( $k_{\text{cat}} = 2050 \text{ min}^{-1}$  for ADH4) are the highest among retinoids, similar to those of the best aliphatic alcohols. Thus, ADH1 and ADH4 provide a metabolic pathway for the synthesis of the corresponding retinoic acids. Tween 80, a widely used detergent in the retinoid activity assay, behaves as a competitive inhibitor. The  $K_m$  values for all-*trans*-retinol (2–3  $\mu\text{M}$ ), estimated in the absence of detergent, are 10-fold lower than those obtained at the usual 0.02% Tween 80. This suggests a contribution of ADH to retinoid metabolism more relevant than previously expected. However, Tween 80 stabilizes retinoids in water solution and provides a reliable and reproducible assay, suitable for comparing different ADHs and different retinoid substrates.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Alcohol dehydrogenase; Retinol dehydrogenase; Retinoids; 4-Oxo-retinal; 4-Hydroxy-retinol; 3,4-Didehydroretinol; Tween 80; Non-ionic detergent

The alcohol dehydrogenase (ADH) enzymes of the medium-chain dehydrogenase/reductase (MDR) superfamily participate in the reversible oxidation of many alcohols to the corresponding aldehydes or ketones. In mammals, the ADH family is a complex enzymatic system, with several molecular forms that constitute five classes (ADH1–ADH5) of dimeric and cytosolic NAD<sup>+</sup>-dependent enzymes [1]. Relevant substrates of ADH are retinoids [2,3], which are essential compounds in several physiological processes such as vision, development, growth, and cellular maintenance. ADH1 and ADH4 [2,3], and to a lesser extent ADH2 [4] and ADH3 [5], are active with retinoids. Knockout studies

in mice support the involvement of ADH in retinol detoxification and retinoic acid formation in vivo [6].

The kinetics of all-*trans*- and 9-*cis*-retinols and retinals with different human and rat ADHs has been well studied [2,3,7,8] because these compounds are the major precursors of retinoic acids that bind to nuclear receptors. Recently, the ADH kinetics with 11-*cis*-retinoids, involved in the visual cycle, has also been reported [9].

Besides the oxidation/reduction at the functional group, retinoids undergo a variety of reactions including the oxidation at the C4 position of the cyclohexenyl ring [10]. Although in some instances this represents a degradation pathway, in other cases the resulting 4-hydroxy- and 4-oxo-retinoids are bioactive compounds. Thus, not only the corresponding retinoic acids but also all-*trans*-4-oxo-retinol and all-*trans*-4-oxo-retinal (Fig. 1) can interact with nuclear receptors (RAR) [11–14]. It has

\* Corresponding author. Fax: +34-93-5811264.

E-mail addresses: [jaume.farres@uab.es](mailto:jaume.farres@uab.es) (J. Farrés), [xavier.pares@uab.es](mailto:xavier.pares@uab.es) (X. Parés).

been shown that 4-oxo-retinoids are the predominant active retinoids during early *Xenopus* development and in murine embryonic stem cells [12,15], and that they can induce growth arrest and differentiation of several cancer cell lines [11,16,17]. Various cytochrome P450 isoforms can oxidize the cyclohexenyl ring, using retinol [15,18] or retinoic acid [19], but enzymes associated with the metabolism of the ring-oxidized retinols to the corresponding retinoic acids have not been identified.

Another ring-oxidized retinol of interest is 3,4-didehydroretinol or vitamin A<sub>2</sub> (Fig. 1). The 3,4-didehydroretinoids have been detected in all vertebrate classes, where they can play a variety of functions: regulation of development and differentiation through the binding to RAR receptors [20,21], photosensitivity [22,23], and photoprotection [24]. Great amounts of 3,4-didehydroretinoids are found in several fishes and mammalian species [25], while they are characteristic molecules of the human skin [26]. The 3,4-didehydroretinoids appear to be powerful bioactive molecules but information regarding their metabolic processing is scarce.

The kinetic studies of ADH with retinoids need the use of a solubilizing agent for these hydrophobic compounds. Tween 80, a non-ionic detergent, was used early in the ADH activity assay [27]. The procedure using 0.02% Tween 80 was later well established by our group

[2,8,9,28–30] and adopted by other groups [7,31–34]. It was noticed, however, that Tween 80 causes some inhibition to the ADH activity with retinoids [27,29] but not with ethanol [27,28,34] or with acetaldehyde [27].

The aim of the present work has been the study of the activity of human ADH1 (isozymes ADH1B1 and ADH1B2) and ADH4 with 4-oxo-, 4-hydroxy-, and 3,4-didehydroretinoids, which would provide support for a participation of ADH in the *in vivo* transformations of these compounds and would add insight into the ADH substrate specificity. An additional objective has been to analyse the strong influence of Tween 80 on the kinetic constants of ADH with retinoids. Finally, we have demonstrated that a main reason to employ Tween 80 in the enzymatic assay is to stabilize the retinoids, which are highly unstable molecules in water solution.

## Materials and methods

### Preparation of full-length cDNAs for human ADHs

The human ADH1B1 and ADH4 cDNAs, cloned in the vectors pT4 [35] and pET-5a [8], respectively, were amplified by PCR with two primers containing a restriction site for *Bam*HI or *Eco*RI at the 5'-ends. Double digestion with both enzymes allowed the cDNA cloning in the expression vector pGEX-4T-2 (Amersham-Pharmacia Biotech), as described previously [9]. To obtain human ADH1B2, human ADH1B1 cloned in the vector pGEX-4T-2 was used as a template to introduce the single mutation R47H by PCR, based on the Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit method (Stratagene), and using two specific primers (5'-GAATCTGTCACAGATGACCACGTGG-3', amino acid positions 44–52, and 5'-GTCATCTGTGTGACAGATTCTACAGCC-3', amino acid positions 42–50).

### Expression and purification of ADH proteins

*Escherichia coli* BL21 cells were transformed with the vector pGEX-4T-2 containing human ADH1B1, ADH1B2 or ADH4 cDNA. Cells were grown in 2L of 2× YT medium until saturation was reached, at 25°C, prior to zinc sulphate (10 μM) addition and induction with 0.1 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (Roche Molecular Biochemicals), at 22°C, for 15 h. Cells were centrifuged at 2800g and 4°C for 15 min, and pellets were frozen at –80°C to enhance cell lysis. The vector pGEX-4T-2 allowed the ADH expression as a fusion protein with glutathione-S-transferase (GST). This ADH–GST protein construct was purified as described previously [9], using the affinity resin glutathione-Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia Biotech). After incubation with the resin, and washing with 100 mM Tris/HCl, pH 7.0, 2.5 mM dithiothreitol (Sigma), 10%

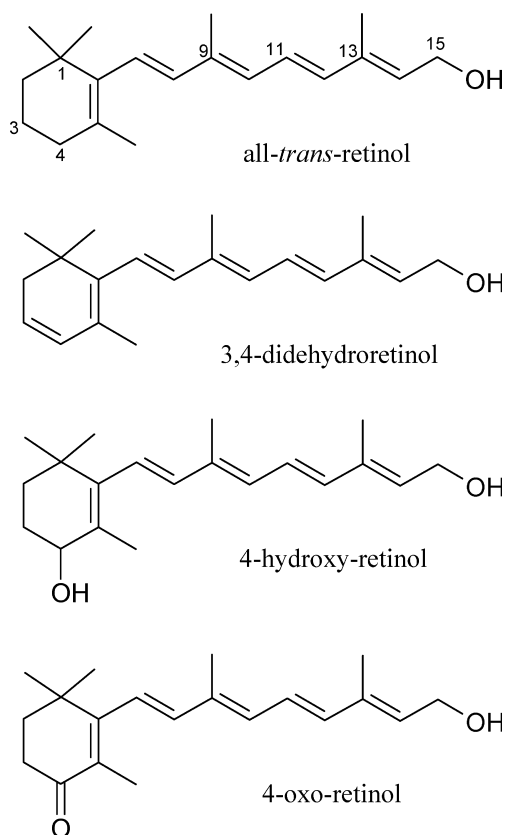


Fig. 1. Structure of *all-trans*-retinol and ring-oxidized derivatives.

glycerol, 0.2 M sodium chloride, and 10  $\mu$ M zinc sulphate, the elution of the ADH was performed by thrombin digestion (10 U/mg protein, Amersham–Pharmacia Biotech) in the same buffer, for 15 h at room temperature. Electrophoresis on SDS–polyacrylamide gel, followed by the Coomassie Brilliant Blue (Sigma) stain technique, was used to check protein homogeneity.

### Enzyme kinetics

Standard activities with ethanol of purified human ADH1B1, ADH1B2, and ADH4 were determined as described previously [9]. 4-Oxo-retinal and 3,4-didehydroretinal were synthesized as described elsewhere [46]. 4-Hydroxy-retinol and 3,4-didehydroretinol were obtained by reduction with sodium borohydride [8] of 4-oxo-retinal and 3,4-didehydroretinal, respectively. Molar absorption coefficients in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.5, 0.02% Tween 80, used to calculate retinoid concentration were:  $\epsilon_{328} = 39,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for all-*trans*-retinol (Sigma),  $\epsilon_{329} = 28,512 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for 4-hydroxy-retinol,  $\epsilon_{356} = 29,210 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for 3,4-didehydroretinol,  $\epsilon_{400} = 29,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for all-*trans*-retinal (Sigma),  $\epsilon_{400} = 37,874 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for 4-oxo-retinal, and  $\epsilon_{450} = 12,534 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for 3,4-didehydroretinal. Since molar absorption coefficients for 4-hydroxy-retinal in any organic solvent were not found in the literature, we estimated a value in methanol of  $\epsilon_{384} = 42,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , which served to calculate a  $\epsilon_{400} = 28,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  in the assay buffer. Retinoid solutions were prepared as described [9,29]. Briefly, 3 mg of retinoid was dissolved in 250  $\mu$ l acetone and 175  $\mu$ l of the acetone solution was mixed with 25 ml of 0.1 M sodium phosphate, pH 7.5, 0.02 % Tween 80, at 4 °C and under dim red light.

Retinoid activities were determined by measuring the change in absorbance at 400 nm (450 nm for 3,4-didehydroretinal), using a Varian Cary 400 spectrophotometer, at 25 °C. One unit (U) of ADH activity is defined as the amount of enzyme required to transform 1  $\mu$ mol of substrate or cofactor per minute at 25 °C. Retinol oxidation activities were determined with 2.4 mM  $\text{NAD}^+$  (Sigma), in 1-cm pathlength cuvettes. Retinal reduction activities were measured with 1 mM NADH (Sigma) (0.77 mM NADH for ADH4) in 0.2-cm pathlength cuvettes. Retinoid concentration ranged from  $0.1 \times K_m$  to  $10 \times K_m$ . Kinetic constants were calculated using the GraFit 5.0 program (Erithacus Software Limited), and the results were expressed as means  $\pm$  SEM of at least three independent determinations.  $k_{\text{cat}}$  values were calculated using a molecular weight of 80,000 for ADH dimer.

### Control of the stability of retinoids in aqueous solutions

All-*trans*-retinol solutions in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.5, with or without 0.02% Tween 80, were

prepared at an approximate concentration of 300  $\mu$ M as described above. The stability of the retinol was checked spectrophotometrically and by HPLC. The retinol solutions were analysed by determining the absorption spectra between 220 and 550 nm, at different times (5, 30, and 90 min) after the solutions were prepared. In addition, at the different times, 5-ml aliquots were extracted twice with 1 ml hexane, evaporated in a nitrogen stream, and dissolved in 100  $\mu$ l ethanol. HPLC analysis was performed by injecting 25  $\mu$ l of the ethanolic solution in a LiChrosorb 5  $\mu$ m RP-C18 reverse-phase column (4.6  $\times$  250 mm, Phase Separations), using acetonitrile: 1% (w/v) ammonium acetate, pH 7.0, 70:30 (v/v) as a mobile phase, at 1 ml/min flow rate. Retinoids were detected by measuring absorbance at 325 nm.

## Results

### Activity of ADH toward ring-oxidized derivatives of retinoids

The kinetics of human ADH1B1, ADH1B2, and ADH4 were analysed with 4-hydroxy-retinol and 4-oxo-retinal (Table 1). These substrates showed the highest rate, with any ADH, among all the retinoids previously tested [7–9]. When compared with the parent compounds all-*trans*-retinol and all-*trans*-retinal, the  $k_{\text{cat}}$  values for the ring-oxidized retinoids show a 3- to 40-fold increase, depending on the enzyme and substrate analysed (Table 1). The  $K_m$  behaviour was more uneven, but the resulting  $k_{\text{cat}}/K_m$  value was always much higher for the oxidized compound, showing a 4- to 60-fold increase. Similar to that previously observed with other retinoid compounds [9], ADH4 was more active than ADH1 also with 4-hydroxy-retinol and 4-oxo-retinal.

Human ADH1B2 and ADH4 are active with 3,4-didehydroretinol and 3,4-didehydroretinal (Table 1). The catalytic constants are comparable to those obtained with all-*trans*-retinol and all-*trans*-retinal. ADH4 showed the highest activity, especially with 3,4-didehydroretinol.

### Effect of Tween 80

Tween 80 is the most used detergent to solubilize retinoids for ADH activity assays. To study how Tween 80 affects the all-*trans*-retinol oxidation catalysed by ADH4, kinetic constants were determined at different concentrations of the detergent. At 0.02%, the usual concentration for the retinoid kinetic studies [2,7,8,29,32], the values of  $K_m$  (23  $\mu$ M) and  $k_{\text{cat}}$  (54  $\text{min}^{-1}$ ) (Table 2) are comparable to previous results [8]. At lower Tween 80 concentrations, the  $K_m$  value decreased (4.0  $\mu$ M at 0.001% Tween 80), while at higher detergent

Table 1  
Kinetic constants of human alcohol dehydrogenases with retinoids

Substrate		ADH1B1	ADH1B2	ADH4
All- <i>trans</i> -retinol	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$30 \pm 8^a$	$33 \pm 9^a$	$23 \pm 2$
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$1.7 \pm 0.1^a$	$15 \pm 1^a$	$54 \pm 2$
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$57 \pm 16^a$	$460 \pm 130^a$	$2300 \pm 250$
4-Hydroxy-retinol	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$4 \pm 1$	$11 \pm 2$	$15 \pm 3$
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$5.5 \pm 0.5$	$170 \pm 20$	$2050 \pm 250$
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$1400 \pm 370$	$15,200 \pm 3300$	$136,000 \pm 31,700$
3,4-Didehydroretinol	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	ND	$24 \pm 5$	$28 \pm 7$
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )		$5.3 \pm 0.4$	$150 \pm 14$
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )		$220 \pm 50$	$5400 \pm 1400$
All- <i>trans</i> -retinal <sup>a</sup>	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$11 \pm 2$	$12 \pm 3$	$34 \pm 6$
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$1.1 \pm 0.1$	$33 \pm 3$	$110 \pm 25$
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$100 \pm 20$	$2800 \pm 750$	$3300 \pm 960$
4-Oxo-retinal	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$25 \pm 3$	$27 \pm 5$	$17 \pm 4$
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$10 \pm 1$	$470 \pm 70$	$1200 \pm 140$
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$400 \pm 60$	$17,480 \pm 4200$	$68,200 \pm 18,000$
3,4-Didehydroretinal	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	ND	$25 \pm 6$	$26 \pm 6$
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )		$13 \pm 1$	$73 \pm 5$
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )		$520 \pm 130$	$2800 \pm 700$

Activities were determined in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.5, 0.02% Tween 80, using 2.4 mM  $\text{NAD}^+$  for retinol oxidations, or 1 mM NADH (0.77 mM for ADH4) for retinal reductions, at 25°C. ND, not determined.

<sup>a</sup> Taken from [9].

concentrations, the  $K_m$  value increased up to 142  $\mu\text{M}$  at 0.1% Tween 80. In all the cases, the  $k_{\text{cat}}$  values are similar (around 60  $\text{min}^{-1}$ ), and therefore, the catalytic efficiency decreased from 15,750  $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$  (0.001% Tween 80) to 283  $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$  (0.1% Tween 80) (Table 2). On the other hand, we have found that changes in Tween 80 concentration (0–0.5%) have no effect on the kinetic constants for ethanol (results not shown), in agreement with previous reports [29,32].

The inhibition effect of Tween 80 on the human ADH4 oxidation of all-*trans*-retinol shows a competitive pattern (Fig. 2) with a  $K_i$  value of  $0.0019 \pm 0.0004\%$ . From the inhibition kinetics, a  $K_m$  of  $2.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$  could be estimated for human ADH4 with all-*trans*-retinol at 0% Tween 80 (Table 2). This value is 10-fold lower than that obtained with 0.02% Tween 80, consequently

resulting in a 10-fold higher  $k_{\text{cat}}/K_m$  in the absence of detergent. A similar effect was detected for ADH1. Thus, the  $K_m$  value for all-*trans*-retinol oxidation by human ADH1B2 decreased 10 times at 0% Tween 80 ( $2.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ), in comparison to the value obtained at the usual 0.02% Tween 80 ( $33 \pm 9 \mu\text{M}$ ), while the  $k_{\text{cat}}$  value remained constant ( $15 \pm 1 \text{min}^{-1}$ ), resulting in a catalytic efficiency of  $5400 \pm 700 \text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$  in the absence of Tween 80.

To determine whether the presence of Tween 80 in the assay buffer was really indispensable for the retinoid kinetics study, we checked the stability of the all-*trans*-retinol solution with and without 0.02% Tween 80. The absorbance spectrum of the solutions was recorded at different times (Fig. 3). In the presence of Tween 80, the spectrum was practically identical at 5, 30, and

Table 2  
Effect of Tween 80 on the kinetic constants for all-*trans*-retinol oxidation by human ADH4

% Tween 80 (w/v)	All- <i>trans</i> -retinol		
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
0 <sup>a</sup>	$2.4 \pm 0.4$	$63 \pm 1$	$26,300 \pm 4400$
0.001	$4.0 \pm 0.3$	$63 \pm 1$	$15,750 \pm 1200$
0.005	$8.2 \pm 1.1$	$64 \pm 2$	$7800 \pm 1100$
0.01	$11.9 \pm 0.9$	$63 \pm 1$	$5300 \pm 410$
0.02	$23.4 \pm 2.3$	$54 \pm 2$	$2300 \pm 250$
0.1	$142 \pm 8$	$40 \pm 1$	$283 \pm 20$

All-*trans*-retinol dehydrogenase activities for human ADH4 were determined in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.5, at different concentrations of Tween 80, using 2.4 mM  $\text{NAD}^+$ , at 25°C. Results are expressed as means  $\pm$  SEM of at least three determinations.

<sup>a</sup> Values estimated from the inhibition kinetics data (Fig. 2) analysed with the GraFit 5.0 program.

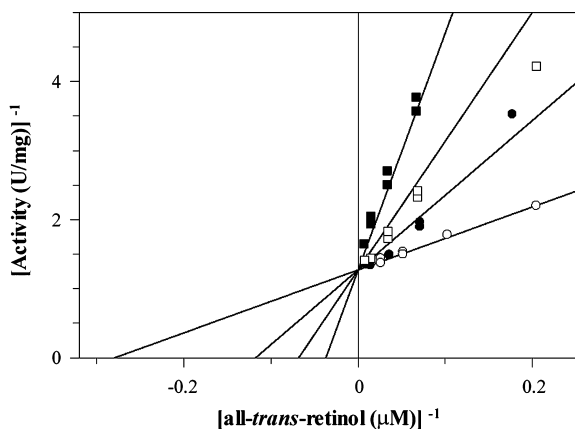


Fig. 2. Inhibition of the all-*trans*-retinol dehydrogenase activity of human ADH4 by Tween 80, analysed with the Lineweaver–Burk plot. Retinol oxidation activity was determined in the presence of 0.001 (○), 0.005 (●), 0.01 (□), and 0.02 (■) % Tween 80, in 2.4 mM NAD<sup>+</sup>, at 25°C.

90 min after the solution had been prepared, with an absorbance maximum at 328 nm (Fig. 3A). In contrast, in the absence of the detergent, the spectrum showed two main peaks, at 323 and 340 nm, that decreased with time, while another peak, at 280 nm, increased (Fig. 3D). These changes were already observed in the 5-min solution.

The 5- and 90-min solutions of all-*trans*-retinol with and without 0.02% Tween 80 were extracted with hexane, and the retinoids were analysed by HPLC (Fig. 3). In the 5-min solution without Tween 80 (Fig. 3E), a main peak of all-*trans*-retinol (retention time = 35 min) was observed, that represented in the chromatogram about 72% of the total absorbance area of all the compounds detected at 325 nm. This peak decreased down to 24%, in the 90-min solution without detergent (Fig. 3F). Other peaks, that corresponded to more polar compounds, presumably oxidized retinoids, eluting at retention times lower than 20 min, were already present 5 min after the solution was prepared (Fig. 3E). Most of the 325 nm absorbing material corresponded to the polar compounds in the 90-min solution (Fig. 3F). In the presence of 0.02% Tween 80, the peak of all-*trans*-retinol represented 98% of the total area of all the compounds detected in the 5-min solution (Fig. 3B). This peak remained unchanged in the analysis of the 90-min solution (Fig. 3C). In addition, absorbance analysis of an all-*trans*-retinol solution in 0.001% Tween 80 (not shown) detects the presence of retinoid derivatives at 30- and 90-min incubations, indicating that low detergent concentrations do not provide full retinoid stability.

## Discussion

ADH is an enzyme with wide substrate specificity and potentially can contribute to the metabolism of many

physiological compounds such as ethanol,  $\omega$ -hydroxyfatty acids, lipid peroxidation aldehydes (i.e., 4-hydroxynonenal), or retinoids [2,8]. ADH has been suggested to be involved in retinoid metabolism due to its high activity with all-*trans*-, 9-*cis*-, and 11-*cis*-retinoids [7–9]. Moreover, knockout studies provide evidence of a role of ADH1 and ADH4 in *in vivo* retinol oxidation [6]. Here we have studied the kinetics of ADH with additional physiological substrates: the ring-oxidized derivatives of retinoids.

