

article III

Contribució de B.Crosas en el treball:

- Clonatge del cDNA de l'ADH4 de rata. Triatge d'una biblioteca de cDNA de pulmó de rata en el vector λ gt11
- Anàlisi de la seqüència i comparació en els bancs de dades de seqüències
- Expressió de l'ADH4 de rata en E. coli
 - Clonatge de la regió codificant de l'ADH4 de rata en el vector d'expressió pET5a
 - Optimització de l'expressió i purificació de l'enzim recombinant
- Construcció del mutant A294V d'ADH4 de rata, expressió i purificació
- Caracterització cinètica de l'enzim recombinant de rata i del mutant A294V amb etanol i retinoides
- Construcció del model tridimensional de l'ADH4 de rata.
- Anàlisi de la interacció de retinoides amb els complexos binaris de l'ADH4 humana i del model de l'ADH4 de rata mitjançant moldelatge molecular i simulació de docking

article IV

Contribució de B.Crosas en el treball:

- Clonatge del cDNA de l'ADH d'estómac de Rana perezi mitjançant RT-PCR. Clonatge dels extrems 3' i 5' mitjançant RACE-PCR
- Anàlisi a nivell estructural de l'especificitat de coenzim de l'ADH d'estómac de Rana perezi

article V

Contribució de B.Crosas en el treball:

- Anàlisi de l'activitat ADH en teixits de pollastre mitjançant electroforesi en gel de midó
- Purificació de l'enzim amb activitat ADH de tracte digestiu superior de pollastre
- Extracció de mRNA de teixits de pollastre
- Clonatge del cDNA de l'AKR de pollastre mitjançant RT-PCR. Clonatge dels extrems 3' i 5' mitjançant RACE-PCR
- Anàlisi de la seqüència i comparació amb les bases de dades de seqüències.
- Anàlisi filogenètica de l'AKR de pollastre
- Estudi del patró d'expressió de l'AKR de pollastre mitjançant transferència de Northern
- Caracterització cinètica de l'AKR de pollastre amb diferents alcohols i aldehids, especialment retinoides
- Construcció d'un model tridimensional de l'AKR de pollastre
- Anàlisi de la interacció de retinoides amb els complexos binaris de l'aldosa reductasa humana i del model de l'AKR de pollastre, mitjançant simulació de docking
- Primera redacció de l'article

Resum de resultats i discussió

Resum de Resultats i Discussió

Les funcions etanol i retinol deshidrogenasa de l'ADH4 humana i de rata

En el present treball, s'han estudiat les funcions etanol i retinol deshidrogenasa de l'ADH4. S'han clonat i seqüenciat els cDNAs de les ADH4 humana i de rata, s'ha expressat l'ADH4 de rata en *E. coli*, s'ha construït el mutant ADH4 de rata A294V i s'ha analitzat la posició 294 estructuralment mitjançant un model tridimensional de l'enzim i simulacions de docking amb diversos substrats.

La determinació de l'estructura primària de l'ADH4 humana, deduïda de la seqüència del cDNA, va permetre una anàlisi comparativa amb les de l'ADH1 i de l'ADH4 de rata. Aquesta última, que havia estat elucidada per seqüenciació de la proteïna (Parés et al., 1992), ha estat determinada també a partir de la seqüència del cDNA en la present Tesi Doctoral, la qual cosa ha permès resoldre algunes ambigüitats existents en l'extrem N-terminal.

L'ADH4 humana mostra un valor de K_m amb l'etanol de 40 mM, molt superior al que mostra l'ADH1 humana (0,05-4 mM, Bosron et al., 1983). A més, els valors de K_m exhibits per l'ADH4 humana amb alcohols alifàtics primaris de major grandària són sempre superiors que en l'ADH1 humana (Article II, Taula I). Treballs anteriors havien destacat la regió del loop 114-120 com la possible determinant d'aquestes diferències cinètiques, probablement degudes a la menor longitud del loop en ADH4, per una deleció en la posició 117, ocupada per una Gly en ADH1. L'escurçament del loop 114-120 faria la butxaca d'unió del substrat més ampla, afectant la interacció substrat-enzim (Kedishvili et al., 1995; Xie et al., 1998). Anàlogament al que s'observa en ADH3 (Julià et al., 1987; Parés et al., 1992), la major amplitud de la butxaca d'ADH4 la faria més hidrofílica, havent-se de donar una concentració de substrat més alta per a desplaçar les molècules d'aigua, el que proporcionaria, com a conseqüència, valors de K_m superiors. A més, una butxaca més ampla provocaria un pitjor encaix del substrat en el seti actiu, donant-se un menor nombre d'encontres substrat-enzim catalíticament productius i, així, valors més alts de K_m (Hurley i Vessel, 1995). Aquests fenòmens serien més evidents en substrats de cadena curta, p. e., etanol i propanol. En canvi, en augmentar la grandària del substrat, també augmentaria la seva hidrofobicitat i el nombre d'interaccions d'aquest amb els residus de la butxaca.