The  $k_{cat}$  values of ADH toward 4-oxo- and 4-hydroxy-retinoids are the highest among all retinoid substrates assayed for this enzyme. In general, ADH shows low turnover numbers with retinol isomers, in comparison to those for aliphatic substrates [9,30,33]. Remarkably, the kinetic behaviour of the ring-oxidized retinoids is similar to that of the aliphatic substrates. Thus, ADH4 exhibits a  $k_{cat}$  value with 4-hydroxy-retinol of 2050 min<sup>-1</sup>, close to that obtained with ethanol (2570 min<sup>-1</sup>) [30]. This suggests a common rate-limiting step for aliphatic alcohols/aldehydes and 4-oxo- and 4-hydroxy-retinoids, which would be different from that of other retinoids [33].

While the oxidation of the cyclohexenyl ring of all-*trans*-retinoic acid to 4-oxo- and 4-hydroxy-retinoic acids by different cytochrome P450 isoforms has been well demonstrated [19,36], the transformation of 4-oxo- and 4-hydroxy-retinols to the corresponding retinoic acids has not been documented. The remarkably high activity of ADH with these compounds here demonstrated, and the extensive distribution of ADH1 and ADH4 in tissues provide another pathway for the production of the bioactive retinoic acids oxidized at the C4 atom, which may represent an additional regulation of the retinoid signalling pathway.

The kinetic constants for the 3,4-didehydroretinoids are very similar to those of all-*trans*-retinoids for both ADH1 and ADH4. Therefore, the double bond between C3 and C4 of the cyclohexenyl ring does not affect ADH activity. As mentioned above, 3,4-didehydroretinoids are widely distributed in vertebrates, being involved in a variety of functions. ADH1, present in most vertebrates, and ADH4, in mammals [1], are appropriate enzymes for the generation of the active compounds, 3,4-didehydroretinal and 3,4-didehydroretinoic acid, from the alcohol. The 3,4-didehydroretinoids appear to have a specific function in mammalian skin, especially in human, where they account for about 30% of the total retinoid content in this tissue [26]. The active form in skin is 3,4-didehydroretinoic acid, which cannot be synthesized from all-*trans*-retinoic acid but from 3,4-didehydroretinol [20,37]. ADH1 and ADH4, both found in epidermis [38–40], could participate, along with microsomal retinol dehydrogenases [37], in the activation pathway to 3,4-didehydroretinoic acid, a molecule important for epithelia differentiation and maintenance [20].

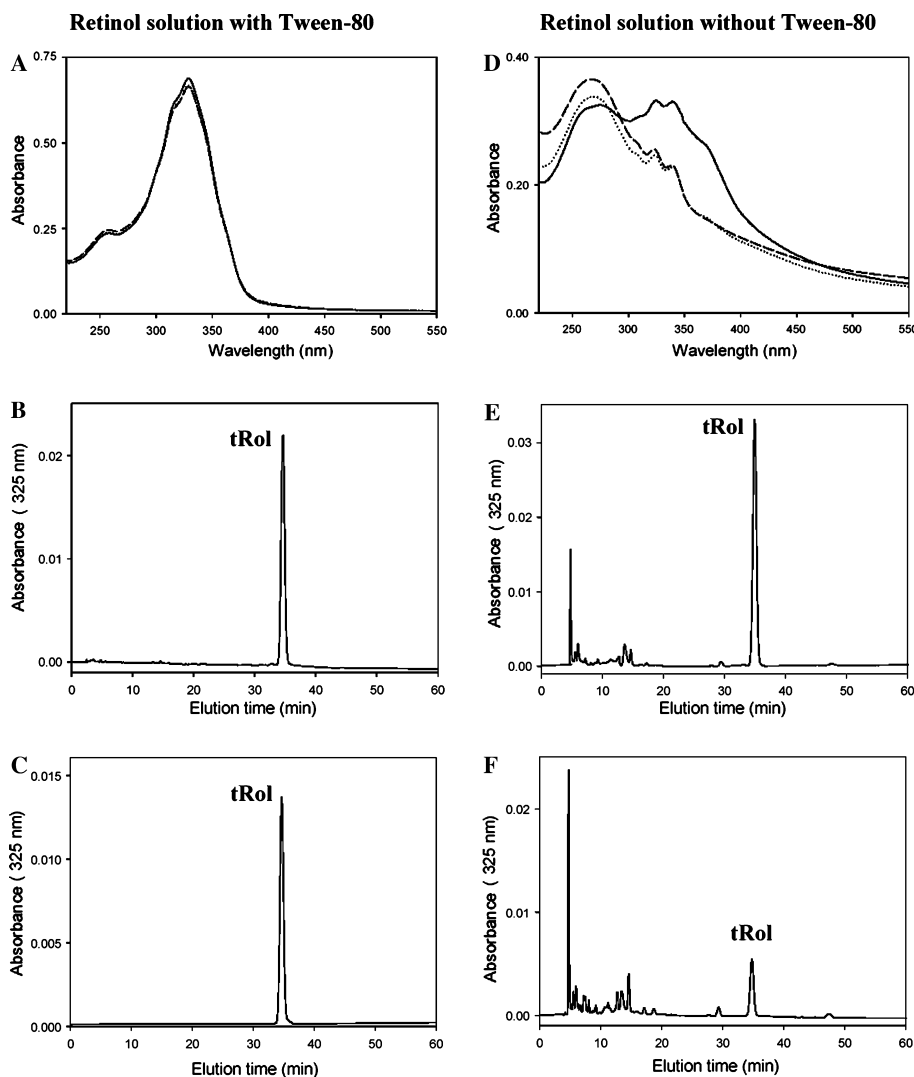


Fig. 3. Absorbance and HPLC analyses of the effect of Tween 80 on the stability of all-*trans*-retinol in water solutions. Two solutions of 300  $\mu\text{M}$  all-*trans*-retinol (tRol) in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.5, were prepared with (A–C) or without (D–F) 0.02% Tween 80. UV-visible absorption spectra of all-*trans*-retinol in both solutions were recorded at 5 (—), 30 (…), and 90 (---) min after the solutions were prepared and kept at 4 °C in a dark room (A and D). The 5-min (B and E) and 90-min (C and F) solutions were extracted with hexane and analysed for the retinoids present by HPLC, using a reverse-phase column.

Tween 80 is the most used agent to solubilize retinoids for the ADH activity assay [2,7–9,27–34], although some inhibition of the ADH activity with retinoids was noticed [27,29]. We have now proved that the inhibition of the retinol dehydrogenase activity of ADH by Tween 80 is the result of an increase of the retinol  $K_m$  values in the presence of the detergent. In fact, Tween 80 behaves as a competitive inhibitor for retinol oxidation by ADH. Probably the effect of the detergent is not on the enzyme, since it is fully active with ethanol or acetaldehyde, but on the retinoid. The results could be interpreted as the retinoid being sequestered by the detergent, maybe in a micellar form [27]. The enzyme would bind only free retinoid, which concentration would decrease inversely to the Tween 80 concentration, resulting in a competitive effect. This

is consistent with the absence of inhibition for water-soluble substrates such as ethanol or acetaldehyde. A similar model has been used to explain the inhibition by non-ionic detergents of the lipoxygenase-catalysed dioxygenation of linoleate [41]. As Tween 80 concentration decreases, the  $K_m$  values of all-*trans*-retinol for human ADH4 and ADH1B2 decrease, and values of 2.4 and 2.8  $\mu\text{M}$ , respectively, can be estimated in detergent-free buffer. These  $K_m$  values are comparable to those obtained for retinol dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily [42], which are microsomal NAD(P)-dependent enzymes. Some of these enzymes have been proven to be involved in *in vivo* retinoid metabolism [43,44].

In spite of the negative effect on the activity, the presence of Tween 80, or of an agent with similar properties,

in the assay buffer, is indispensable to keep the stability of the retinol solution over time. In water solution, the conjugated double bonds of the isoprenoid chain render retinoids extremely susceptible to photodegradation, isomerization, and oxidation [45]. Thus, in the absence of Tween 80, a fast generation of oxidation products occurs, already observed by HPLC immediately after an aqueous solution of the retinoid is prepared, while the presence of Tween 80 completely prevents the retinoid degradation. The spectrophotometric activity assay is therefore not possible in the absence of the detergent. It can be concluded that the widely used methodology involving the presence of 0.02% Tween 80 in the assay buffer [29] is a reliable and reproducible system of ADH activity analysis with retinoids, suitable for comparing different ADH forms and different retinoid substrates. However, these conditions result in 10-fold higher  $K_m$  values than those estimated in the absence of detergent. This has to be taken into account when comparing ADH with other enzymes involved in retinoid metabolism, and when evaluating the functional role of ADH in the redox transformations of retinoids.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Spanish Dirección General de Investigación (BMC2002-02659, BMC2003-09606, and SAF2001-3288) the European Union (KQLK3-CT2002-02029), the Generalitat de Catalunya (2001SGR 00198), and the Xunta de Galicia (PGIDIT02PXIC30108PN).

## References

- [1] E. Nordling, B. Persson, H. Jörnvall, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 1070–1075.
- [2] M.D. Boleda, N. Saubi, J. Farrés, X. Parés, *Arch. Biochem. Biophys.* 307 (1993) 85–90.
- [3] G. Duester, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 4315–4324.
- [4] J.-O. Höög, J.J. Hedberg, P. Strömberg, S. Svensson, *J. Biomed. Sci.* 8 (2001) 71–76.
- [5] A. Molotkov, X. Fan, L. Deltour, M.H. Foglio, S. Martras, J. Farrés, X. Parés, G. Duester, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 5337–5342.
- [6] A. Molotkov, L. Deltour, M.H. Foglio, A.E. Cuenca, G. Duester, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 13804–13811.
- [7] Z.-N. Yang, G.J. Davis, T.D. Hurley, C.L. Stone, T.-K. Li, W.F. Bosron, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18 (1994) 587–591.
- [8] A. Allali-Hassani, J.M. Peralba, S. Martras, J. Farrés, X. Parés, *FEBS Lett.* 426 (1998) 362–366.
- [9] S. Martras, R. Alvarez, S.E. Martínez, D. Torres, O. Gallego, G. Duester, J. Farrés, A.R. de Lera, X. Parés, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 1660–1670.
- [10] C.K. Schmidt, J. Volland, G. Hamscher, H. Nau, *Biochim. Biophys. Acta* 1583 (2002) 237–251.
- [11] C.C. Achkar, F. Derguini, B. Blumberg, A. Langston, A.A. Levin, J. Speck, R.M. Evans, J. Bolado Jr., K. Nakanishi, J. Buck, L.J. Gudas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 4879–4884.
- [12] B. Blumberg, J. Bolado Jr., F. Derguini, A. Grey Craig, T.A. Moreno, D. Chakravarti, R.A. Heyman, J. Buck, R.M. Evans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 4873–4878.
- [13] W.W.M. Pijnappel, H.F.J. Hendriks, G.E. Folkers, C.E. van der Brink, E.J. Dekker, C. Edelenbosch, P.T. van der Saag, A.J. Durston, *Nature* 366 (1993) 340–344.
- [14] N. Idres, J. Marill, M.A. Flexor, G.G. Chabot, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 31491–31498.
- [15] M.A. Lane, A.C. Chen, S.D. Roman, F. Derguini, L.J. Gudas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 13524–13529.
- [16] A.C. Chen, X. Guo, F. Derguini, L.J. Gudas, *Cancer Res.* 57 (1997) 4642–4651.
- [17] T.N. Faria, R. Rivi, F. Derguini, P.P. Pandolfi, L.J. Gudas, *Cancer Res.* 58 (1998) 2007–2013.
- [18] M.A. Leo, J.M. Lasker, J.L. Raucy, C.I. Kim, M. Black, C.S. Lieber, *Arch. Biochem. Biophys.* 269 (1989) 305–312.
- [19] W.S. Blaner, R. Piantadosi, A. Sykes, S. Vogel, in: H. Nau, W.S. Blaner (Eds.), *Retinoids. The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action*, Springer, Berlin, 1999, pp. 117–149.
- [20] H. Törmä, D. Asselineau, E. Andersson, B. Martin, P. Reiniche, P. Chambon, B. Shroot, M. Darmon, A. Vahlquist, *J. Invest. Dermatol.* 102 (1994) 49–54.
- [21] J.J. Repa, L.A. Plum, P.K. Tadikonda, M. Clagett-Dame, *FASEB J.* 10 (1996) 1078–1084.
- [22] I. Provencio, E.R. Loew, R.G. Foster, *Vision Res.* 32 (1992) 2201–2208.
- [23] K. Okano, T. Oshi, Y. Miyashita, T. Moriya, M. Tsuda, T. Irie, N. Ueki, T. Seki, *Zool. Sci.* 19 (2002) 191–195.
- [24] P.J. Werten, B. Roll, D.M. van Aalten, W.W. de Jong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 3282–3287.
- [25] A. Käkälä, R. Käkälä, H. Hyvärinen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 187 (2003) 118–127.
- [26] A. Vahlquist, J.B. Lee, G. Michaelsson, O. Rollman, *J. Invest. Dermatol.* 79 (1982) 94–97.
- [27] R.D. Zachman, J.A. Olson, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 2309–2313.
- [28] P. Julià, J. Farrés, X. Parés, *Exp. Eye Res.* 42 (1986) 305–314.
- [29] X. Parés, P. Julià, *Methods Enzymol.* 189 (1990) 436–441.
- [30] B. Crosas, A. Allali-Hassani, S.E. Martínez, S. Martras, B. Persson, H. Jörnvall, X. Parés, J. Farrés, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 25180–25187.
- [31] N.Y. Kedishvili, W.H. Gough, W.I. Davis, S. Parsons, T.-K. Li, W.F. Bosron, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249 (1998) 191–196.
- [32] C.-L. Han, C.-S. Liao, C.-W. Wu, C.-L. Hwang, A.-R. Lee, S.-J. Yin, *Eur. J. Biochem.* 254 (1998) 25–31.
- [33] B.V. Plapp, J.L. Mitchell, K.B. Berst, *Chem. Biol. Int.* 130–132 (2001) 445–456.
- [34] C.-F. Chou, C.-L. Lai, Y.-C. Chang, G. Duester, S.-J. Yin, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25209–25216.
- [35] L.-O. Hedén, J.-O. Höög, K. Larsson, M. Lake, E. Lagerholm, A. Holmgren, B.L. Vallee, H. Jörnvall, H. von Bahr-Lindström, *FEBS Lett.* 194 (1996) 327–332.
- [36] J.A. White, B. Beckett-Jones, Y.-D. Guo, J. Dilworth, J. Bonasoro, G. Jones, M. Petkovich, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 18538–18541.
- [37] T. Karlsson, A. Vahlquist, N.Y. Kedishvili, H. Törmä, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303 (2003) 273–278.
- [38] R.J. Haselbeck, H.L. Ang, G. Duester, *Dev. Dyn.* 208 (1997) 447–453.
- [39] R. Handschin, P. Maly, V. Crotet, M. Toranelli, D. Sasse, *Acta Histochem. Cytochem.* 30 (1997) 567–574.
- [40] C. Cheung, C.K. Smith, J.-O. Höög, S.A. Hotchkiss, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261 (1999) 100–107.
- [41] M.J. Schilstra, G.A. Veldink, J.F. Vliegthart, *Lipids* 29 (1994) 225–231.



- [42] W.H. Gough, S. van Ooteghem, T. Sint, N.Y. Kedishvili, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 19778–19785.
- [43] J.L. Napoli, *Biochim. Biophys. Acta* 1440 (1999) 139–162.
- [44] M. Lidén, K. Tryggvason, U. Eriksson, *Mol. Aspects Med.* 24 (2003) 403–409.
- [45] N. Noy, in: H. Nau, W.S., Blaner (Eds.), *Retinoid S. The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action*, Springer, Berlin, 1999, pp. 3–29.
- [46] M. Domínguez, R., Alvarez, A.R., de Lera, S. Martras, J. Farrés, X. Parés, *Org. Biomol. Chem.* Submitted.

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquesta secció es resumeixen els Resultats i Discussió del articles I i II, i es presenten dades addicionals, no publicades. També es detallen metodologies desenvolupades per primera vegada en el nostre grup d'investigació.

### EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ D'ADHs

Aquesta Tesi s'ha proposat l'estudi cinètic de l'ADH amb retinoides d'interès funcional rellevant, que encara no havien estat analitzats per a aquest enzim. Pel seu interès biomèdic hem treballat amb els enzims humans, però també amb els de ratolí, que havien estat molt poc estudiats. ADH1 i ADH4 són les formes d'alcohol deshidrogenasa més actives amb retinoides, però fins el moment, només s'havien caracteritzat amb aquests substrats els enzims humans i els de rata (Boleda et al., 1993, Yang et al., 1994, Allali-Hassani et al., 1998).

Degut a que els estudis *knockout* d'enzims, de proteïnes d'unió i receptors associats al metabolisme de retinoides es realitzen en ratolins, s'ha considerat d'interès estudiar i caracteritzar amb retinoides les ADH1 i ADH4 d'aquesta espècie. El primer objectiu, doncs, ha estat clonar, expressar i purificar els enzims de ratolí recombinants i fer una inicial caracterització cinètica amb alcohols alifàtics. Malgrat que els enzims ortòlegs presenten una elevada identitat de seqüència entre les espècies estudiades (83 % per a ADH1 i 89 % per a ADH4) (Taula 3), els enzims de rosegadors presenten propietats cinètiques diferents als enzims humans (Crosas et al., 2000).

Taula 3

Percentatge d'identitat de seqüència entre alcohol deshidrogenases de mamífers

% identitat	hADH1B1	hADH1B2	hADH4	mADH1	mADH4
<b>hADH1B1</b>	100,0	99,7	69,4	83,4	68,4
<b>hADH1B2</b>		100,0	69,2	83,2	68,1
<b>hADH4</b>			100,0	68,6	89,0
<b>mADH1</b>				100,0	67,6
<b>mADH4</b>					100,0

h i m identifiquen enzims humans i de ratolí, respectivament.

Les diferents ADHs recombinants, tant humanes com de ratolí, es van expressar amb el vector pGEX-4T-2 en cèl·lules d'*E. coli*, en general amb alts nivells, des de 30 mg/l de cultiu per a l'ADH1B2 humana fins a 1 mg/l de cultiu per a la mADH4 o el mutant hADH4 M141L (Taula 4), en forma de proteïna de fusió amb la glutatió-S- transferasa (GST).

Totes les proteïnes s'han purificat a homogeneïtat, i mostren una subunitat amb un pes molecular d'aproximadament 40 kDa, que correspon a la massa esperada per a una cadena d'aminoàcids d'aproximadament 370 residus, típica de l'ADH (Figura 16).

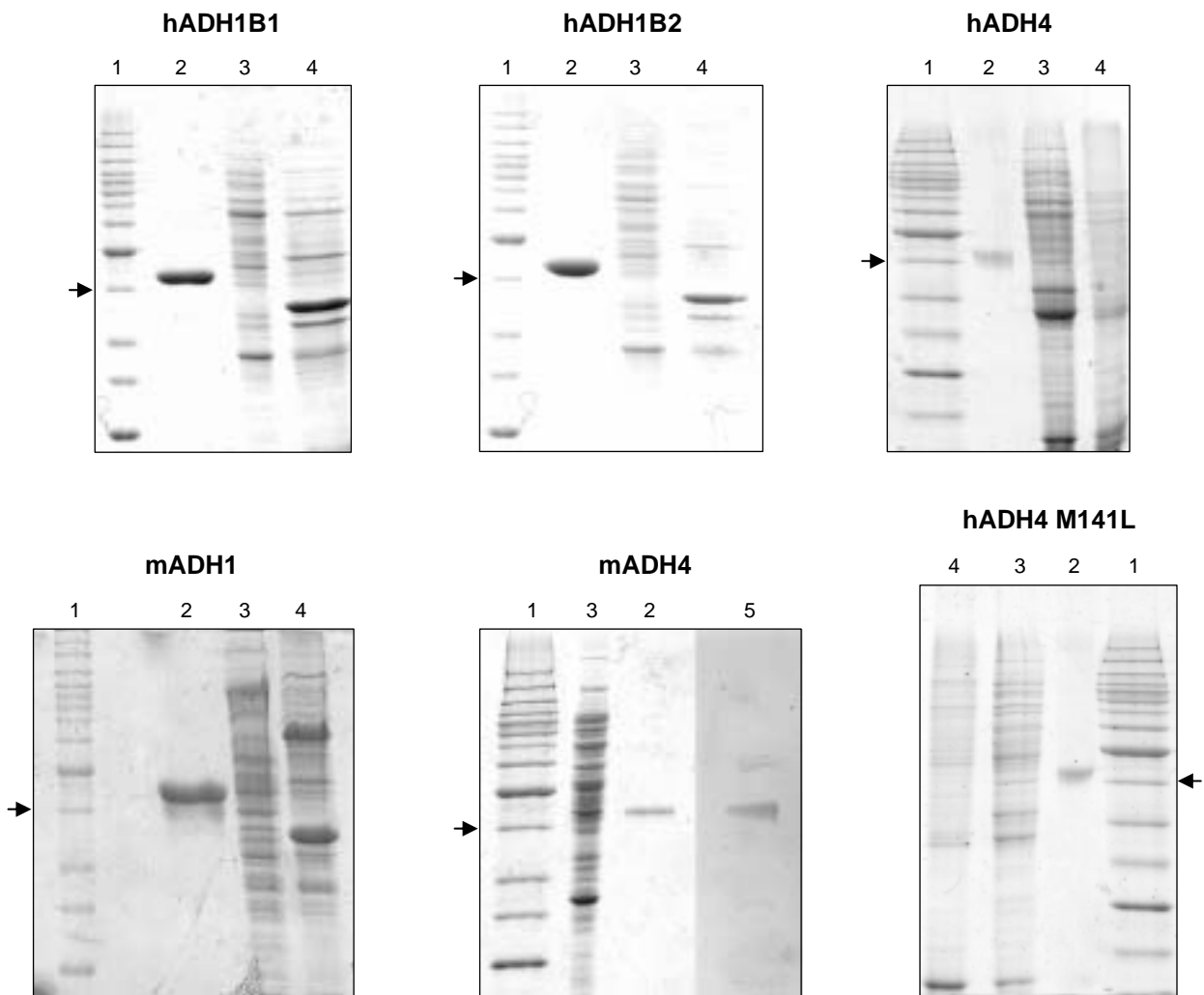


Figura 16

#### Anàlisi de la purificació de les alcohol deshidrogenases

L'electroforesi en gels de poliacrilamida amb SDS i tinció amb Coomassie (i també la tinció amb sals de plata per a mADH4) demostra que les proteïnes s'obtenen a homogeneïtat. (1) Patrons de pesos moleculars. La fletxa indica la banda de 40 kDa. (2) Proteïna eluïda amb trombina: 3 µg de hADH1B1, hADH1B2, i mADH1, 2 µg de hADH4 i hADH4 M141L i 0,7 µg de mADH4. (3) Homogenat d'*E. coli* després de l'expressió (10 µg de proteïna). (4) Proteïnes contingudes en el sediment (4 µg de hADH1B1 i hADH1B2, i 5 µg de hADH4 i hADH4 M141L. (5) 0,7 µg de mADH4 visualitzats per tinció amb sals de plata.

Gràcies al sistema d'expressió de l'ADH com a proteïna de fusió amb la glutatió-S-transferasa (GST), tots els enzims s'han obtingut amb un sol pas de purificació a partir de la fracció soluble de l'homogenat de cèl·lules. Això representa un avenç respecte a l'anterior procediment utilitzat en el nostre grup, que requeria la utilització d'almenys dues cromatografies, la primera d'intercanvi iònic i la segona d'afinitat (Allali-Hassani et al., 1998). A més d'augmentar la rapidesa, amb el nou sistema s'obté més quantitat de proteïna purificada gràcies al nivell d'expressió més elevat (Taula 4).

Taula 4

**Rendiment de l'expressió i de la purificació**

ADH1B1, ADH1B2, ADH4 i ADH4 M141L humanes, i ADH1 i ADH4 de ratolí s'expressen amb diferent eficiència en el sistema d'expressió pGEX-4T-2.

	Quantitat obtinguda		
	Després de l'expressió		Després de la purificació
	(U / l de cultiu)	(mg / l de cultiu)	(mg / l de cultiu)
<b>hADH1B1</b>	6	29,5	1,9
<b>hADH1B2</b>	371	24,7	1,4
<b>hADH4</b>	812	12,0	4,1
<b>hADH4 M141L</b>	36	1,0	0,4
<b>mADH1</b>	82	26,0	5,2
<b>mADH4</b>	133	1,0	0,1

L'activitat específica obtinguda per les ADHs humanes (Taula 5) és comparable amb les dades ja publicades, indicant que el nivell de purificació de les ADHs, assolit pel sistema d'expressió com a proteïna de fusió amb la GST, és comparable als obtinguts per sistemes de purificació de les proteïnes recombinants utilitzats anteriorment (Wagner et al., 1983, Yin et al., 1984, Allali-Hassani et al., 1998, Xie and Hurley, 1999). Respecte a les ADHs de ratolí, els nostres resultats són els primers obtinguts per a enzims recombinants i l'activitat específica (3,1 U/mg per a la mADH1 i 130 U/mg per a la mADH4) és més alta que els valors publicats per als enzims purificats a partir de teixit (Algar et al., 1983, Taula 5).

Taula 5

**Taula de purificació d'alcohol deshidrogenases recombinants**

Les alcohol deshidrogenases ADH1B1, ADH1B2, ADH4 i la mutant ADH4 M141L humanes, i ADH1 i ADH4 de ratolí, clonades en el vector d'expressió pGEX-4T-2, han estat expressades en *E. coli*, i purificades utilitzant la resina Glutatió-Sepharose, en un sol pas cromatogràfic i posterior incubació amb trombina. En la taula, s'indiquen els resultats de les purificacions i es resalta l'activitat específica (U/mg), propietat intrínseca de l'enzim. Les mesures d'activitat s'han realitzat en les condicions estàndard pròpies de cada proteïna (vegeu Material i Mètodes dels Articles I i II).

		Volum (ml)	Activitat (U/ml)	Activitat total (U)	Proteïna (mg/ml)	Activitat específica (U/mg)	Factor de purificació	Rendiment (%)
<b>hADH1B1</b>	Homogenat	40	0,11	4,4	15,1	0,007	1	100
	GSH-Sepharose	4,0	0,07	0,28	0,35	<b>0,2</b>	29	6,4
<b>hADH1B2</b>	Homogenat	40	6,9	276	20,0	0,345	1	100
	GSH-Sepharose	4,0	3,9	15,6	0,26	<b>15</b>	43	5,6
<b>hADH4</b>	Homogenat	70	17,4	1218	22,0	0,790	1	100
	GSH-Sepharose	4,6	90,3	415	1,34	<b>67</b>	85	34
<b>HADH4 M141L</b>	Homogenat	70	0,76	53	18,0	0,042	1	100
	GSH-Sepharose	4,6	4,3	20,0	0,12	<b>36</b>	857	38
<b>mADH1</b>	Homogenat	116	1,1	123	39,5	0,028	1	100
	GSH-Sepharose	5,0	5,0	25,0	1,60	<b>3,1</b>	111	20
<b>mADH4</b>	Homogenat	128	1,6	205	11,7	0,137	1	100
	GSH-Sepharose	5,0	4,3	21,5	0,033	<b>130</b>	949	10

h: enzim humà; m: enzim de ratolí.

El disseny del clonatge de les ADHs en el vector d'expressió pGEX-4T-2 deixa, després de la digestió amb trombina per separar la proteïna GST de l'ADH, dos aminoàcids addicionals en l'extrem N-terminal de l'ADH, una glicina i una serina. Per comprovar que aquests dos aminoàcids no afecten el plegament de la proteïna ni per tant, la seva activitat, s'han estudiat propietats cinètiques de totes les ADHs expressades i purificades (Taula 6), i s'han comparat amb les dades ja existents a la bibliografia. Les dades aquí presentades són comparables a les obtingudes anteriorment amb enzims purificats a partir de teixit (Wagner et al., 1983, Yin et al., 1984) o amb enzims recombinants (Crosas et al., 2000), i per tant, ens trobem amb un sistema adequat per obtenir ADHs de forma eficient. D'altra banda, les ADHs de ratolí ADH1 i ADH4 recombinants s'han caracteritzat per primera vegada amb alcohols alifàtics (vegeu Taula 1 de l'Article I).

Taula 6

**Constants cinètiques de les ADHs amb alcohols alifàtics**

Les activitats alcohol deshidrogenasa s'han determinat a pH 7,5 i al pH òptim de 10,5 (8,5 per a l'ADH1B2), a 25 °C i utilitzant NAD<sup>+</sup> 2,4 mM (0,3 mM per a la mADH1) com a coenzim (Article I).

		hADH1B1	hADH1B2	hADH4	hM141L	mADH1	mADH4	
pH 7,5	Etanol	$K_m$ (mM)	0,31 ± 0,07	2,2 ± 0,5	37 ± 6	40 ± 4	0,48 ± 0,09	1625 ± 370
		$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	14 ± 1	715 ± 40	1830 ± 70	1105 ± 25	115 ± 5	2480 ± 225
		$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	48 ± 11	325 ± 75	49 ± 8	28 ± 3	240 ± 45	1,5 ± 0,4
	Hexanol	$K_m$ (mM)	0,026 ± 0,007	0,17 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,048 ± 0,007	0,085 ± 0,003	1,9 ± 0,1
		$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	6,1 ± 0,6	620 ± 50	870 ± 65	440 ± 10	27 ± 1	1850 ± 500
		$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	235 ± 65	3655 ± 910	5450 ± 1100	9145 ± 1355	315 ± 15	970 ± 90
pH òptim	Etanol	$K_m$ (mM)	3,4 ± 0,5	3,2 ± 0,6	10 ± 2	25 ± 5	0,83 ± 0,06	255 ± 60
		$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	18 ± 1	1375 ± 80	4130 ± 205	2840 ± 185	265 ± 5	12900 ± 905
		$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	5,4 ± 0,8	430 ± 85	415 ± 85	115 ± 25	320 ± 25	51 ± 13
	Hexanol	$K_m$ (mM)	0,057 ± 0,014	0,16 ± 0,03	0,024 ± 0,004	0,033 ± 0,007	0,006 ± 0,001	0,63 ± 0,03
		$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	14 ± 1	1305 ± 90	3240 ± 80	1550 ± 75	230 ± 5	5190 ± 105
		$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	48 ± 11	8150 ± 1630	135085 ± 22760	46970 ± 1	36200 ± 7000	8230 ± 400

Per a tots els enzims, s'observa que la  $K_m$  per a l'hexanol és més baixa que per a l'etanol mentre que els valors de  $k_{cat}$  no difereixen massa, i per tant, s'obté una eficiència catalítica més gran per a l'alcohol de cadena alifàtica més llarga, propietat general per a totes les ADHs. L'ADH1 de ratolí presenta propietats cinètiques semblants a l'ADH1 de rata (Boleda et al., 1993) i a l'ADH1C humana (Yin et al., 1984). Les ADH4 de ratolí i de rata tenen constants cinètiques similars ( $K_m$  per a l'etanol a pH 7,5 d'aproximadament 2 M, Taula 6 i Boleda et al., 1993, Crosas et al., 2000). Aquest valor és molt més alt que el corresponent valor de l'ADH4 humana (~ 40 mM). El diferent comportament en l'oxidació de l'etanol de les ADH4 de rosegadors i de l'ADH4 humana s'ha relacionat amb un canvi de residu en la posició 294, situat en el túnel hidrofòbic d'unió del substrat. Les ADH4 de rosegadors hi presenten una alanina mentre que en l'ADH4 humana és una valina. Això fa que el túnel hidrofòbic de l'ADH4 de rosegadors sigui més ample en aquesta regió, el que provocaria un menor nombre d'unions productives per a l'etanol (Crosas et al., 2000). El canvi, però, no afecta l'activitat de les ADH4 amb retinoides, substrats que són metabolitzats amb una eficiència catalítica molt alta pels enzims d'ambdues espècies (vegeu Taules 2 i 3 de l'Article I). Aquest fet dóna suport a un paper preferent de l'ADH4, evolutivament conservat, en la transformació redox de substrats de cadena llarga, com els retinoides, per sobre dels de cadena curta.

## SÍNTESI DE RETINOLS PER OXIDACIÓ DE RETINALS

El doble enllaç C=O d'un aldehyd o d'una cetona es troba polaritzat degut a l'elevada electronegativitat de l'oxigen respecte l'àtom de carboni. Per aquesta raó, una de les reaccions més comunes d'aquests compostos és l'addició nucleofílica, la qual implica l'addició d'un nucleòfil al carboni electrofílic del grup carbonil. Ja que el nucleòfil utilitza un parell d'electrons per formar un nou enllaç amb el carboni, dos electrons del doble enllaç carboni-oxigen s'han de desplaçar cap a l'àtom d'oxigen electronegatiu, on poden ser estabilitzats com a anió alcòxid. El borhidruir de sodi ( $\text{NaBH}_4$ ) és un dels reactius més utilitzats per reduir un aldehyd o una cetona als corresponents alcohols (Figura 17).

Així, el mecanisme mitjançant el qual el borhidruir de sodi redueix un grup carbonil a alcohol, s'inicia amb la transferència d'un ió hidruir al carboni electrofílic de l'enllaç C=O per generar l'anió alcòxid que s'estabilitza amb el borà produït. Degut a que el bor té quatre hidrurs que pot donar, aquesta etapa es repeteix tres vegades més, fins que el bor ha transferit els seus quatre hidrògens. Per hidròlisi d'aquests alcòxids es forma l'alcohol corresponent (Figura 17).

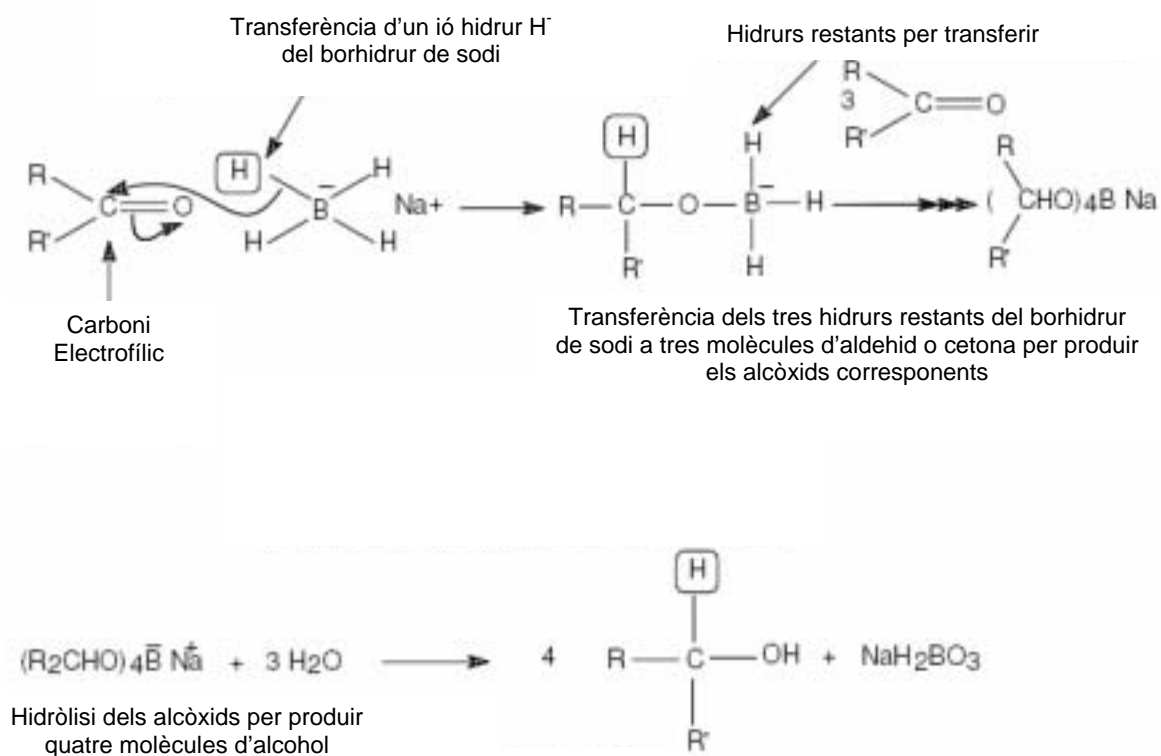


Figura 17

### Mecanisme de reducció de compostos carbonílics amb borhidruir de sodi

L'atac nucleofílic del borhidruir de sodi sobre un grup carbonil i la posterior hidròlisi de l'alcòxid format, genera un grup alcohol. Una molècula de borhidruir de sodi es capaç de reduir quatre grups carbonil, per transferència dels quatre hidrurs que la formen.

D'aquesta manera, la reducció de retinal amb borhidrur sòdic permet obtenir de forma ràpida i eficaç el corresponent retinol (Figura 18). Seguint aquest protocol, el primer retinol que es va obtenir va ser el 9-*cis*-retinol (Allali-Hassani et al., 1998, Crosas et al., 2000), que no es pot obtenir comercialment, a partir de 9-*cis*-retinal, que sí és comercial.

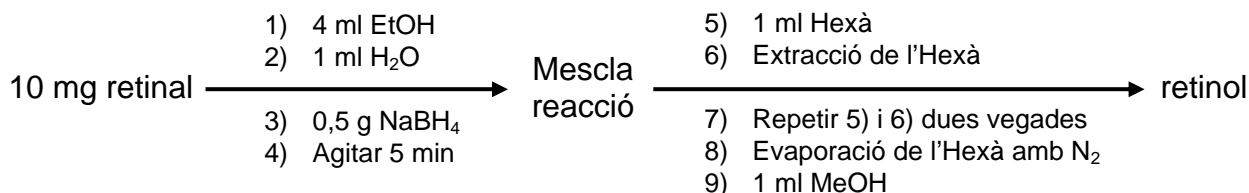


Figura 18

**Protocol de reducció de retinal amb borhidrur sòdic**

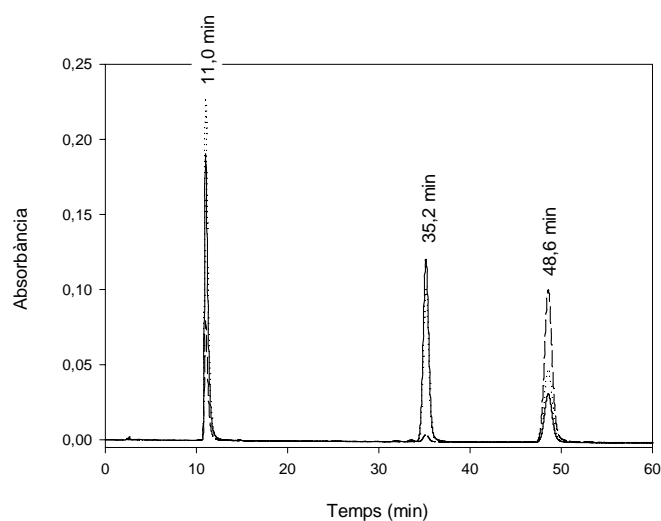
10 mg de retinal són reduïts amb 0,5 g de borhidrur sòdic. El producte obtingut s'extreu amb hexà, que s'asseca amb nitrogen per poder ressuspendre'l amb metanol.

Amb aquest mètode, també s'ha obtingut 11-*cis*-retinol, 7-*cis*-retinol, 4-hidroxiretinol i 3,4-dideshidroretinol a partir d'11-*cis*-retinal, 7-*cis*-retinal, 4-oxo-retinal i 3,4-dideshidroretinal respectivament, retinoides sintetitzats i cedits per la Dra. R. Álvarez i el Dr. A. R. de Lera (Departamento de Química Orgánica, Universidad de Vigo).

La puresa dels productes obtinguts en la reacció de síntesi es va comprovar espectrofotomètricament i/o per HPLC. En el primer cas, en base a les importants diferències espectrals entre retinols i retinals (Figura 19B), es va enregistrar l'espectre del retinal de partida i l'espectre del producte de la reacció, en etanol o metanol, per comprovar que la reducció amb borhidrur de sodi havia tingut lloc, cosa que es va produir per a totes les reaccions realitzades. Per als retinols amb isomerització *cis* a la cadena alifàtica, com l'11-*cis*-retinol, també se'n va comprovar la puresa per HPLC, utilitzant una columna de fase reversa LiChrosorb RP-18, i acetonitril i acetat amònic a l'1 % amb una proporció 77 : 23 com a fase mòbil, a 1 ml/min. Aquest mètode permet separar entre sí els àcids retinoics, els retinols i els retinals, i dins de cada grup els isòmers *cis* dels isòmers *trans*, però no els diferents isòmers *cis* entre sí. Tot i així, l'HPLC és un mètode eficaç per seguir la reducció química d'un retinal a retinol (Figura 19). Els àcids retinoics elueixen a un temps de retenció d'aproximadament 10 min, mentre que els retinols ho fan a 35 min, i els retinals, que són els compostos més apolars dels tres, ho fan gairebé a 50 min (Figura 19A). A 340 nm, aproximadament, la longitud d'ona on l'àcid retinoic presenta la màxima absorbància, es detecten en general tots els retinoides, mentre que el retinol presenta un màxim d'absorbància al voltant de 325 nm i el retinal, aproximadament, a 380 nm (Figura 19B).



A



B

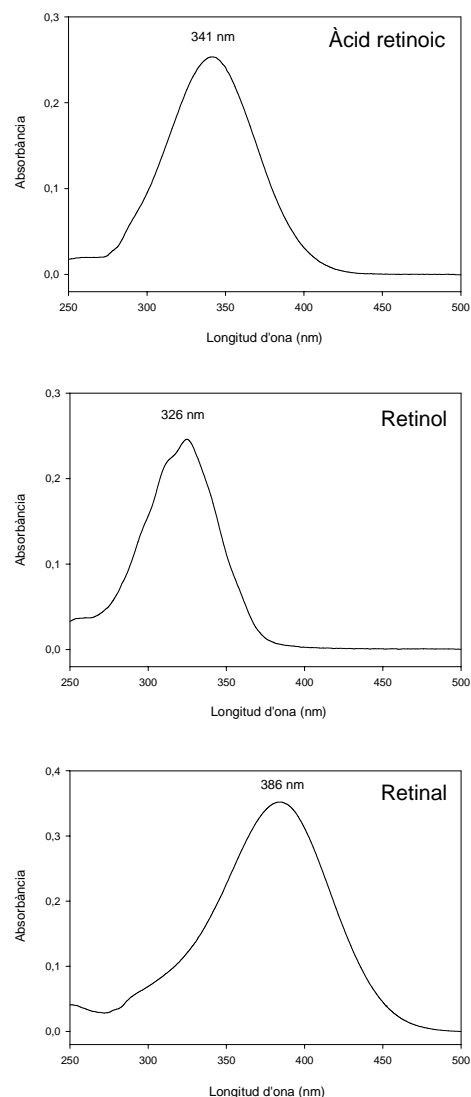


Figura 19

**Separació cromatogràfica dels tot-*trans*-retinoides**

(A) Cromatograma obtingut utilitzant una columna d'HPLC LiChrosorb RP-18 i la fase mòbil acetonitril i acetat amònic a l'1 % amb una proporció 77 : 23 a 1 ml/min. La detecció es realitza a 325 (—), a 340 (···) i a 380 nm (- -). (B) Espectres d'absorbància d'àcid tot-*trans*-retinoic, de tot-*trans*-retinol i de tot-*trans*-retinal.