La rellevància funcional de la deleció en la posició 117 en l'ADH4 humana s'ha estudiat en els Articles II i III, mitjançant l'anàlisi de l'efecte de la inserció de la Gly117 (mutant G117ins) en l'oxidació d'alcohols alifàtics primaris (d'etanol a hexanol). La inserció de Gly117 produeix una disminució d'aproximadament 4 cops del valor de K_m amb etanol i un increment similar

dels valors de Km amb butanol, pentanol i hexanol, la qual cosa resulta en un lleuger increment de l'eficiència catalítica amb etanol, però en una disminució molt significativa de l'eficiència catalítica amb els alcohols de major grandària, respecte l'ADH4 humana silvestre (Article III, Taula II).

En analitzar com varien els valors d'eficiència catalítica amb els alcohols primaris estudiats, s'observa que, en l'ADH4 humana, augmenten d'una manera molt marcada en incrementar el nombre de carbonis del substrat, produint-se el salt més brusc en passar de propanol a butanol. En el mutant G117ins, en canvi, l'augment de l'eficiència catalítica en incrementar el nombre de carbons del substrat es dona d'una manera progressiva. Aquest comportament, en el mutant G117ins, és similar al que mostren les ADH amb el loop 114-120 més llarg. En canvi, el comportament observat en l'ADH4 humana s'assembla al que mostren altres formes d'ADH amb el loop curt, obtingudes mitjançant mutagènesi dirigida (Article II, Figura 1).

Es va estudiar la interacció dels alcohols alifàtics primaris amb l'ADH4 mitjançant simulacions de docking, utilitzant el pentanol com a substrat. En mesurar les distàncies entre els carbonis de la cadena del pentanol unit i la regió intermèdia de la butxaca d'unió del substrat (loop 114-120 i Val294), es va observar que els carbonis 4 i 5 estableixen contactes de van der Waals amb els residus d'aquesta regió, mentre que els carbonis 2 i 3 no ho feien, quedant el carboni 2 a 6,2 Å del residu 116 (Article II, Figura 2). Així, en ADH4, l'increment marcat del valor d'eficiència catalítica que mostra el butanol respecte el propanol molt probablement sigui degut a les interaccions establertes pel carboni 4 amb la regió intermèdia d'unió del substrat, proporcionant un millor encaix del substrat en la cavitat, i una menor accessibilitat del solvent.

Les ADH4 humana i de rata mostren una diferència molt significativa en els valors de Km per a l'etanol, 15-40 mM i 2,4 M, respectivament. Els dos enzims, que són idèntics en el 88% dels aminoàcids (Article I, Taula I), tenen una butxaca d'unió del substrat definida per residus hidrofòbics i voluminosos. Els residus que la defineixen estan conservats, exceptuant la posicions 116 i 294. En la 116, hi ha un intercanvi Ile (humana) per Leu (rata). En la 294, l'enzim humà hi presenta una Val, com la resta d'ADH humanes i de la majoria de vertebrats, mentre que al de rata hi figura una Ala. La posició 294 es troba, en la regió intermèdia de la butxaca d'unió del substrat, contraposada a la posició 116, que forma part del loop 114-120.

Els mutants V294A i A294V d'ADH4 humana i de rata, respectivament, van mostrar un canvi espectacular en els seus valors de Km amb etanol. El mutant A294V va presentar una Km de 47 mM, 50 vegades inferior a l'ADH4 de rata i similar al valor mostrat per l'ADH4

humana. Inversament, el mutant V294A va experimentar un increment de 280 vegades en el valor de la K_m amb l'etanol (Article III, Taula I).