Com a exemple del seguiment d'una reacció d'oxidació amb borhidruir sòdic, es presenten els cromatogrames obtinguts pels 11-*cis*-retinoides. Primer es va comprovar que el substrat de partida era pur, i no contenia altres retinoides (Figura 20A). A més, l'elució a un temps de retenció inferior al tot-*trans*-retinal indicava que es tractava realment d'un isòmer *cis* (Figura 20B). Després de la reacció, es va comprovar que l'11-*cis*-retinal s'havia reduït completament a 11-*cis*-retinol, que no quedava reactiu inicial en la solució obtinguda (Figura 21A), i que no contenia cap impuresa de tot-*trans*-retinol, que podria interferir en la interpretació dels resultats cinètics obtinguts (Figura 21B). Aquesta comprovació ens assegura la puresa dels substrats utilitzats en els estudis cinètics que s'han realitzat, i la seva correcta interpretació.

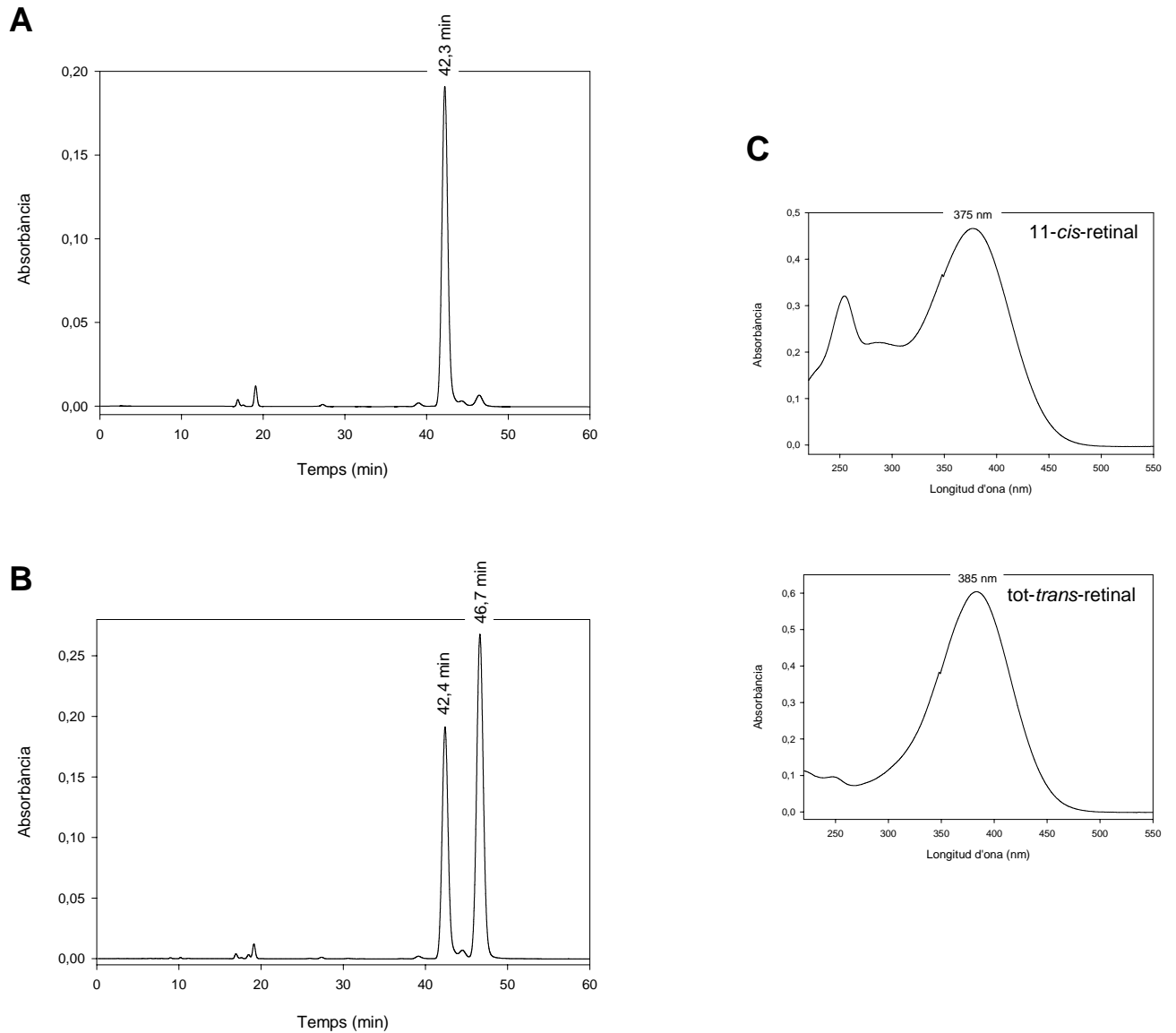


Figura 20

**Anàlisi de la puresa de l'11-cis-retinal abans de la reducció amb  $\text{NaBH}_4$** 

(A) Cromatograma d'una dissolució d'11-cis-retinal, sintetitzat pel grup de Vigo, obtingut a 340 nm, utilitzant una columna d'HPLC LiChrosorb RP-18 i la fase mòbil acetonitril i acetat amònic a l'1 % amb una proporció 77 : 23 a 1 ml/min. (B) En les mateixes condicions, separació cromatogràfica d'una barreja d'11-cis-retinal i de tot-trans-retinal. (C) Espectres d'absorbància de l'11-cis-retinal i del tot-trans-retinal.

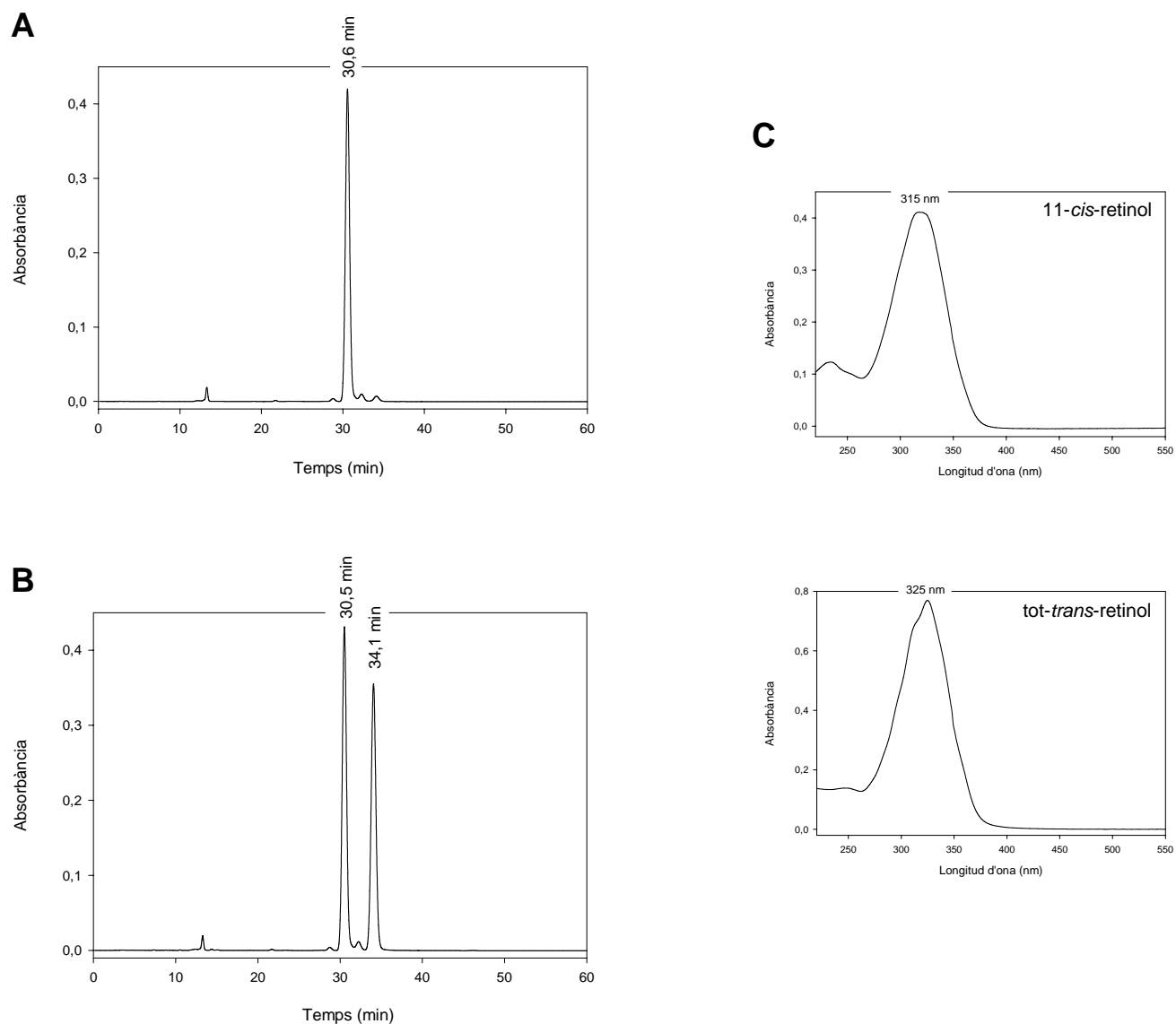


Figura 21

**Anàlisi de la puresa de l'11-cis-retinol obtingut per reducció de l'11-cis-retinal amb NaBH<sub>4</sub>**

(A) Cromatograma d'una dissolució d'11-cis-retinol, obtingut a 340 nm, utilitzant una columna d'HPLC LiChrosorb RP-18 i la fase mòbil acetonitril i acetat amònic a l'1 % amb una proporció 77 : 23 a 1 ml/min. (B) En les mateixes condicions, separació cromatogràfica d'una barreja de l'11-cis-retinol sintetitzat i de tot-trans-retinol. (C) Espectres d'absorbància de l'11-cis-retinol sintetitzat i del tot-trans-retinol.

## ESPECIFICITAT DE L'ADH AMB CIS-RETINOIDES

### Estudis cinètics

Les formes de retinol i retinal més estudiades fins el moment havien estat la tot-*trans* i les 9-*cis* i 13-*cis*, degut a que són comercials, excepte el 9-*cis*-retinol, que es sintetitza per reducció del 9-*cis*-retinal amb borhidruir sòdic (Allali-Hassani et al., 1998). La possibilitat d'obtenir els isòmers 11-*cis* i 7-*cis* del retinal i retinol, ens ha permès estudiar l'activitat d'aquests enzims amb retinoides de gran importància fisiològica (derivats 11-*cis*), i estudiar l'efecte de la isomerització de la cadena alifàtica del retinoide sobre l'activitat retinol deshidrogenasa i retinal reductasa. Així, hem determinat l'activitat amb tot-*trans*-, 9-*cis*- i 11-*cis*-retinol i retinal de les ADH humanes ADH1B1, ADH1B2 i ADH4, i dels enzims de ratolí ADH1 i ADH4 (Article I). A més, per a l'ADH4 humana, també hem determinat l'activitat amb els derivats 7-*cis*, que no són fisiològics, i amb els derivats 13-*cis* d'interès farmacològic (vegeu Taules 2 i 3 de l'Article I).

Totes les ADHs estudiades mostren una  $K_m$  d'entre 8 i 36  $\mu\text{M}$  per als retinols i de 4 a 28  $\mu\text{M}$  per als retinals (vegeu Taules 2 i 3 de l'Article I). Les ADH4 són les ADHs amb una major constant i eficiència catalítica, especialment per als 7 i 9-*cis*-retinoides i per a l'11-*cis*-retinol, mentre que les ADH1 mostren eficiències catalítiques més baixes, especialment l'ADH1B1 humana que presenta com a  $k_{\text{cat}}$  més elevada 1,8  $\text{min}^{-1}$  per al 9-*cis*-retinal (vegeu Taula 3 de l'Article I).

Si es compara l'eficiència catalítica de l'ADH4 humana per als diferents isòmers del retinol, es veu que l'activitat més alta correspon als isòmers 7-*cis*- i 9-*cis*-, l'activitat és molt baixa per al 13-*cis*-retinol, i els altres isòmers presenten una activitat intermitja (Figura 22). De la mateixa manera, l'activitat retinal reductasa més alta també la proporcionen els derivats 7-*cis*- i 9-*cis*-, essent més baixa per a l'11-*cis*-retinal. En els dos casos, els isòmers tot-*trans* del retinol i retinal presenten una eficiència catalítica intermitja, aproximadament tres vegades menor que l'obtinguda per als derivats 7-*cis*- i 9-*cis*- (Figura 22). La disminució considerable de l'eficiència catalítica per a l'11-*cis*-retinal en comparació al 9-*cis*-retinal (Figura 22) també s'observa per a l'ADH4 de ratolí, i amb menys proporció per a les ADH1 (vegeu Taula 3 de l'Article I).

D'altra banda, una comparació de les constants cinètiques  $k_{\text{cat}}$  i  $k_{\text{cat}}/K_m$  entre les ADH estudiades, indica que per a les ADH1, la reacció de reducció i oxidació dels 11-*cis*-retinoides és similar, amb una lleugera preferència per l'activitat 11-*cis*-retinol deshidrogenasa sobre la reducció de l'11-*cis*-retinal, mentre que per a l'ADH4 l'activitat 11-*cis*-retinol deshidrogenasa està afavorida aproximadament 8-10 vegades (Figura 23). Per tant, tot i que totes les ADHs tenen activitat amb els 11-*cis*-retinoides, l'ADH4 mostra una especificitat notable per a l'oxidació de l'11-*cis*-retinol sobre la reducció de l'11-*cis*-retinal.

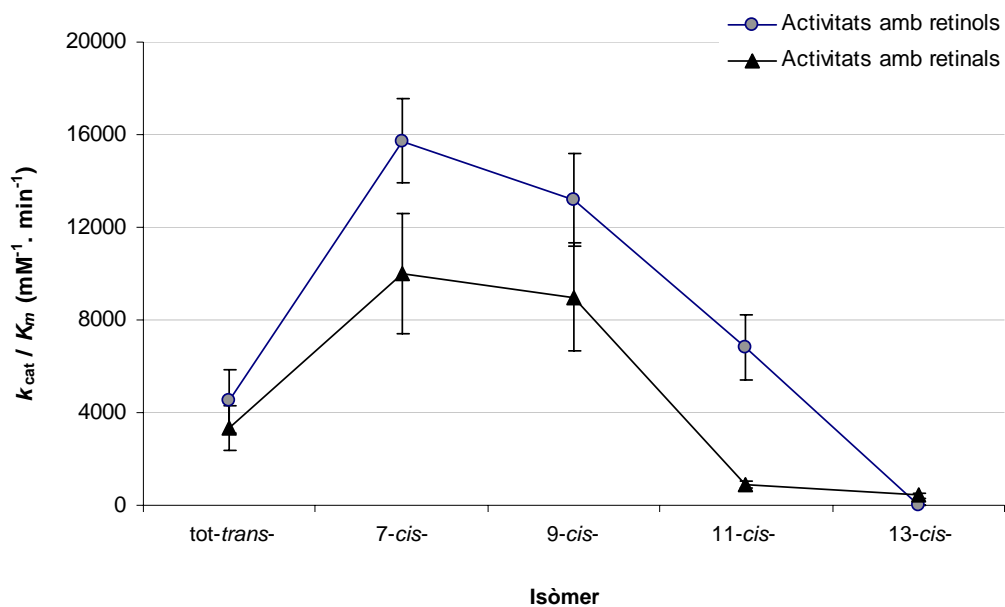


Figura 22

**Activitat de l'ADH4 humana amb diferents isòmers de retinol i retinal**

A pH 7,5, l'ADH4 humana presenta una activitat màxima amb els isòmers 7-*cis*-, seguida dels isòmers 9-*cis*-, tant per als retinols com per als retinals. L'activitat per als isòmers 11-*cis*- disminueix tant per als retinols com per als retinals, però s'observa una diferència molt significativa entre l'eficiència catalítica per l'11-*cis*-retinal i l'11-*cis*-retinol.

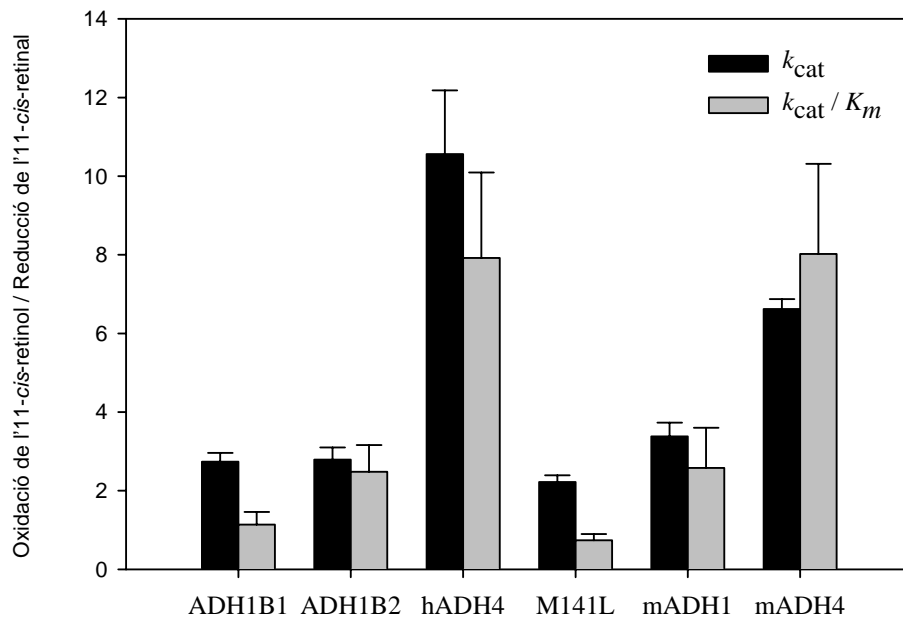


Figura 23

**Especificitat relativa de les diferents ADHs estudiades amb l'11-*cis*-retinol i l'11-*cis*-retinal**

Les dades cinètiques s'han obtingut de les Taules 2 i 3 presentades en l'Article I.

Els retinoides són compostos especialment làbils, sobretot en solucions aquoses (Noy, 1999). Per comprovar que en la determinació de l'activitat enzimàtica la variació d'absorbància no era deguda, almenys en part, a la degradació del retinoide per efecte de la llum de l'espectrofotòmetre, es va fer incidir una llum de 400 nm de longitud d'ona sobre una solució d'11-*cis*-retinal durant 30 min a 25 °C (Figura 24). L'espectre d'absorbància enregistrat a l'inici de l'experiment i l'espectre final van resultar idèntics. Per tant, les variacions en l'absorbància observades en els experiments cinètics són degudes únicament al canvi químic catalitzat per l'ADH.

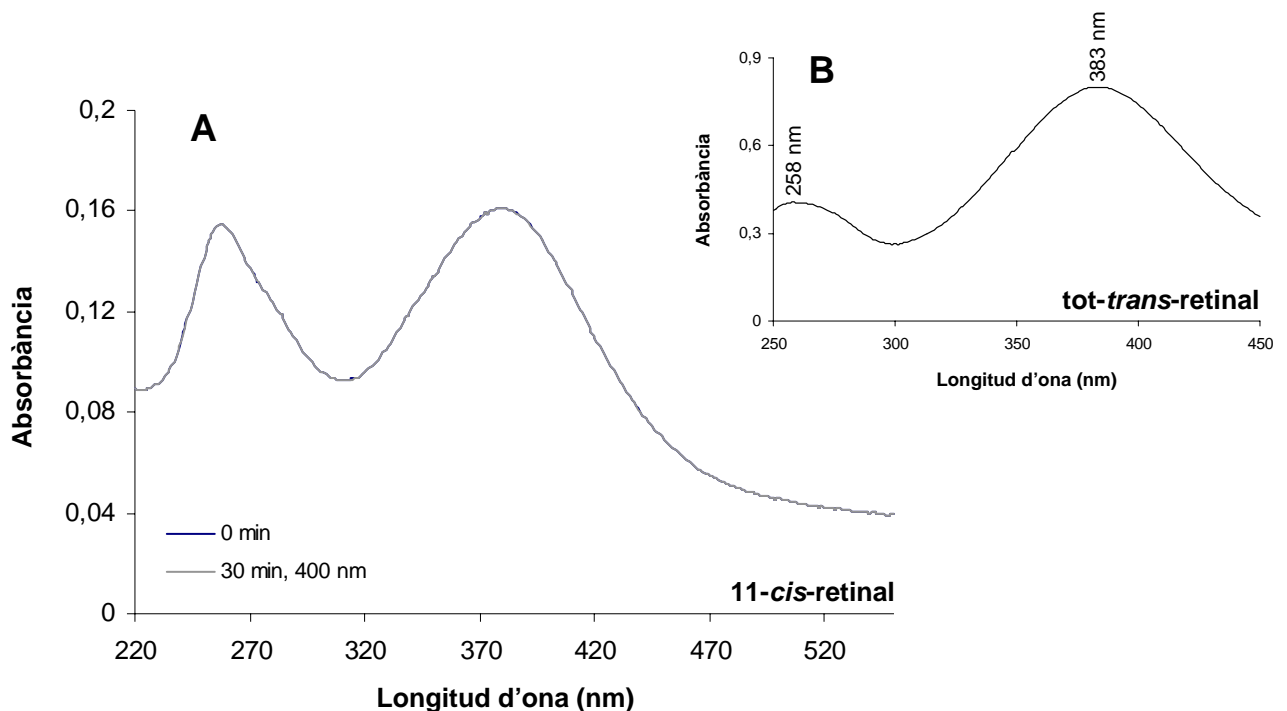


Figura 24

#### Estabilitat de l'11-*cis*-retinal en les condicions de l'assaig enzimàtic

Es va preparar una solució d'11-*cis*-retinal en la cubeta de l'espectrofotòmetre. A temps 0, es va determinar l'espectre d'absorbància (A), i durant 30 min es va fer incidir llum de 400 nm. Passat aquest temps, no es va detectar cap variació en l'espectre de l'11-*cis*-retinal, i per tant, no es van observar indicis de reaccions redox espontànies ni d'isomerització a altres retinoides com el tot-*trans*-retinal (B).

#### Estudis estructurals

Per conèixer la base estructural de l'especificitat de l'ADH4 per l'11-*cis*-retinol, es va procedir a fer estudis de modelatge molecular a partir de l'estructura cristal·logràfica de l'ADH4 humana unida a NAD<sup>+</sup> o NADH i la seva interacció amb tot-*trans*-, 9-*cis*- i 11-*cis*-retinols i retinals (vegeu Figures 1 i 2 de l'Article I).

Els resultats obtinguts del *docking* de l'ADH4 amb els diferents retinoides van recolzar els resultats experimentals, en el sentit que tots els substrats, excepte l'11-*cis*-retinal, es posicionen correctament dins del centre catalític, a una distància del Zn catalític menor de 3,16 Å. A més, també per a tots els substrats excepte per a l'11-*cis*-retinal, l'oxigen funcional i el carboni C4 de l'anell de nicotinamida també es situen a

una distància apropiada per a la transferència d'hidrur, menor a 4,83 Å. El posicionament inadequat de l'11-*cis*-retinal dins el túnel hidrofòbic de l'ADH4 explicaria les diferències cinètiques observades entre l'11-*cis*-retinal i l'11-*cis*-retinol (vegeu Figura 1 i Taules 2 i 3 de l'Article I).

També es va fer el docking de l'ADH1B1 humana amb tot-*trans*-, 9-*cis*- i 11-*cis*-retinoides (vegeu Figura 2 de l'Article I), i en tots els casos el retinoide es va posicionar correctament. Es va observar, però, que la zona mitjana del túnel hidrofòbic de l'ADH pot ser clau per definir aquestes diferències d'activitat. L'ADH4 presenta dues Met en les posicions 57 i 141 en aquesta zona, que és més estreta que la de l'ADH1, que hi presenta dues Leu. El doble enllaç 11-*cis*- del retinoide es situa just en aquesta zona del túnel hidrofòbic, cosa que no representa cap impediment estèric per a l'ADH1, però sí que el representaria per a l'ADH4 (vegeu Figura 2 de l'Article I). Per recolzar aquesta hipòtesi, es va procedir a fer un *docking* amb l'estructura del mutant M141L de l'ADH4 humana i l'11-*cis*-retinal. Aquest únic canvi de residu en la posició 141 va ser suficient per a que l'11-*cis*-retinal es situés a una distància del Zn menor que la que ho fa en l'ADH4, indicant que l'amplada d'aquesta zona del túnel hidrofòbic és essencial per a la correcta posició dels 11-*cis*-retinoides en l'ADH.

El mutant M141L de l'ADH4 humana va ser clonat, expressat i purificat (Article I). La seva caracterització cinètica amb els 11-*cis*-retinoides va recolzar les conclusions obtingudes per modelatge molecular. Així, el canvi en la posició 141 de Met a Leu fa que l'enzim tingui una eficiència catalítica similar tant per a l'11-*cis*-retinol com per a l'11-*cis*-retinal (Figura 23), tal com succeeix a les ADH1, confirmant que els aminoàcids de la regió mitjana del túnel hidrofòbic són essencials per determinar les propietats observades per a l'ADH1 i l'ADH4 en el metabolisme dels 11-*cis*-retinoides. Aquesta diferència entre l'ADH1 i l'ADH4 en el túnel hidrofòbic explica també altres característiques de les ADHs. Així, l'ADH4 presenta una  $K_i$  per al 4-metilpirazole 600 vegades més alta que l'ADH1. En contrast, el mutant ADH4 M141L presenta valors de  $K_i$  comparables als de l'ADH1, indicant que el canvi M141L disminueix l'impediment estèric sobre aquest inhibidor competitiu (Xie and Hurley, 1999).

A més de l'amplada del túnel hidrofòbic de l'ADH4, l'estructura de l'11-*cis*-retinal també resulta clau per definir l'elevada preferència de l'enzim per l'11-*cis*-retinol sobre l'11-*cis*-retinal. L'11-*cis*-retinal es caracteritza per una estructura peculiar, amb una torsió de la molècula, única entre els diferents isòmers de retinal i retinol incloent l'11-*cis*-retinol. Els electrons  $\pi$  de la cadena alifàtica dels retinoides estan deslocalitzats i s'estabilitzen per ressonància de l'estructura poliènica. D'aquesta manera, els enllaços simples adquireixen caràcter de doble enllaç i al revés, els enllaços dobles adquireixen cert caràcter d'enllaç simple. El sistema d'electrons  $\pi$  presentaria una estructura planar en absència d'impediments estèrics, però pot presentar torsions i ser no-planar al voltant d'enllaços simples quan hi ha posicions de la cadena poliènica substituïdes, per exemple, amb grups metil com és el cas dels retinoides. Així, l'anàlisi per raigs-X de cristalls de tot-*trans*-retinal indica que la cadena C6-O16 és plana, però l'enllaç C6-C7 és no-planar amb una torsió de 59° (Shichi, 1983, Figura 25). En l'11-*cis*-retinal, la lliure rotació al voltant de l'enllaç C12-C13 està impossibilitada per l'impediment estèric que es crea entre l'hidrogen del C10 i el grup metil del C13, de manera que es crea una torsió al voltant de l'enllaç C12-C13 de 39° desde l'estructura planar teòrica (Shichi, 1983, Figura 25). La diferència del comportament entre l'11-*cis*-retinal i l'11-*cis*-retinol es pot explicar si tenim en compte que l'impediment estèric entre els grups del C10 i el C13 pot ser més acusat en el retinal, ja que el doble enllaç del grup carbonil també forma part del sistema  $\pi$  de la cadena alifàtica, mentre que en

el cas dels alcohols això no és possible. D'aquesta manera, la llargada mitjana dels enllaços de la cadena poliènica a partir del C11 fins l'oxigen, seria més curta en el retinal que en el retinol, cosa que afectaria a la distància al Zn catalític. Aquest fet explicaria les diferents propietats cinètiques de l'ADH4 per l'11-*cis*-retinol i l'11-*cis*-retinal (vegeu Figura 2 de l'Article I).

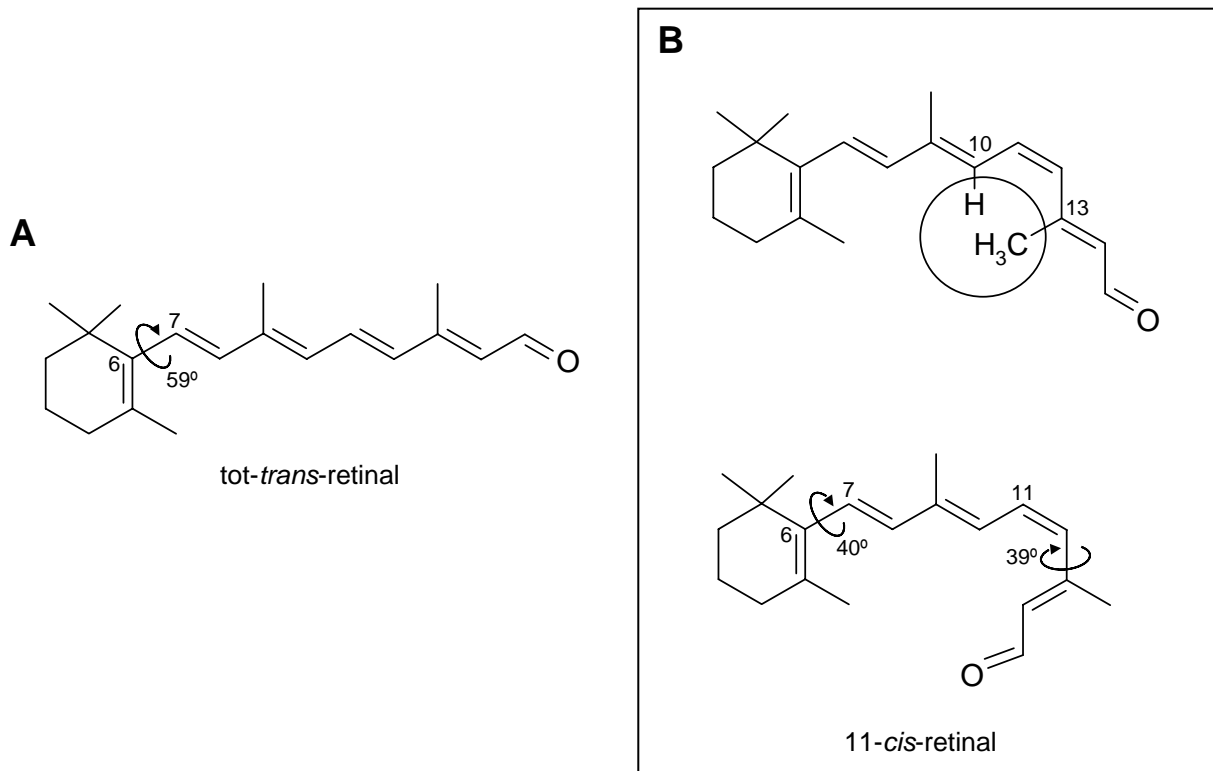


Figura 25

**Estructura química del tot-*trans*- i l'11-*cis*-retinal**

L'enllaç C6-C7 presenta una torsió de 59° en el tot-*trans*-retinal (A), i de 40° en l'11-*cis*-retinal (B). L'hidrogen situat en el C10 i el grup metil del C13 en l'11-*cis*-retinal provoquen un impediment estèric que impossibilita una rotació lliure al voltant de l'enllaç C12-C13 (B, figura superior), de manera que l'estructura de l'11-*cis*-retinal presenta una torsió en aquest punt de la cadena (B, figura inferior).

En el RPE, l'11-*cis*-retinol és oxidat a 11-*cis*-retinal per l'11-*cis*-retinol deshidrogenasa (RDH5, un enzim SDR), que es creia que era essencial per fer aquesta reacció perquè mutacions en el seu gen causen el desordre *fundus albipunctatus* en humans (Figura 14, McBee et al., 2001). Estudis amb ratolins *knockout* per a aquest gen, però, han demostrat que els animals tenen una visió normal, encara que s'observa una acumulació d'esters d'11-*cis*- i de 13-*cis*-retinol en l'ull (Driessen et al., 2000). Això vol dir que existeixen altres enzims que són capaços de realitzar la mateixa funció que la RDH5 en l'epiteli pigmentat de la retina (RPE). Malgrat que s'han localitzat altres RDH capaces de fer aquesta reacció (Haeseleer et al., 2002), l'especificitat de l'ADH4 com a 11-*cis*-retinol deshidrogenasa i la seva localització en el RPE (Article I), suggereixen que l'ADH4 també hi pot tenir una contribució (Figura 26).



L'ADH4 també pot estar implicada en altres reaccions del cicle visual en el RPE. Podria actuar com a tot-*trans*-retinol deshidrogenasa, per proporcionar tot-*trans*-retinal a la proteïna G de retina acoblada a receptor (RGR, Figura 26), una isomerasa que pot convertir el tot-*trans*-retinal a 11-*cis*-retinal per acció de la llum (Chen et al., 2001). A més, l'ADH4 podria proporcionar el tot-*trans*-retinal per a la síntesi de l'àcid retinoic, ja que també s'ha localitzat receptor d'àcid retinoic al RPE (Fischer et al., 1999, Figura 26), necessari com a altres teixits, per al manteniment epitelial.

L'ADH4 també s'ha localitzat en moltes capes cel·lulars de la retina neuronal (Article I). La seva funció podria ser de tot-*trans*-retinol deshidrogenasa, intervenint en la síntesi de l'àcid retinoic necessari per al desenvolupament de l'ull (McCaffery et al., 1999, Fischer et al., 1999) i per a la transmissió del senyal neuronal (Weiler et al., 2000). En aquest teixit, també podria actuar com a 11-*cis*-retinol deshidrogenasa. En les capes neuronals de la retina no s'hi localitza la RDH5 (Cideciyan et al., 2000), però l'11-*cis*-retinal és necessari per a la regeneració dels fotopigments dels cons (Mata et al., 2002). Aquesta es realitza de forma diferent a la dels bastons, amb la intervenció de les cèl·lules de Müller, el citoplasma de les quals es distribueix al llarg de totes les capes neuronals de la retina. Finalment, l'ADH4 també podria participar en la regeneració de l'11-*cis*-retinal de les cèl·lules fotosensibles situades en la capa de cèl·lules ganglionars de la retina (GCL, vegeu Figura 3 de l'Article I), que formen part del rellotge circadià (Berson et al., 2002).

La còrnia és l'òrgan de la rata amb l'activitat específica ADH4 més gran. Utilitzant tècniques d'immunohistoquímica, s'ha localitzat l'ADH4 en l'epiteli i en l'endoteli de la còrnia, però no en l'estroma (Figura 27, Article III). L'ADH4 podria intervenir en la producció d'àcid retinoic, necessari per a la regeneració i el manteniment dels epitelis. D'altra banda, la localització de l'ADH4 en epitelis exteriors com a l'epiteli de la còrnia, així com en l'epiteli del tracte digestiu (Vaglenova et al., 2003), suggereix una funció addicional de primera barrera contra alcohols i aldehids exògens. En la còrnia, també s'hi ha localitzat l'aldehid deshidrogenasa ALDH3A1 (Pappa et al., 2003). S'ha postulat que l'ALDH3A1 pot tenir un paper de defensa per protegir l'epiteli corneal contra la radiació UV i en l'eliminació del 4-hidroxinonenal, producte citotòxic derivat de la peroxidació lipídica (Pappa et al., 2003). L'ALDH3A1 i l'ADH4 podrien tenir una funció complementària, ja que les dues colocalitzen tant en la còrnia com en àrees del tracte digestiu (Parés i Farrés, 1996), i mentre que l'ALDH3A1 oxida el 4-hidroxinonenal, l'ADH4 presenta una alta activitat de reducció d'aquest compost (Boleda et al., 1993, Allali-Hassani et al., 1998).

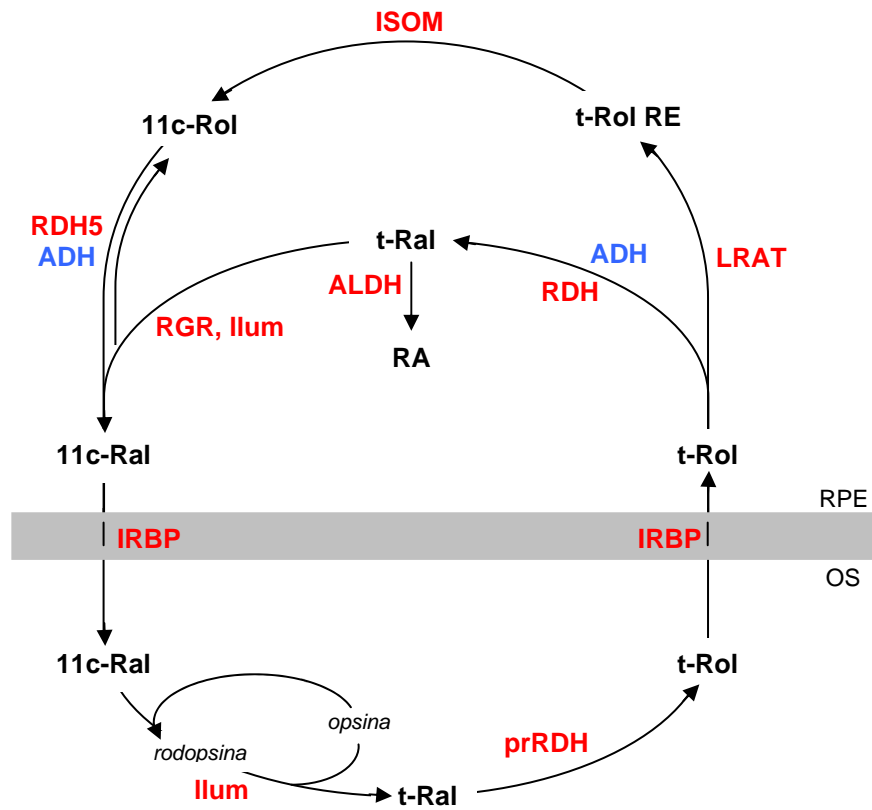


Figura 26

**El cicle visual i reaccions al RPE amb possible participació de l'ADH**

El cicle visual de la Figura 14, ha estat aquí modificat per introduir les reaccions on podria participar l'ADH. L'ADH podria generar 11-*cis*-retinal a partir de l'11-*cis*-retinol i intervenir en la generació de tot-*trans*-retinal a partir de tot-*trans*-retinol, que s'utilitzaria com a substrat de la RGR per generar 11-*cis*-retinal o per produir àcid retinoic. OS, segment exterior de les cèl·lules fotoreceptores; RPE, epiteli pigmentat de la retina; IRBP, proteïna unidora de retinol/retinal de l'espai interfotoreceptor; 11c-Ral, 11-*cis*-retinal; t-Ral, tot-*trans*-retinal; 11c-Rol, 11-*cis*-retinol; t-Rol, tot-*trans*-retinol; t-Rol RE, ester de tot-*trans*-retinol; RA, àcid retinoic; prRDH, RDH5, RDH, retinol deshidrogenases de cadena curta; ISOM; isomerohidrolasa; RGR, proteïna G de retina acoblada a receptor; ADH, alcohol deshidrogenasa; ALDH, aldehyd deshidrogenasa.

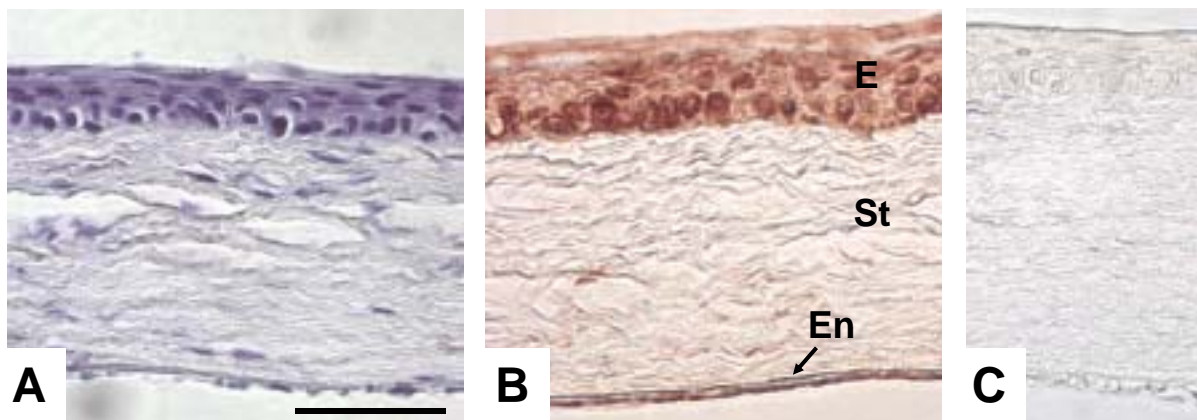


Figura 27

**Localització de l'ADH4 en la còrnia de rata per immunohistoquímica**

(A) Secció tenyida per hematoxilina. (B) Immunolocalització de l'ADH4. ADH4 es detecta a l'epiteli de la còrnia (E) i en l'endoteli (En), però no en l'estroma (St). (C) Tinció de control amb anticossos anti-ADH4 prèviament incubats amb ADH4. La barra de calibració (100 µm) a A s'aplica també a B i C.

## ESPECIFICITAT DE L'ADH AMB RETINOIDES OXIDATS EN L'ANELL

A banda de l'oxidació/reducció del grup funcional, els retinoides pateixen altres reaccions, com l'oxidació del C4 de l'anell de ciclohexè. Malgrat que són compostos fisiològics, el metabolisme i funció dels retinoides oxidats en l'anell, com els 4-oxo, 4-hidroxi i 3,4-dideshidroretinoides són poc coneguts. En alguns casos aquests compostos oxidats formen part de la via de degradació dels retinoides, però en altres casos són compostos bioactius (Figura 11).

Així, el tot-*trans*-4-oxo-retinol, el tot-*trans*-4-oxo-retinal, l'àcid tot-*trans*-4-oxo-retinoic i l'àcid tot-*trans*-4-hidroxi-retinoic poden interaccionar amb els receptors RAR (Pijnappel et al., 1993, Ackhar et al., 1996, Blumberg et al., 1996, Idres et al., 2002). S'ha demostrat que els 4-oxo-retinoides són els retinoides bioactius predominants en el desenvolupament de *Xenopus* i en les cèl·lules troncales embrionàries de ratolí (Blumberg et al., 1996, Lane et al., 1999), i a més, poden induir la inhibició del creixement i la diferenciació de moltes línies cel·lulars com les cèl·lules F9 de teratocarcinoma (Achkar et al., 1996), les cèl·lules humanes de càncer de mama (Chen et al., 1997) o les cèl·lules humanes NB4 de leucèmia promielocítica (Faria et al., 1998).