La substitució Val294 per Ala, un residu menys hidrofòbic i menys voluminós (Kyte i Doolittle, 1982; Perkins, 1986), podria tenir en l'ADH4 de rata, un efecte similar a la deleció en el loop 114-120, essent vàlids també els arguments donats anteriorment. L'estudi d'aquestes posicions en l'estructura tridimensional de l'ADH4 humana (Xie et al., 1997) i en el model de la de rata va revelar que les distàncies atòmiques entre els residus trobats en la posició 294 i en la 116 variaven en els dos enzims i en els corresponents mutants. En l'ADH4 humana, la distància Val294-Ile116 és de 4,8 Å, i en la de rata, la distància Ala294-Leu116, de 6,8 Å. En ambdós casos, aquestes posicions defineixen un coll d'ampolla a l'entrada al centre actiu, però en el cas de l'enzim humà el radi de van der Waals indiquen que l'accessibilitat de les molècules d'aigua quedaria disminuïda (Figura 6). Les distàncies atòmiques calculades per als mutants V294A i A294V són 5,9 i 5,5 Å, respectivament, valors que mostren que l'efecte de les mutacions inverteix les propietats d'aquest coll d'ampolla.

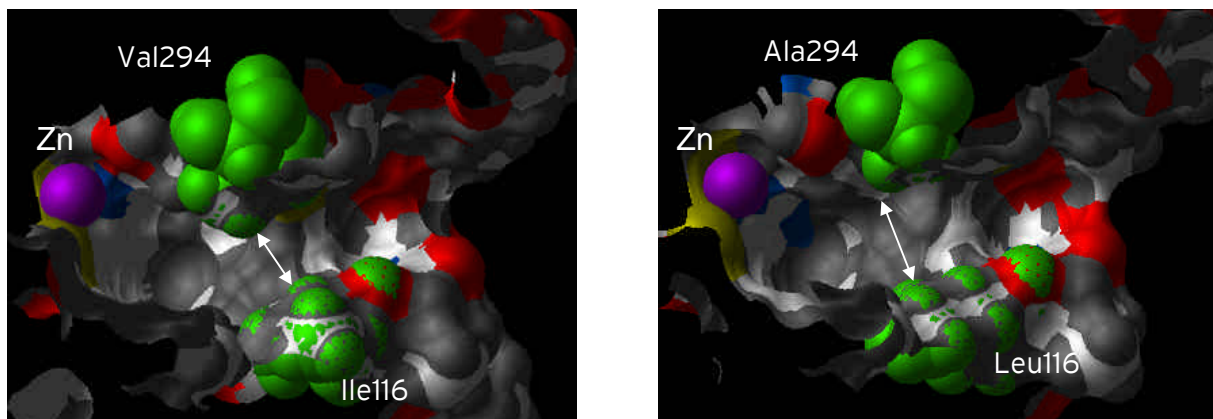


FIGURA 6. Butxaca d'unió del substrat de l'ADH4 humana (esquerra) i de rata (dreta). S'ha representat la superfície de van der Waals dels residus que conformen la cavitat, les posicions 294 i 116 (verd) i el zinc (porpra). Les fletxes blanques indiquen el punt més estret per accedir al seti actiu (vegeu el text).

Un altre dels propòsits d'aquest estudi era determinar l'efecte de les mutacions en les propietats dels enzims amb retinoides. Anteriorment ja s'havia evidenciat l'activitat dels enzims ADH4 amb retinoides (Boleda et al., 1989; Yang et al., 1994; Allali-Hassani et al., 1997), però mai s'havien obtingut dades de l'ADH4 de rata amb els isòmers 9-cis i 13-cis, i tampoc s'havien fet estudis sistemàtics amb els enzims humà i de rata paral·lelament, com en el present estudi. Es van determinar, doncs, les constants cinètiques de l'ADH4 humana i de rata amb els isòmers tot-trans i 9-cis de retinol i retinal. Els dos enzims van ser inactius amb

l'isòmer 13-cis. Els mutants V294A (ADH4 humana) i A294V (ADH de rata) no van mostrar modificacions importants en les seves constants cinètiques amb els isòmers tot-trans i 9-cis respecte els enzims silvestres, a diferència del que s'havia observat amb etanol (Article III, Taules I i III).