Hem determinat les constants cinètiques amb 4-hidroxi-retinol i 4-oxo-retinal per a les ADHs humanes ADH1B1, ADH1B2 i ADH4 i per als enzims de ratolí ADH1 i ADH4 (Taula 7, Article II). Si comparem els valors de  $k_{cat}$  del tot-*trans*-4-hidroxi-retinol i del tot-*trans*-4-oxo-retinal amb els retinoides corresponents no oxidats tot-*trans*-retinol i retinal respectivament, trobem un augment de l'activitat d'entre 3 i 40 vegades, depenent del substrat i de l'enzim. Els valors de  $K_m$ , en canvi, són similars i l'eficiència catalítica augmenta d'entre 4 i 60 vegades per als compostos oxidats. Les ADH4, tant la humana com la de ratolí, són més actives per al 4-hidroxi-retinol i el 4-oxo-retinal que l'ADH1. Així, la velocitat i eficiències catalítiques determinades per a aquests substrats són les més altes que mai s'han determinat per a qualsevol retinoide i per a qualsevol ADH. En general, els retinoides presenten unes constants catalítiques baixes en comparació als alcohols alifàtics (Allali-Hassani et al., 1998, Crosas et al., 2000), però aquest no és el cas del 4-hidroxi-retinol i el 4-oxo-retinal, que les presenten semblants (Article II). Aquest fet suggereix que aquests retinoides poden tenir un pas limitant de la reacció comú al dels alcohols alifàtics i diferent a la resta de retinoides. Així, els retinoides oxidats i els alcohols alifàtics tindrien com a pas limitant la dissociació del coenzim reduït. En contrast, s'ha proposat que per als retinoides no oxidats el pas limitant seria la dissociació del propi retinoide producte de la transformació enzimàtica, un pas que seria més lent que la dissociació del coenzim (Plapp et al., 2001). És possible que el caràcter més polar dels retinoides oxidats faciliti la dissociació del producte, i aquesta deixi de ser l'etapa limitant.

Diverses isoformes del citocrom P450 poden oxidar l'anell de ciclohexè del retinol (Leo et al., 1989, Lane et al., 1999) i de l'àcid retinoic (Blaner et al., 1999), però no s'havia identificat fins ara cap enzim que oxidés retinols oxidats en l'anell als corresponents àcids retinoics. L'alta activitat de l'ADH amb el 4-hidroxi-retinol i el 4-oxo-retinal, i l'àmplia distribució en teixits de l'ADH1 i l'ADH4, permeten postular una possible via metabòlica a través de l'ADH que donaria lloc a la producció d'àcids retinoics oxidats en la posició C4 a partir dels corresponents retinols (Figura 28).

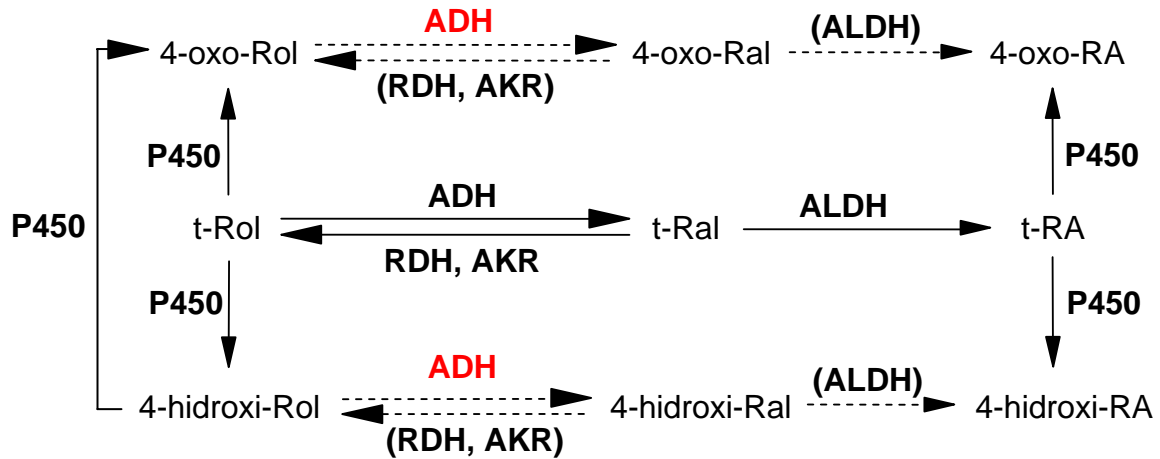


Figura 28

**Via metabòlica dels 4-oxo i 4-hidroxi-retinoides**

Dues possibles vies metabòliques (fletxes discontinües) podrien portar a l'obtenció dels àcids 4-oxo i 4-hidroxi-retinoic a partir del 4-oxo i el 4-hidroxi-retinol, respectivament, per intervenció de l'ADH. Rol, retinol; Ral, retinal; RA, àcid retinoic; t, tot-*trans*-. Entre parèntesi, enzims per als que no s'ha confirmat encara la participació en el pas corresponent.

Uns altres retinoides oxidats en l'anell de ciclohexè són el 3,4-dideshidroretinoides o derivats de la vitamina A<sub>2</sub>, que s'han detectat en totes les famílies de vertebrats i que poden realitzar varies funcions. Els vertebrats terrestres i marins tenen pigments visuals basats en 11-*cis*-retinal, però els peixos d'aigua dolça i els capgrossos d'amfibi tenen pigments visuals basats en 11-*cis*-3,4-dideshidroretinal, que s'isomeritza a tot-*trans*-3,4-dideshidroretinal per efecte de la llum (Suzuki et al., 1984). Els peixos migratoris canvien de cromòfor de retinal a 3,4-dideshidroretinal al moure's del mar a un ambient d'aigua dolça, i de la mateixa manera, els amfibis canvien de cromòfor durant la metamorfosi (Suzuki et al., 1984). També s'ha detectat 3,4-dideshidroretinol en el cristal·lí d'alguns llargardaixos diürns sense parpelles, on tindria una funció de fotoprotecció (Werten et al., 2000). D'altra banda, els 3,4-dideshidroretinoides són molècules característiques de la pell, on tot i que es sap que l'àcid 3,4-dideshidroretinoic pot interaccionar amb els RAR, tenen una funció poc coneguda, que podria estar relacionada amb la regulació del desenvolupament i diferenciació cel·lular (Repa et al., 1996).

Tant l'ADH1 (ADH1B2 humana i l'ADH1 de ratolí), com l'ADH4 (ADH4 humana) són actives amb els 3,4-dideshidroretinoides, amb unes constants catalítiques comparables a les obtingudes per al tot-*trans*-retinol i el tot-*trans*-retinal (Taula 7, vegeu Taula 1 de l'Article II). Per tant, un doble enllaç situat a l'anell de ciclohexè del retinoide, entre el C3 i el C4, no afecta l'activitat de l'ADH. Per a aquests retinoides l'ADH4 també és més activa que l'ADH1 (Taula 7, vegeu Taula 1 de l'Article II).

Degut a l'àmplia distribució dels 3,4-dideshidroretinoides, i a que l'ADH1 és un enzim present en la majoria de vertebrats i l'ADH4 en mamífers, l'ADH podria ser un enzim clau en el metabolisme d'aquests retinoides, ja que podria donar lloc a 3,4-dideshidroretinal i àcid 3,4-dideshidroretinoic a partir de l'alcohol (Figura 29).

En la pell humana, el 30% del total del contingut de retinoides són 3,4-dideshidroretinoides. No se'n coneix exactament la funció, però en la pell existeix un metabolisme complex de retinoides. Així, les capes superiors de la pell, formades per queratinòcits diferenciats, acumulen retinol, esters de retinol i esters de

3,4-dideshidroretinol, mentre que el 3,4-dideshidroretinol es distribueix de manera similar en totes les capes (Siegenthaler et al., 1990a). El 3,4-dideshidroretinol es forma *in situ*, en una reacció irreversible a partir del tot-*trans*-retinol provinent del plasma. A més, pot interaccionar amb la proteïna citosòlica unidora de retinol (CRBP), també present en la pell, però aquest complex no pot ser oxidat a àcid 3,4-dideshidroretinoic (Boerman and Napoli, 1995). L'àcid 3,4-dideshidroretinoic tampoc es pot produir a partir de l'àcid tot-*trans*-retinoic (Karlsson et al., 2003). D'altra banda, existeix una activitat retinol deshidrogenasa que es concentra en les capes inferiors de la l'epidermis i una activitat retinal deshidrogenasa que s'hi distribueixen per totes les capes (Siegenthaler et al., 1990a, Siegenthaler et al. 1990b). L'ADH4 s'ha detectat tant a nivell de mRNA com de proteïna a la capa basal de l'epidermis (Haselbeck et al., 1997, Handschin et al., 1997, Cheung et al., 1999), i per tant, podria ser l'enzim responsable de la producció d'àcid 3,4-dideshidroretinoic de la pell, a través de la formació de 3,4-dideshidroretinal. L'àcid 3,4-dideshidroretinoic, però, no s'ha trobat *in vivo*, però sí en cultius de queratinòcits (Randolph and Simon, 1995). Això podria ser degut a un problema de detecció, perquè en aquests cultius també s'ha detectat àcid tot-*trans*-retinoic, a una concentració superior a la detectada *in vivo* (Randolph and Siegenthaler, 1999).

Els teixits epitelials, incloent l'epidermis, requereixen una quantitat crítica de vitamina A, ja que una concentració superior o inferior resulta en una diferenciació anormal dels queratinòcits (Asselineau et al., 1989). A més, la deficiència de vitamina A causa hiperqueratinització, i els retinoides s'utilitzen per tractar desordres de la pell com l'acne i la psoriasi. L'estudi del metabolisme de retinoides en la pell és important per millorar el coneixement d'aquests desordres i poder proporcionar nous tractaments. L'ADH1 i l'ADH4, les dues presents en l'epidermis (Haselbeck et al., 1997, Handschin et al., 1997, Cheung et al., 1999), poden ser peces clau d'aquest metabolisme, gràcies a la seva participació en la via de formació de l'àcid tot-*trans*-retinoic i també de l'àcid 3,4-dideshidroretinoic (Figura 29).

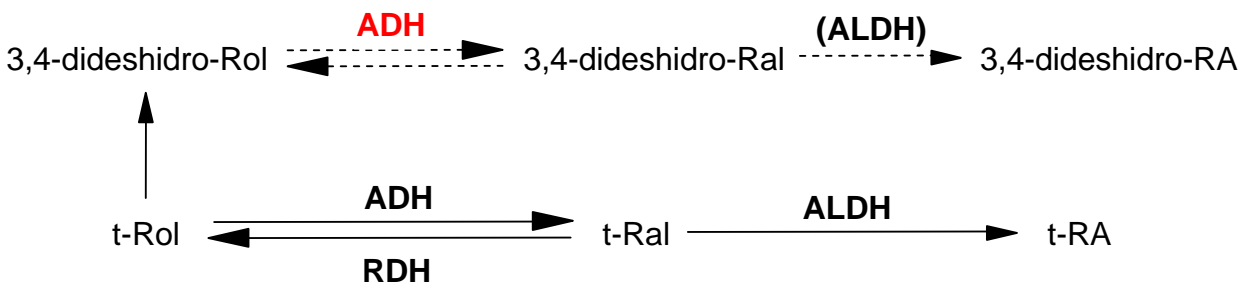


Figura 29

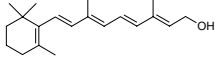
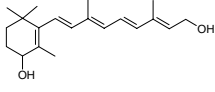
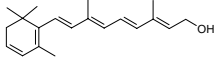
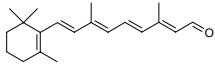
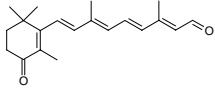
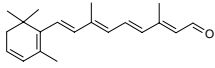
**Via metabòlica dels 3,4-dideshidroretinoides**

Una possible via metabòlica (fletxes discontinuades) podria portar a l'obtenció de l'àcid 3,4-dideshidroretinoic a partir del 3,4-dideshidroretinol per intervenció de l'ADH. Rol, retinol; Ral, retinal; RA, àcid retinoic; t, tot-*trans*-. Entre parèntesi, enzim pel que no s'ha confirmat encara la participació en el pas corresponent.

Taula 7

**Constants cinètiques de les ADHs amb retinoides oxidats en l'anell**

Les activitats es van determinar en fosfat de sodi 0,1 M, pH 7,5, Tween-80 0,02 %, utilitzant NAD<sup>+</sup> 2,4 mM (0,3 mM per a l'ADH1 de ratolí) per a l'oxidació de retinol, o NADH 1 mM (0,77 mM per a l'ADH4 humana) per a la reducció de retinal, a 25 °C. Els resultats s'expressen com la mitjana ± S.E.M d'almenys tres determinacions independents. N.D., no determinat.

		Humà			Ratolí	
		ADH1B1	ADH1B2	ADH4	ADH1	ADH4
tot- <i>trans</i> -retinol 	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	30 ± 8	33 ± 9	15 ± 4*	31 ± 5	23 ± 4
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	1,7 ± 0,1	15 ± 1	67 ± 10*	55 ± 3	125 ± 5
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	57 ± 16	460 ± 130	4500 ± 1370*	1775 ± 300	5480 ± 990
4-hidroxi-retinol 	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	4 ± 1	11 ± 2	15 ± 3	2,6 ± 0,2	23 ± 3
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	5,5 ± 0,5	170 ± 20	2050 ± 250	138 ± 3	1950 ± 83
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	1400 ± 370	15200 ± 3300	136000 ± 31700	53080 ± 4245	84830 ± 11640
3,4-dideshidroretinol 	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	N.D.	24 ± 5	28 ± 7	32 ± 4	N.D.
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )		5,3 ± 0,4	150 ± 14	108 ± 4	
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )		220 ± 50	5400 ± 1400	3375 ± 450	
tot- <i>trans</i> -retinal 	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	11 ± 2	12 ± 3	34 ± 6*	9,3 ± 1,1	11 ± 2
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	1,1 ± 0,1	33 ± 3	110 ± 25*	19 ± 1	33 ± 2
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	100 ± 20	2800 ± 750	3300 ± 960*	2045 ± 265	3000 ± 525
4-oxo-retinal 	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	25 ± 3	27 ± 5	17 ± 4	6,8 ± 1,4	N.D.
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	10 ± 1	470 ± 70	1200 ± 140	119 ± 11	
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	400 ± 60	17480 ± 4200	68200 ± 18000	17500 ± 3950	
3,4-dideshidroretinal 	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	N.D.	25 ± 6	26 ± 6	16 ± 4	N.D.
	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )		13 ± 1	73 ± 5	23 ± 2	
	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )		520 ± 130	2800 ± 700	1440 ± 380	

\* Dades obtingudes de la referència Allali-Hassani et al., 1998.

## EFECTE DE LA PRESENCIA DE TWEEN 80 EN LES CONSTANTS CINÈTIQUES DE L'ADH AMB RETINOIDES

Degut al caràcter hidrofòbic dels retinoides, es necessita un agent solubilitzador per poder mesurar l'activitat catalítica de l'ADH amb aquests compostos, la qual es determina en medi aquós. El Tween 80 (ester monooleat de polioxietilè sorbità), un detergent no iònic i no desnaturitzant (Figura 30), ha estat un dels agents més utilitzats en el nostre grup d'investigació i en d'altres (Article II). Es sap, però, que el Tween 80 causa inhibició de l'activitat ADH amb retinoides, però no afecta a les cinètiques amb etanol o acetaldehid (Zachman et al., 1961, Parés i Julià, 1990).

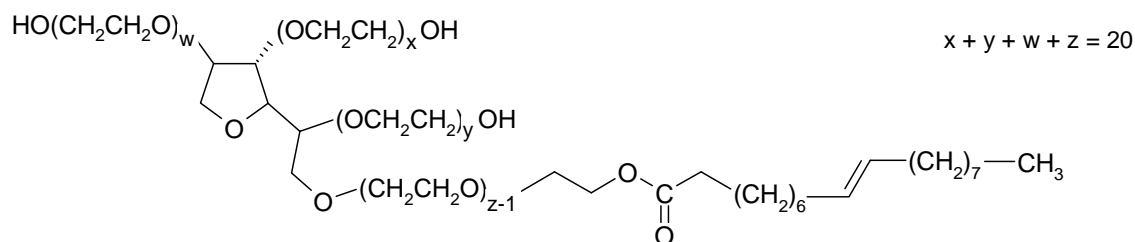


Figura 30  
Estructura del Tween 80

La determinació de l'activitat enzimàtica de les deshidrogenases/reductases de cadena curta (SDR), es realitza generalment en medi aquós, utilitzant l'enzim parcialment purificat a partir d'una preparació microsomal. La presència de lípids provinents de membrana ajuda a dissoldre els retinoides, i per tant, no és necessària la utilització de Tween 80 en els assajos cinètics. És difícil, doncs, comparar els resultats cinètics obtinguts amb les ADHs i les SDRs, ja que la metodologia que s'utilitza és diferent. Per investigar l'efecte del Tween 80 sobre l'activitat ADH i sobre les seves constants cinètiques amb els retinoides, hem determinat les constants cinètiques de l'ADH4 humana amb el tot-*trans*-retinol a diferents concentracions de detergent (Article II). Es va observar que els valors de  $k_{cat}$  no estaven influenciats pel detergent, a concentracions entre 0,001 i 0,1 %, però la  $K_m$  del tot-*trans*-retinol es veia fortament afectada: a baixes concentracions de Tween 80, menors que la concentració de 0,02 % utilitzada habitualment, la  $K_m$  disminueix de forma considerable, la qual cosa fa augmentar l'eficiència catalítica de l'enzim fins a 15750  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  a Tween 80 0,001 % (2300  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  a Tween 80 0,02 %). En canvi, es va comprovar que la presència de Tween 80, entre 0 i 0,5 %, no provoca cap canvi ni en la  $k_{cat}$  ni en la  $K_m$  de l'ADH4 amb etanol. La inhibició de l'activitat retinol deshidrogenasa provocada pel Tween 80 segueix un patró d'inhibició competitiva (vegeu Figura 2 de l'Article II), amb una  $K_i$  de 0,0019 %. La  $K_m$  teòrica a 0 % de Tween 80 seria de 2,4  $\mu\text{M}$ , 10 vegades més baixa que els valors habituals determinats a 0,02 % de Tween 80. Així, en absència de Tween 80, els valors de  $K_m$  són comparables als obtinguts per a les SDRs (Gough et al., 1998). L'ADH1B2 també pateix el mateix efecte que l'ADH4, i la seva  $K_m$  i eficiència catalítica per al tot-*trans*-retinol disminueixen també en unes 10 vegades en absència de Tween 80 (Article II). El fet de que el detergent no influeixi les constants cinètiques amb etanol fa pensar que l'efecte del Tween 80 és sobre el retinoide i no sobre l'enzim. El detergent, de caràcter amfipàtic, igual que el retinol, pot actuar de solubilitzant formant

micel·les que segresten el retinol (Zachman et al., 1961), de manera que l'accés del retinol a l'enzim es veu dificultat, produïnt un aparent efecte d'inhibició competitiva. Un model similar ha estat utilitzat per explicar la inhibició d'un detergent no iònic sobre l'activitat de desoxigenació del linoleat catalitzada per una lipoxigenasa (Schilstra et al., 1996).

Tot i la inhibició que provoca el Tween 80 en les cinètiques amb retinoides, i la consegüent sobreestimació del valor de la  $K_m$  en 10 vegades, l'ús del detergent resulta necessari per mantenir l'estabilitat del retinol en la solució aquosa (vegeu Figura 3 de l'Article II). Hem comprovat per assajos espectrofotomètrics i d'HPLC que en presència de Tween 80, el retinol roman inalterat com a mínim durant 90 min. En canvi, en absència del detergent, l'espectre del retinol canvia ràpidament, i l'anàlisi per HPLC indica que apareixen derivats polars del retinol gairebé immediatament després de preparar la solució. El retinol en solució aquosa es susceptible de patir reaccions d'oxidació, isomerització i fotodegradació (Noy, 1999), que en el nostre experiment provoquen una degradació del 76 % del retinol al cap de 90 min d'incubació (vegeu Figura 3 de l'Article II). Així doncs, tot i que l'ús del detergent en les determinacions cinètiques emmascara de forma negativa els resultats de l'ADH, és necessari per assegurar uns resultats fiables i reproduïbles. Per tant, la tècnica amb Tween 80 és adequada per realitzar estudis comparatius d'activitat de diferents ADHs amb diferents retinoides de forma ràpida i eficaç. A l'hora d'argumentar, però, l'activitat relativa i la contribució fisiològica de les ADHs i de les SDRs en el metabolisme dels retinoides, s'ha de tenir en compte que l'ADH pot tenir una importància major de la suposada fins ara, doncs els valors reals de  $K_m$  són 10 vegades menors que els determinats amb Tween 80, per nosaltres (Julià et al., 1986, Parés i Julià, 1990, Boleda et al., 1993, Article I, Article II, Allali-Hassani et al., 1998, Crosas et al., 2000) i per altres grups (Yang et al., 1994, Kedishvili et al., 1998, Han et al., 1998, Plapp et al., 2001, Chou et al., 2002). Aquests valors estan pròxims als valors de les  $K_m$  de les SDRs (Chai et al., 1997, Su et al., 1998, Gough et al., 1998). Actualment, en el nostre grup d'investigació, s'han posat a punt tècniques per determinar l'activitat de l'ADH amb retinoides per HPLC, i els resultats obtinguts confirmen la disminució de les  $K_m$  i l'augment de les eficiències catalítiques de l'ADH amb retinoides (Gallego et al., resultats no publicats). La tècnica, però, resulta més lenta i més costosa que la tècnica espectrofotomètrica utilitzada habitualment (Parés i Julià, 1990). Així, la tècnica espectrofotomètrica amb Tween 80 serviria per a un primer anàlisi de l'activitat d'una ADH amb retinoides, i per fer una primera valoració de les constants cinètiques. La tècnica d'HPLC s'hauria d'aplicar llavors per obtenir les constants amb exactitud.