La interacció amb els isòmers assajats in vitro es va estudiar mitjançant simulacions de docking amb l'estructura tridimensional de l'ADH4 humana (Xie et al., 1997) i amb el model molecular de l'enzim de rata. Es va observar que tant en l'humà com en el de rata es produïa una unió del tot-trans i 9-cis-retinol que feia possible la reacció, en mostrar distàncies inferiors a 2,5 Å entre l'oxigen de l'hidroxil del substrat i el zinc catalític. En la unió amb el 13-cis-retinol, la molècula va presentar una orientació en la butxaca que no s'havia vist en els altres isòmers, situant-se l'oxigen de l'hidroxil a 3,1-3,3 Å del zinc. La conformació cis del carboni 13, molt proper al C15 amb el grup reactiu, podria conferir a aquest isòmer restriccions topològiques en la seva unió a la butxaca de l'ADH4, que podrien impedir una orientació favorable per a la catàlisi (Article III, Figura 3). No obstant, la capacitat de les estructures ADH4 d'unir el 13-cis-retinol, en les simulacions de docking, és consistent amb la inhibició de l'enzim per aquest isòmer (Allali-Hassani et al., 1998). Els resultats obtinguts amb tot-trans i 9-cis-retinol són similars als obtinguts per altres estudis de docking amb ADH4 (Moreno et al., 1996; Foglio et al., 1999).

D'acord amb aquests resultats, el canvi en la posició 294 és el responsable de les diferències cinètiques de l'ADH4 humana (Val294) i de rata (Ala294) amb l'etanol, explicant que l'enzim de rata sigui molt ineficient en l'oxidació d'aquest substrat. Per contra, també s'ha determinat que aquesta mutació en la posició 294 no té un efecte important en les cinètiques amb els retinoides. Així, l'anàlisi estructura/funció realitzat en aquest treball ens dóna una nova evidència en favor de la funció de l'ADH4 en el metabolisme dels retinoides.

Una nova especificitat de coenzim en una ADH de vertebrat

La cerca de formes similars a l'ADH4 en espècies de no mamífers va impulsar, en el nostre grup, l'estudi del sistema ADH de l'amfibi *Rana perezi*. Es van caracteritzar les formes ADH1 i ADH3 (Cederlund et al., 1991; Peralba et al., 1999). A més, es va estudiar una forma d'ADH que s'expressava en estómac i tracte digestiu superior, amb propietats cinètiques similars a l'ADH4 de mamífer, activa amb alcohols i aldehids alifàtics, amb retinoides i amb un valor de Km per a l'etanol de 600 mM (Peralba, 1997). En el present treball, s'ha clonat el cDNA de l'ADH d'estómac de *Rana perezi* i s'han estudiat les correlacions de l'estructura primària amb la seva funció.

La determinació de l'estructura primària d'aquesta nova forma d'ADH va revelar una seqüència lleugerament més propera a les ADH1 (60% d'identitat) que a les ADH4 (58%). La proximitat estructural amb ADH1 es va fer més evident quan es van comparar els extrems 3' no codificants, observant-se un 47% d'identitat amb ADH1 i només un 22% amb ADH4. Així, aquest nou enzim va presentar similituds amb les ADH4 pel que fa a propietats cinètiques i distribució en teixits (Peralba, 1997), però una major identitat amb les ADH1 a nivell filogenètic, pel que se l'ha designada ADH8, d'acord amb la nova nomenclatura (Duester et al., 1999).

La característica més sorprenent de l'ADH d'estómac de *Rana perezi* va ser la preferència pel NADP(H) en lloc de NAD(H), deduïda, en primera instància, en estudiar-se la seva estructura primària. La posició 222 de la proteïna, corresponent a la 223 de les ADH1, està ocupada per una Gly en lloc d'un Asp, trobat en la resta d'ADH de vertebrats. Estudis cristal·logràfics i de mutagènesi dirigida, realitzats en altres formes d'ADH, havien conclòs que aquest residu, confrontat a la posició 2' de la ribosa de l'adenina del coenzim, determinava l'especificitat de coenzim (Eklund et al., 1984; Fan et al., 1991). A més, posteriorment, s'ha descrit en tres microorganismes (*Clostridium beijerinckii*, *Thermoanaerobacter brockii* i *Entamoeba histolytica*) formes d'ADH que en la posició equivalent a la 223 mostren Gly en lloc d'Asp, i que, efectivament, són enzims dependents de NADP(H) (Kumar et al., 1992; Korkhin et al., 1998).