## CONCLUSIONS FINALS

- S'han expressat i purificat a homogeneïtat els enzims de ratolí ADH1 i ADH4, els humans ADH1B1, ADH2B2 i ADH4, i el mutant ADH4 M141L, utilitzant el vector d'expressió pGEX-4T-2.
- S'han determinat les constants cinètiques d'aquests enzims amb alcohols alifàtics, i els resultats són comparables amb els obtinguts anteriorment. És la primera vegada que s'ha caracteritzat la cinètica dels enzims de ratolí ADH1 i ADH4 recombinants.
- S'ha posat a punt un mètode per obtenir isòmers de retinol a partir de la reducció dels isòmers de retinal corresponents amb borhidru de sodi. Tal com s'ha comprovat espectrofotomètricament i per HPLC, la reacció és completa i el producte obtingut és homogeni.
- S'ha caracteritzat de manera completa l'activitat ADH, amb tot-*trans*-retinol i tot-*trans*-retinal i amb tots els possibles compostos amb una isomerització *cis* en la cadena alifàtica lineal de retinol i retinal (7-*cis*-, 9-*cis*-, 11-*cis*- i 13-*cis*-), dels enzims de ratolí ADH1 i ADH4 i dels humans, ADH1B1, ADH2B2 i ADH4. Els isòmers 7-*cis* i 9-*cis* resulten ser els més actius amb totes les ADHs estudiades. ADH4, a diferència d'ADH1, mostra especificitat per l'activitat 11-*cis*-retinol deshidrogenasa sobre l'activitat 11-*cis*-retinal reductasa.
- S'ha investigat la naturalesa de l'especificitat de l'ADH4 humana per l'11-*cis*-retinol, mitjançant modelatge molecular i estudis cinètics amb el mutant ADH4 M141L. L'estructura de la zona mitjana del túnel hidrofòbic, pròxima al residu 141, en que s'uneix el substrat, juntament amb la conformació particular de l'11-*cis*-retinal, explicarien l'especificitat d'11-*cis*-retinol deshidrogenasa de l'ADH4.
- L'ADH4 pot ser un enzim important en el cicle visual, doncs es localitza en l'epiteli pigmentat de la retina i presenta una elevada activitat d'11-*cis*-retinol i tot-*trans*-retinol deshidrogenasa. També s'ha localitzat en les capes neuronals de la retina, on pot ser important per a les funcions dels retinoides en el teixit nerviós, així com en el metabolisme dels fotopigments dels cons i de les cèl·lules fotosensibles situades a la capa de cèl·lules ganglionars.
- L'ADH4 s'ha localitzat en l'epiteli i l'endoteli de la còrnia, on podria tenir un paper de protecció i manteniment epitelial.
- És la primera vegada que es determina l'activitat de les ADHs amb derivats de retinoides oxidats en l'anell de ciclohexè, els quals tenen elevat interès funcional. El 4-oxo-retinal i el 4-hidroxi-retinol són els

retinoides més actius que s'han trobat fins ara per a les ADHs, amb unes constants catalítiques semblants a les que s'obtenen amb els alcohols alifàtics. Els 3,4-dideshidroretinoides presenten constants cinètiques semblants a les obtingudes amb els tot-*trans*-retinoides. Aquestes activitats suggereixen que l'ADH pot intervenir en el metabolisme d'aquests retinoides, especialment en el procés de síntesi dels àcids retinoics corresponents, els quals poden interaccionar amb receptors nuclears.

- El Tween 80 és l'agent majoritàriament utilitzat per solubilitzar retinoides en els assaigs enzimàtics. Hem demostrat que l'ús de Tween 80 resulta necessari per mantenir l'estabilitat de la solució aquosa de retinol, de manera que assegura l'obtenció de resultats cinètics fiables i reproduïbles. No obstant, el Tween 80 disminueix l'activitat ADH amb retinoides, però no amb etanol, actuant com un aparent inhibidor competitiu, amb una  $K_i$  de 0,0019 %. Això provoca un augment aparent de la  $K_m$ , de tal manera que, a la concentració generalment utilitzada de detergent, proporciona uns valors 10 vegades més elevats de la  $K_m$  que els valors en absència de Tween 80. Aquests resultats impliquen que la contribució de l'ADH en el metabolisme de retinoides podria ser més important que la postulada a partir dels resultats cinètics amb Tween 80.

## AGRAÏMENTS

Primer de tot, m'agradaria donar les gràcies al Dr. Xavier Parés, que em va donar l'oportunitat – ara ja fa uns quants anys – d'entrar en un grup de recerca amb gent excel·lent. Per les seves paciència, converses i ànims que sempre m'ha donat, i per ser comprensiu quan vaig decidir en dos dies aprofitar una oferta de l'empresa privada.

També vull donar les gràcies al Dr. Jaume Farrés, pel seu suport i les seves idees.

A totes les persones del grup ADH haig d'agrair les bones estones passades. Als meus companys generacionals, l'Emma i l'Albert, haig d'agrair de forma especial el temps que hem passat junts patint les inclemències de la investigació. A l'Abdellah, per ser el meu mestre. A la Susana i a la Júlia, el seu bon humor i les batalles viscudes en tots els sentits de la paraula. Al Bernat, en Josep Maria (no oblidaré els partits de bàsquet), al Dámaso, a l'Ana M<sup>a</sup>, i a l'Alberto, també gràcies per tot i per la seva ajuda. Al relleu, al Sergio i especialment a l'Oriol, a qui li cedeixo amb molt de gust això dels retinoides.

A les noies dels llevats i plantes, la Chari, la Maykelis, l'Eva, la Carol i la Hakima, per les seves converses.

També vull agrair el suport rebut de la resta del Departament, encapçalat pel Salva.

Especial agraïment haig de donar a la Dra. Rosana Álvarez i al Dr. Angel R. De Lera, del Departament de Química Orgànica de la Universitat de Vigo. Sense ells, no hauria pogut presentar aquesta Tesi, els meus resultats s'han generat a partir del seu treball amb la síntesi de retinoides, i a més, em van donar suport econòmic quan se'm va acabar la beca.

A la Universitat Autònoma li haig de donar les gràcies per la beca que vaig rebre, i que em va permetre de 'viure' quatre anys.

Vull agrair el suport de la meva família i amics, als meus pares en especial, i a la meva mare per recordar-me constantment que quan hagi presentat la Tesi m'hauré tret un pes de sobre.

Finalment, et guardo una frase especial per a tu i per a l'Aina: ja sabeu que ho sou tot.

## BIBLIOGRAFIA

- Abel, E. L. (1982) Consumption of alcohol during pregnancy: A review of effects on growth and development of offspring. *Hum. Biol.* **54**, 421 – 453.
- Achkar, C. C., Derguini, F., Blumberg, B., Langston, A., Levin, A. A., Speck, J., Evans, R. M., Bolado, J. Jr., Nakanishi, K., Buck, J., and Gudas, L. J. (1996) 4-oxoretinol, a new natural ligand and transactivator of the retinoic acid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4879 – 4884.
- Algar, E. M., Seeley, T. – L., and Holmes, R. S. (1983) Purification and molecular properties of mouse alcohol dehydrogenase isozymes. *Eur. J. Biochem.* **137**, 139 – 147.
- Allali-Hassani, A., Peralba, J. M., Martras, S., Farrés, J., and Parés, X. (1998) Retinoids,  $\omega$ -hydroxyfatty acids and cytotoxic aldehydes as physiological substrates, and H2-receptor antagonists as pharmacological inhibitors, of human class IV alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.* **426**, 362 – 366.
- Ang, H. L., and Duester, G. (1999) Stimulation of premature retinoic acid synthesis in *Xenopus* embryos following premature expression of aldehyde dehydrogenase ALDH1. *Eur. J. Biochem.* **260**, 227 – 234.
- Ang, H. L., Deltour, L., Hayamizu, T. F., Zgombic-Knight, M., and Duester, G. (1996a) Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. *J. Biol. Chem.* **271**, 9526 – 9534.
- Ang, H. L., Deltour, L., Zgombic-Knight, M., Wagner, M. A., and Duester, G. (1996b) Expression patterns of class I and class IV alcohol dehydrogenase genes in developing epithelia suggest a role for alcohol dehydrogenase in local retinoic acid synthesis. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **20**, 1050 – 1064.
- Asselineau, D., Bernard, B. A., Bailly, C., and Darmon, M. (1989) Retinoic acid improves epidermal morphogenesis. *Dev. Biol.* **133**, 322 – 335.
- Balmer, J. E., and Blomhoff, R. (2002) Gene expression regulation by retinoic acid. *J. Lipid Res.* **43**, 1773 – 1808.
- Björkhem, I. (1972) On the role of alcohol dehydrogenase in  $\omega$ -oxidation of fatty acids. *Eur. J. Biochem.* **30**, 441 – 451.
- Blaner, W. S., Piantedosi, R., Sykes, A., and Vogel, S. (1999) Retinoic acid synthesis and metabolism. En *Retinoid.: The biochemical and molecular basis of vitamin A and retinoid action* (H. Nau, W. S. Blaner Eds.), pp. 117 – 149. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Blomhoff, R. (1994) Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr. Rev.* **52**, S13 – S23.
- Blomhoff, R., Green, M. H., Balmer Green, J., Berg, T., and Norum, K. R. (1991) Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol. Rev.* **71**, 951 – 990.
- Blumberg, B., Bolado, J. Jr., Derguini, F., Grey Craig, A., Moreno, T. A., Chakravarti, D., Heyman, R.A., Buck, J., and Evans, R. M. (1996) Novel retinoic acid receptor ligands in *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4873 – 4878.
- Boerman, M. H. E. M., and Napoli, J. L. (1995) Characterization of a microsomal retinol dehydrogenase: a short – chain alcohol dehydrogenase with integral and peripheral membrane forms that interacts with holo-CRBP (type I). *Biochemistry* **34**, 7027 – 7037.
- Boleda, M. D., Julià, P., Moreno, A., and Parés, X. (1989) Role of extrahepatic alcohol dehydrogenase in rat ethanol metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**, 74 – 81.
- Boleda, M. D., Saubi, N., Farrés, J., and Parés, X., (1993) Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation,  $\omega$ -hydroxyfatty acids, and retinoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 85 – 90.
- Brändén, C. – I., Eklund, H., Nordström, B., Boiwe, T., Söderlund, G., Zeppezauer, E., Öhlsson, I., and Åkeson, Å. (1973) Structure of liver alcohol dehydrogenase at 2.9 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2439 – 2442.

- Brändén, C. – I., Jörnvall, H., Eklund, H., and Furugren, B. (1975) Alcohol dehydrogenases. En *The Enzymes* (P. D. Boyer, Ed.), vol. XI, pp. 103 – 190. Academic Press, New York.
- Cederlund, E., Peralba, J. M., Parés, X., and Jörnvall, H. (1991) Amphibian alcohol dehydrogenase, the major frog liver enzyme. Relationships to other forms and assessment of an early gene duplication separating vertebrate class I and class III alcohol dehydrogenases. *Biochemistry* **30**, 2811 – 2816.
- Chai, X., Boerman, M. H. E. M., Zhai, Y., and Napoli, J. L. (1995a) Cloning of a cDNA for liver microsomal retinol dehydrogenase. A tissue – specific, short – chain alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **270**, 3900 – 3904.
- Chai, X., Zhai, Y., Popescu, G., and Napoli, J. L. (1995b) Cloning of a cDNA for a second retinol dehydrogenase type II – expression of its mRNA relative to type I. *J. Biol. Chem.* **270**, 28408 – 28412.
- Chai, X., Zhai, Y., and Napoli, J. L. (1996) Cloning of a rat cDNA encoding retinol dehydrogenase isozyme type III. *Gene* **169**, 219 – 222.
- Chai, X. Y., Zhai, Y., and Napoli, J. L. (1997) cDNA cloning and characterization of a *cis*-retinol/3 $\alpha$ -hydroxysterol short – chain dehydrogenase isozyme. *J. Biol. Chem.* **273**, 17910 – 17916.
- Chen, A. C., Guo, X., Derguini, F., and Gudas, L. J. (1997) Human breast cancer cells and normal mammary epithelial cells: retinol metabolism and growth inhibition by the retinol metabolite 4-oxo-retinol. *Cancer Res.* **57**, 4642 – 4651.
- Cheung, C., Smith, C. K., Höög, J.-O., and Hotchkiss, S. A. (1999) Expression and localization of human alcohol and aldehyde dehydrogenase enzymes in skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 100 – 107.
- Chou, C. – F., Lai, C. – L., Chang, Y. – C., Duester, G., and Yin, S. – J. (2002) Kinetic mechanism of human class IV alcohol dehydrogenase functioning as retinol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **277**, 25209 – 25216.
- Cideciyan, A. V., Haeseleer, F., Fariss, R. N., Aleman, T. S., Jang, G. F., Verlinde, C. L., Marmor, M. F., Jacobson, S. G., and Palczewski, K. (2000) Rod and cone visual cycle consequences of a null mutation in the 11-*cis*-retinol dehydrogenase gene in man. *Vis. Neurosci.* **17**, 667 – 678.
- Crabb, D. W., Bosron, W. F., and Li, T. K. (1987) Ethanol metabolism. *Pharmacol. Ther.* **34**, 59 – 73.
- Crosas, B., Allali-Hassani, A., Martínez, S. E., Martras, S., Persson, B., Jörnvall, H., Parés, X., and Farrés, J. (2000) Molecular basis for differential substrate specificity in class IV alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **275**, 25180 – 25187.
- Crosas, B., Cederlund, E., Torres, D., Jörnvall, H., Farrés, J., and Parés, X. (2001) A vertebrate aldo-keto reductase active with retinoids and ethanol. *J. Biol. Chem.* **276**, 19132 – 19140.
- Crosas, B., Hyndman, D.J., Gallego, O., Martras, S., Parés, X., Flynn, T.G., and Farrés, J. (2003) Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. *Biochem. J.* **373**, 973 – 979.
- Collins, M. D., and Mao, G. E. (1999) Teratology of retinoids. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 399 – 430.
- Danielsson, O., Atrián, S., Luque, T., Hjelmqvist, L. González – Duarte, R., and Jörnvall, H. (1994) Fundamental molecular differences between alcohol dehydrogenase classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4980 – 4984.
- Danielsson, O., Eklund, H., and Jörnvall, H. (1992) The major piscine liver alcohol dehydrogenase has class – mixed properties in relation to mammalian alcohol dehydrogenases of classes I and III. *Biochemistry* **31**, 3751 – 3759.
- Deltour, L., Ang, H. L., and Duester, G. (1996) Ethanol inhibition of retinoic acid synthesis as a potential mechanism for fetal alcohol syndrome. *FASEB J.* **10**, 1050 – 1057.
- Deltour, L., Foglio, M. H., and Duester, G. (1999a) Impaired retinol utilization in Adh4 alcohol dehydrogenase mutant mice. *Dev. Genet.* **25**, 1 – 10.
- Deltour, L., Foglio, M. H., and Duester, G. (1999b) Metabolic deficiencies in alcohol dehydrogenase Adh1, Adh3, and Adh4 null mutant mice. Overlapping roles of Adh1 and Adh4 in ethanol clearance and metabolism of retinol to retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **274**, 16796 – 16801.
- Deltour, L., Haselbeck, R. J., Ang, H. L., and Duester, G. (1997) Localization of class I and class IV alcohol dehydrogenases in mouse testis and epididymis: potential retinol dehydrogenases for endogenous retinoic acid synthesis. *Biol. Reprod.* **56**, 102 – 109.

- Ditlow, C. C., Holmquist, B., Morelock, M. M., and Vallee, B. L. (1984) Physical and enzymatic properties of a class II alcohol dehydrogenase isoenzyme of human liver:  $\pi$ -ADH. *Biochemistry* **23**, 6363 – 6368.
- Driessen, C. A. G. G., Janssen, B. P. M., Winkens, H. J., van Vugt, A. H. M., Leeuw, T. L. M., and Janssen, J. J. M. (1995) Cloning and expression of a cDNA encoding bovine retinal pigment epithelium 11-cis retinol dehydrogenase. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**, 1988 – 1996.
- Driessen, C. A. G. G., Winkens, H. J., Hoffmann, K., Kuhlmann, L. D., Janssen, B. P. M., van Vugt, A. H. M., van Hooser, J. P., Wieringa, B. E., Deutman, A. F., Palczewski, K., Reuther, K., and Janssen, J. J. M. (2000) Disruption of the 11-cis-retinol dehydrogenase gene leads to accumulation of cis-retinoids and cis-retinyl esters. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4275 – 4287.
- Duester, G. (1998) Alcohol dehydrogenase as a critical mediator of retinoic acid synthesis from vitamin A in the mouse embryo. *J. Nutr.* **128**, 459S – 462S.
- Duester, G. (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4315 – 4324.
- Duester, G., Farrés, J., Felder, M. R., Holmes, R. S., Höög, J. – O., Parés, X., Plapp, B. V., Yin, S. J., and Jörnvall, H. (1999) Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 389 – 395.
- Edenberg, H. J., and Bosron, W. F. (1997) Alcohol dehydrogenases. En *Comprehensive Toxicology* (F. P. Guengerich, Ed.), vol. 3, pp. 119 – 131. Pergamon Press, Inc., New York.
- Eklund, H., and Brändén, C. – I. (1987) Alcohol dehydrogenase. En *Biological Macromolecules and Assemblies* (Jurnak, F. A. and McPherson, A., eds.), pp. 73 – 142, John Wiley & Sons Inc., London.
- Eklund, H., Müller-Wille, P., Horjales, E., Futer, O., Holmquist, B., Vallee, B. L., Höög, J. – O., Kaiser, R., and Jörnvall, H. (1990) Comparison of three classes of human liver alcohol dehydrogenases. Emphasis on different substrate binding pockets. *Eur. J. Biochem.* **193**, 303 – 310.
- Endo, K., Fukui, M., Mishima, M., and Watanabe, K. (2001) Metabolism of vitamin A affected by prostaglandin F synthase in contractile interstitial cells of bovine lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 956 – 961.
- Estonius, M., Svensson, S., and Höög, J. – O. (1996) Alcohol dehydrogenase in human tissues: localisation of transcripts coding for five classes of the enzyme. *FEBS Lett.* **397**, 338 – 342.
- Faria, T. N., Rivi, R., Derguini, F., Pandolfi, P. P., and Gudas, L. J. (1998) 4-oxoretinol, a metabolite of retinol in the human promyelocytic leukemia cell line NB4, induces cell growth arrest and granulocytic differentiation, *Cancer Res.* **58**, 2007 – 2013.
- Forman, D. T. (1988) The effect of ethanol and its metabolites on carbohydrate, protein and lipid metabolism. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **18**, 181 – 189.
- Furr, H.C., Barua, A. B., and Olson, J. A. (1994) Analytical methods. En *Biology, Chemistry and Medicine*, (M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman, Eds.), 2<sup>nd</sup> edition, pp. 179 – 209. Raven Press, Ltd., New York.
- Gamble, M. V., Shang, E. Y., Zott, R. P., Mertz, J. R., Wolgemuth, D. J., and Blaner, W. S. (1999) Biochemical properties, tissue expression, and gene structure of a short chain dehydrogenase/reductase able to catalyze cis-retinol oxidation. *J. Lipid Res.* **40**, 2279 – 2292.
- Gough, W. H., van Ooteghem, S., Sint, T., and Kedishvili, N. Y. (1998) cDNA cloning and characterization of a new human microsomal NAD<sup>+</sup>- dependent dehydrogenase that oxidizes all-trans-retinol and 3 $\alpha$ -hydroxysteroids. *J. Biol. Chem.* **273**, 19778 – 19785.
- Ghyselink, N. B., Båvik, C., Sapin, V., Mark, M., Bonnier, D., Hindelang, C., Dierich, A., Nilsson, C. B., Håkansson, H., Sauvant, P., Azaïs-Braesco, V., Frasson, M., Picaud, S., and Chambon, P. (1999) Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J.* **18**, 4903 – 4914.
- Gudas, L. J. (1994) Retinoids and vertebrate development. *J. Biol. Chem.* **269**, 15399 – 15402.
- Haeseleer, F., Huang, J., Lebioda, L., Saari, J. C., and Palczewski, K. (1998) Molecular characterization of a novel short – chain dehydrogenase/reductase that reduces all-trans-retinal. *J. Biol. Chem.* **273**, 21790 – 21799.

- Han, C. – L., Liao, C. – S., Wu, C. – W., Hwong, C. – L., Lee, A. – R., and Yin, S. – J. (1998) Contribution to first-pass metabolism of ethanol and inhibition by ethanol for retinol oxidation in human alcohol dehydrogenase family. Implication for etiology of fetal alcohol syndrome and alcohol-related diseases. *Eur. J. Biochem.* **254**, 25 – 31.
- Handschin, R., Maly, P., Crotet, V., Toranelli, M., and Sasse, D. (1997) Qualitative and quantitative analysis of various classes of alcohol dehydrogenase in structures of rat skin. *Acta Histochem. Cytochem.* **30**, 567 – 574.
- Haselbeck, R. J., and Duester, G. (1997) Regional restriction of alcohol/retinol dehydrogenases along the mouse gastrointestinal epithelium. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **21**, 1484 – 1490.
- Haselbeck, R. J., and Duester, G. (1998) ADH4-lacZ transgenic mouse reveals alcohol dehydrogenase localization in embryonic midbrain/hindbrain, optic vesicles, and mesencephalic, trigeminal, facial, and olfactory neural crest. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **22**, 1607 – 1613.
- Haselbeck, R. J., Ang, H. L., and Duester, G. (1997) Class IV alcohol/retinol dehydrogenase localization in epidermal basal layer: potential site of retinoic acid synthesis during skin development. *Dev. Dyn.* **208**, 447 – 453.
- Hjelmqvist, L., Estonius, M., and Jörnvall, H. (1995) The vertebrate alcohol dehydrogenase system: variable class II type form elucidates separate stages of enzymogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10904 – 10908.
- Hoffmann, I., Ang, H. L., and Duester, G. (1998) Alcohol dehydrogenase in *Xenopus* development: conserved expression of ADH1 and ADH4 in epithelial retinoid target tissues. *Dev. Dyn.* **213**, 261 – 270.
- Höög, J. – O., Hedberg, J. J., Strömberg, P., and Svensson, S. (2001) Mammalian alcohol dehydrogenase – Functional and structural implications. *J. Biomed. Sci.* **8**, 71 – 76.
- Hurley, T. D., and Bosron, W. F. (1992) Human alcohol dehydrogenase: dependence of secondary alcohol oxidation on the amino acids at positions 93 and 94. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 93 – 99.
- Hurley, T. D., Edenberg, H. J., and Bosron, W. F. (1990) Expression and kinetic characterization of variants of human  $\beta 1\beta 1$  alcohol dehydrogenase containing substitutions at amino acid 47. *J. Biol. Chem.* **265**, 16366 – 16372.
- Idres, N., Marill, J., Flexor, M. A., and Chabot, G. G. (2002) Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by all-trans-retinoic acid metabolites and isomers. *J. Biol. Chem.* **277**, 31491 – 31498.
- Ishii, H., and Thurman, R. G. (1996) Oxidative stress in alcoholic liver injury (symposium). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **20**, 162A – 167A.
- Jensen, D. E., Belka, G. K., and Du Bois, G. C. (1998) S-nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem. J.* **331**, 659 – 668.
- Jez, J. M., Bennett, M. J., Schlegel, B. P., Lewis, M., and Penning, T. M. (1997) Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. J.* **326**, 625 – 636.
- Jörnvall, H. (1970) Horse liver alcohol dehydrogenase. The primary structure of the protein chain of the ethanol-active isoenzyme. *Eur. J. Biochem.* **16**, 25 – 40.
- Jörnvall, H. (1994) The alcohol dehydrogenase system. In *Toward a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse* (Jansson, B., Jörnvall, H., Rydberg, U., Terenius, L., and Vallee, B. L., Eds.), pp. 221 – 229. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Jörnvall, H., and Höög, J. – O. (1995) Nomenclature of alcohol dehydrogenases. *Alcohol Alcohol.* **30**, 153 – 161.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrián, S., González-Duarte, R., Jeffery, J., and Ghosh, D. (1995) Short – chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**, 6003 – 6013.
- Jörnvall, H., Shafqat, J., and Persson, B. (2001) Variations and constant patterns in eukaryotic MDR enzymes. Conclusions from novel structures and characterized genomes. *Chem. Biol. Int.* **130 – 132**, 491 – 498.
- Julià, P., Farrés, J., and Parés, X. (1986) Ocular alcohol dehydrogenase in the rat: regional distribution and kinetics of the ADH-1 isoenzyme with retinol and retinal. *Exp. Eye Res.* **42**, 305 – 314.
- Julià, P., Farrés, J., and Parés, X. (1987) Characterization of three isoenzymes of rat alcohol dehydrogenase. Tissue distribution and physical and enzymatic properties. *Eur. J. Biochem.* **162**, 179 – 189.
- Kaiser, R., Fernández, M. R., Parés, X., and Jörnvall, H. (1993) Origin of the human alcohol dehydrogenase system. Implication from the structure and properties of the octopus protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11222 – 11226.

- Karlsson, T., Vahlquist, A., Kedishvili, N. Y., and Törmä, H. (2003) 13-cis-retinoic acid competitively inhibits 3 alpha-hydroxysteroid oxidation by retinol dehydrogenase RoDH-4: a mechanism for its anti-androgenic effects in sebaceous glands?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 273 – 278.
- Kastner, P., Grondona, J. M., Mark, M., Gansmuller, A., LeMeur, M., Décimo, D., Vonesch, J. – L., Dollé, P., and Chambon, P. (1994) Genetic analysis of RXR $\alpha$  developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* **78**, 987 – 1003.
- Kedishvili, N. Y., Gough, W. H., Chernoff, E. A., Hurley, T. D., Stone, C. L., Bowman, K. D., Popov, K. M., Bosron, W. F., and Li, T. K. (1997) cDNA sequence and catalytic properties of a chick embryo alcohol dehydrogenase that oxidizes retinol and 3b,5a-hydroxysteroids. *J. Biol. Chem.* **272**, 7494 – 7500.
- Kedishvili, N. Y., Gough, W. H., Wilhelmina, I. D., Parsons, S., Li, T. K., and Bosron, W. F. (1998) Effect of cellular retinol-binding protein on retinol oxidation by human class IV retinol/alcohol dehydrogenase and inhibition by ethanol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 191 – 196.
- Koivusalo, M., Baumann, M., and Uotila, L. (1989) Evidence for the identity of glutathione – dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.* **257**, 105 – 109.
- Kunitoh, S., Tanaka, T., Imaoka, S., Funae, Y., and Monna, Y. (1993) Contribution of cytochrome P450s to MEOS (microsomal ethanol-oxidizing system): a specific and sensitive assay of MEOS activity by HPLC with fluorescence labeling. *Alcohol Alcohol.* **28**, 63 – 68.
- Lane, M. A., Chen, A. C., Roman, S. D., Derguini, F., and Gudas, L. J. (1999) Removal of LIF (leukemia inhibitory factor) results in increased vitamin A (retinol) metabolism to 4-oxoretinol in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13524 – 13529.
- Leo, M. A., Lasker, J. M., Raucy, J. L., Kim, C. I., Black, M., and Lieber, C. S. (1989) Metabolism of retinol and retinoic acid by human liver cytochrome P450IIC8. *Arch Biochem Biophys.* **269**, 305 – 312.
- Li, T. K. (1977) Enzymology of human metabolism. En *Advances in Enzymology* (Meister, A., Ed.), vol. 45, pp. 427 – 483. John Wiley, New York.
- Li, T. K. (1983) The absorption, distribution and metabolism of ethanol and its effects on nutrition and hepatic function. En *Medical and Social Aspects of Alcohol Abuse* (Tabakoff, B., Sutkers, P. B., and Randall, C. L., Eds.), pp. 47 – 77. Plenum Press, New York.
- Li, T. K., Bosron, W. F., Dafeldecker, W. P., Lange, L. G., and Vallee, B. L. (1977) Isolation of  $\pi$ -alcohol dehydrogenase of human liver: is it a determinant of alcoholism? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4378 – 4381.
- Lieber, C. S. (1987) Microsomal ethanol – oxidizing system. *Enzyme* **37**, 45 – 56.
- Lieber, C. S. and DeCarli, L. M. (1972) The role of hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **181**, 279 – 288.
- Lin, M., Zhang, M., Abraham, M., Smith, S. M., and Napoli, J. L. (2003) Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 9856 – 9861.
- Liu, R. S. H., and Asato, A. E. (1984) Photochemistry and synthesis of stereoisomers of vitamin A. *Tetrahedron* **40**, 1931 – 1969.
- Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dollé, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A., and Chambon, P. (1994) Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. (I) Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* **120**, 2723 – 2748.
- Mårdh, G., and Vallee, B. L. (1986) Human class I alcohol dehydrogenase catalyze the interconversion of alcohols and aldehydes in the metabolism of dopamine. *Biochemistry* **25**, 7279 – 7282.
- McBee, J. K., Palczewski, K., Baehr, W., and Pepperberg, D. R. (2001) Confronting complexity: the interlink of phototransduction and retinoid metabolism in the vertebrate retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **20**, 469 – 529.
- McEvily, A. J., Holmquist, B., Auld, D. S., and Vallee, B. L. (1988) 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\beta$ -steroid dehydrogenase activity of human liver alcohol dehydrogenase is specific to  $\gamma$ -subunits. *Biochemistry* **27**, 4284 – 4288.



- Means, A. L., and Gudas, L. J. (1995) The roles of retinoids in vertebrate development. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 201 – 233.
- Mendelsohn, C., Lohnes, D., Décimo, D., Lufkin, T., LeMeur, M., Chambon, P., and Mark, M. (1994) Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. (II) Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* **120**, 2749 – 2771.
- Molotkov, A., Deltour, L., Foglio, M. H., Cuenca, A. E., and Duester, G. (2002a) Distinct retinoid metabolic functions for alcohol dehydrogenase genes *Adh1* and *Adh4* in protection against vitamin A toxicity or deficiency revealed in double null mutant mice. *J. Biol. Chem.* **277**, 13804 – 13811.
- Molotkov, A., Fan, X., and Duester, G. (2002b) Excessive vitamin A toxicity in mice genetically deficient in either alcohol dehydrogenase *Adh1* or *Adh3*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2607 – 2612.
- Molotkov, A., Fan, X., Deltour, L., Foglio, M. H., Martras, S., Farrés, J., Parés, X., and Duester, G. (2002c) Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase *Adh3*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 5337 – 5342.
- Moreno, A., and Parés, X. (1991) Purification and characterization of a new alcohol dehydrogenase from human stomach. *J. Biol. Chem.* **266**, 1128 – 1133.
- Napoli, J. L. (1996) Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin. Immunol. and Immunopathol.* **80**, S52 – S62.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dollé, P., and Chambon, P. (1999) Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat. Genet.* **21**, 444 – 448.
- Noy, N. (1999) Physical-chemical properties and action of retinoids. En *The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action* (H. Nau, W. S. Blaner, Eds.), pp. 3 – 29. Springer, Berlin.
- Parés, X., and Julià, P. (1990) Isoenzymes of alcohol dehydrogenase in retinoid metabolism. *Methods Enzymol.* **189**, 436 – 441
- Parés, X., and Vallee, B. L. (1981) New human liver alcohol dehydrogenase forms with unique kinetic characteristics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**, 122 – 130.
- Penning, T. M., Burczynski, M. E., Jez, J. M., Hung, C.-F., Lin, H.-K., Ma, H., Moore, M., Palackal, N., and Ratnam, K. (2000) Human 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem. J.* **351**, 67 – 77.
- Peralba, J. M., Cederlund, E., Crosas, B., Moreno, A., Julià, P., Martínez, S. E., Persson, B., Farrés, J., Parés, X., and Jörnvall, H. (1999) Structural and enzymatic properties of a gastric NADP(H)-dependent and retinal-active alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **274**, 26021 – 26026.
- Pietruszko, R. (1979) Nonethanol substrates of alcohol dehydrogenase. En *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol* (Majchrowicz, E., and Noble, E. P., Eds.), vol. I, pp. 87 – 106. Plenum Press, New York.
- Pijnappel, W. W. M., Hendriks, H. F. J., Folkers, G. E., van der Brink, C. E., Dekker, E. J., Edelenbosch, C., van der Saag, P. T., and Durston, A. J. (1993) The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is highly active modulator of positional specification. *Nature* **366**, 340 – 344.
- Plapp, B. V. (1994) Control of alcohol metabolism. En *Toward and Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse* (Jansson, B., Jörnvall, H., Rydberg, L., and Vallee, B. L., Eds.), pp. 311 – 322. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Plapp, B. V., Mitchell, J. L., and Berst, K. B. (2001) Mouse alcohol dehydrogenase 4: kinetic mechanism, substrate specificity and simulation of effects of ethanol on retinoid metabolism. *Chem. Biol. Int.* **130-132**, 445 – 456.
- Popescu, G., and Napoli, J. L. (2000) Analysis of rat cytosolic 9-*cis*-retinol dehydrogenase activity and enzymatic characterization of rat ADHII. *Biochim. Biophys. Acta* **1476**, 43 – 52.
- Randolph, R. K., and Siegenthaler, G. (1999) Vitamin A homeostasis in human epidermis. En *Retinoids. The biochemical and molecular basis of vitamin A and retinoid action* (Nau, H. and Blaner, W. S. Eds.), pp. 491 – 520. Springer-Verlag, Heidelberg.

- Randolph, R. K., and Simon, M. (1995) Metabolic regulation of active retinoid concentrations in cultured human epidermal keratinocytes by exogenous fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 168 – 175.
- Raner, G. M., Vaz, A. D., and Coon, M. J. (1996) Metabolism of all-trans, 9-cis, and 13-cis isomers of retinal by purified isozymes of microsomal cytochrome P450 and mechanism-based inhibition of retinoid oxidation by citral. *Mol. Pharmacol.* **49**, 512 – 522.
- Rattner, A., Smallwood, P. M., and Nathans, J. (2000) Identification and characterization of all-trans-retinol dehydrogenase from photoreceptor outer segments, the visual cycle enzyme that reduces all-trans-retinal to all-trans-retinol. *J. Biol. Chem.* **275**, 11034 – 11043.
- Repa, J. J., Plum, L. A., Tadikonda, P. K., and Clagett-Dame, M. (1996) All-trans 3,4-didehydroretinoic acid equals all-trans retinoic acid in support of chick neuronal development. *FASEB J.* **10**, 1078 – 1084.
- Roberts, E. S., Vaz, A. D., and Coon, M. J. (1992) Role of isozymes of rabbit microsomal cytochrome P-450 in the metabolism of retinoic acid, retinol, and retinal. *Mol. Pharmacol.* **41**, 427 – 433.
- Romert, A., Tuvendal, P., Simon, A., Dencker, L., and Eriksson, U. (1998) The identification of a 9-cis retinol dehydrogenase in a mouse embryo reveals a pathway for synthesis of 9-cis retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4404 – 4409.
- Rosell, A., Valencia, E., Ochoa, W.F., Fita, I., Parés, X., and Farrés, J. (2003) Complete reversal of coenzyme specificity by concerted mutation of three consecutive residues in alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **278**, 40573 – 40780.
- Ross, S. A., McCaffery, P. J., Drager, U. C., and De Luca, L. M. (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* **80**, 1021 – 1054.
- Sato, S., Lin, L. R., Reddy, V. N., and Kador, P. F. (1993) Aldose reductase in human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* **57**, 235 – 241.
- Schilstra, M. J., Veldink, G. A., Vliegenthart, J. F. (1994) Effect of nonionic detergents on lipoygenase catalysis. *Lipids* **29**, 225 – 231.
- Seitz, H. K., Egerer, G., Simanowski, U. A., Waldherr, R., Eckey, R., Agarwal, D. P., Goedde, H. W., and von Wartburg, J. P. (1993) Human gastric alcohol dehydrogenase activity: effect of age, sex, and alcoholism. *Gut* **34**, 1433 – 1437.
- Sekhar, V. C., and Plapp, B. V. (1990) Rate constants for a mechanism including intermediates in the interconversion of ternary complexes by horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **29**, 4289 – 4295.
- Sellin, S., Holmquist, B., Mannervik, B., and Vallee, B. L. (1991) Oxidation and reduction of 4-hydroxyalkenals catalyzed by isozymes of human alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **30**, 2514 – 2518.
- Shang, E., Lai, K., Packer, A. I., Paik, J., Blamer, W. S., Vieira, M. M., Gouras, P., and Wolgemuth, D. J. (2002) Targeted disruption of the mouse cis-retinol dehydrogenase gene: visual and nonvisual functions. *J. Lipid Res.* **43**, 590 – 597.
- Shichi, H. (1983) Structure and spectral properties of retinal isomers. En *Biochemistry of Vision* (H. B. Jovanovich, Ed), pp. 66. Academic Press, New York
- Siegenthaler, G., Gumowsky-Sunek D., and Saurat, J. H. (1990a) Metabolism of natural retinoids in psoriatic epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **95**, 47S – 48S.
- Siegenthaler, G., Saurat, J. H., and Ponec, M. (1990b) Retinol and retinal metabolism. Relation to the state of differentiation of cultured human keratinocytes. *Biochem. J.* **268**, 371 – 378.
- Simon, A., Hellman, U., Wernstedt, C., and Eriksson, U. (1995) The retinal pigment epithelium – specific 11-cis retinol dehydrogenase belongs to the family of short chain alcohol dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **270**, 1107 – 1112.
- Stone, C. L., Bosron, W. F., and Dunn, M. F. (1993) Amino acids substitutions at position 47 of human  $\beta 1\beta 1$  and  $\beta 2\beta 2$  alcohol dehydrogenases affect hydride transfer and coenzyme dissociation rate constants. *J. Biol. Chem.* **268**, 892 – 899.
- Strömberg, P., and Höög, J. – O. (2000) Human class V alcohol dehydrogenase (ADH5) – A complex transcription unit generates C-terminal multiplicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**, 544 – 549.

- Su, J., Chai, X. Y., Kahn, B., and Napoli, J. L. (1998) cDNA cloning, tissue distribution, and substrate characteristics of a *cis*-retinol/3 $\alpha$ -hydroxysterol short – chain dehydrogenase isozyme. *J. Biol. Chem.* **273**, 17910 – 17916.
- Sucov, H. M., Dyson, E., Gumeringer, C. L., Price, J., Chien, K. R., and Evans, R. M. (1994) RXR $\alpha$  mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev.* **8**, 1007 – 1018.
- Suzuki, T., Makino – Tasaka, M., and Eguchi, E. (1984) 3-dehydroretinal (Vitamin A<sub>2</sub> aldehyde) in crayfish eye. *Vision Res.* **24**, 783 – 787.
- Svensson, S., Some, M., Lundsjö, A., Helander, A., Cronholm, T., and Höög, J. – O. (1999) Activities of human alcohol dehydrogenases in the metabolic pathways of ethanol and serotonin. *Eur. J. Biochem.* **262**, 324 – 329.
- Tam, Y. – K. (1993) Individual variation in the first-pass metabolism. *Clin. Pharmacokinet.* **25**, 300 – 328.
- Tomita, S., Okuyama, E., Ohnishi, T., and Ichikawa, Y. (1996) Characteristic properties of a retinoic acid synthetic cytochrome P-450 purified from liver microsomes of 3-methylcholanthrene-induced rats. *Biochim. Biophys. Acta* **1290**, 273 – 281.
- Uotila, L., and Koivusalo, M. (1974a) Formaldehyde dehydrogenase from human liver. Purification, properties, and evidence for the formation of glutathione thiol esters by the enzyme. *J. Biol. Chem.* **249**, 7653 – 7663.
- Uotila, L., and Koivusalo, M. (1974b) Purification and properties of S-formylglutathione hydrolase from human liver. *J. Biol. Chem.* **249**, 7664 – 7672.
- Wagner, F. W., Burger, A. R., and Vallee, B. L. (1983) Kinetic properties of human liver alcohol dehydrogenase: oxidation of alcohols by class I isoenzymes. *Biochemistry* **22**, 1857 – 1863.
- Wagner, F. W., Parés, X., Holmquist, B., and Vallee, B. L. (1984) Physical and enzymatic properties of a class III isozyme of human liver alcohol dehydrogenase:  $\chi$ -ADH. *Biochemistry* **23**, 2193 – 2199.
- Wermuth, B., Burgisser, H., Bohren, K., and von Wartburg, J. P. (1982) Purification and characterization of human-brain aldose reductase. *Eur. J. Biochem.* **127**, 279 – 284.
- Werten, P. J., Roll, B., van Aalten, D. M., and de Jong, W. W. (2000) Gecko iota-crystallin: how cellular retinol-binding protein became an eye lens ultraviolet filter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3282 – 3287.
- Xie, P. T., and Hurley, T. D. (1999) Methionine-141 directly influences the binding of 4-methylpyrazole in human ss alcohol dehydrogenase. *Protein Sci.* **8**, 2639 – 2644.
- Yamamoto, H., Simon, A., Eriksson, U., Harris, E., Berson, E. L., and Dryja, T.P. (1999) Mutations in the gene encoding 11-*cis* retinol dehydrogenase cause delayed dark adaptation and fundus albipunctatus. *Nat. Genet.* **22**, 188 – 191.
- Yang, Z. N., Davis, G. J., Hurley, T. D., Stone, C. L., Li, T. K., and Bosron, W. F. (1994) Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **18**, 587 – 591.
- Yasunami, M., Chen, C. S., and Yoshida, A. (1991) A human alcohol dehydrogenase gene (ADH6) encoding an additional class of isozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7610 – 7614.
- Yin, S. J., Bosron, W. F., Magnes, L. J., and Li, T. – K. (1984) Human liver alcohol dehydrogenase: purification and kinetic characterization of the  $\beta$ 2 $\beta$ 2,  $\beta$ 2 $\beta$ 1,  $\alpha$ 2, and  $\beta$ 2 $\gamma$ 1 “oriental isoenzymes”. *Biochemistry* **23**, 5847 – 5853.
- Yin, S. J., Wang, M. F., Liao, C. S., Chen, C. M., and Wu, C. W. (1990) Identification of a human stomach alcohol dehydrogenase with distinctive kinetic properties. *Biochem. Int.* **22**, 829 – 835.
- Zachman, R. D., and Grummer, M. A. (1998) The interaction of ethanol and vitamin A as a potential mechanism for the pathogenesis of fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **22**, 1544 – 1556.
- Zachman R. D., and Olson J. A. (1961) A comparison of retinene reductase and alcohol dehydrogenase of rat liver. *J. Biol. Chem.* **236**, 2309 – 2313.
- Zheng, Y. W., Bey, M., Liu, H., and Felder, M. R. (1993) Molecular basis of the alcohol dehydrogenase-negative deer mouse. Evidence for deletion of the gene for class I enzyme and identification of a possible new enzyme class. *J. Biol. Chem.* **268**, 24933 – 24939.