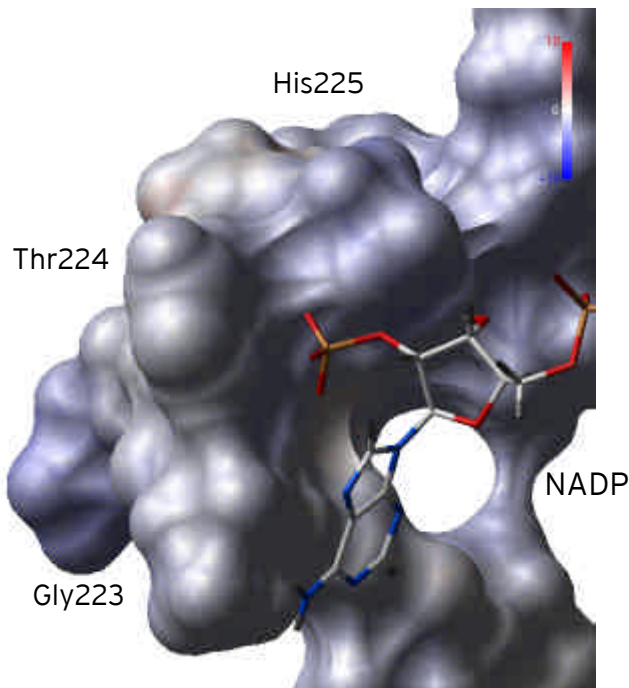


FIGURA 7. Detall de la regió propera al residu G223 i la interacció amb el coenzim. S'ha representat el potencial electrostàtic (en vermell, càrrega negativa, i en blau, càrrega positiva) dels residus propers al fosfat del NADP (cedida per D. Torres).

En general, per a discriminar entre NAD(H) i NADP(H), les deshidrogenases presenten estratègies basades en interaccions estèriques i electrostàtiques. Els aminoàcids propers a la posició 2' de la ribosa de l'adenina són els que determinen l'especificitat de coenzim. Així, els enzims que uneixen NAD(H) presenten un residu acídic (aspàrtic amb més freqüència que glutàmic) i un residu apolar contigu. L'àcid de la cadena lateral estableix ponts d'hidrogen amb el diol de la ribosa del NAD(H) i mostra, en canvi, un efecte electrostàtic de rebuig amb el fosfat del NADP(H). El residu apolar estableix interaccions amb l'adenina (Corugo i Argos; 1997). Els enzims que uneixen NADP(H) no presenten mai cap residu acídic encarant el fosfat de la ribosa, per contra solen tenir residus bàsics coordinant la seva interacció.

La lactat deshidrogenasa i la dihidropteridina reductasa presenten, com l'ADH, un aspàrtic (Asp53 i Asp37, respectivament) que determina especificitat pel NAD(H) (Feeney et al., 1992; Bernard et al., 1995; Grimshaw et al., 1992). En canvi, La glutamat deshidrogenasa presenta una lisina (Lys288) que potencia la unió del NADP(H) (Haeffner-Gormley et al., 1992). Les aldo-ceto reductases, que són dependents de NADP(H), presenten Lys262 i Arg268 (Wilson et al., 1992). Per la seva banda, la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa modifica la preferència de coenzim per dues substitucions que tenen un efecte estèric i hidròfil (Leu187Ala i Pro188Ser) (Corbier et al., 1990). En alguns casos, aquesta especificitat no la

proporcionen un o dos residus, sinó un conjunt. Així, en l'isocitrat deshidrogenasa l'afinitat pel NADP(H) es defineix per quatre residus (Lys344, Tyr345, Tyr391 i Arg395) (Chen et al., 1996; Hurley et al., 1996), i en la malat deshidrogenasa s'han de mutar set residus d'un loop en el lloc d'unió del coenzim per a que passi de NAD(H)-dependent a NADP(H)-dependent (Nishiyama et al., 1993).

En l'ADH I de llevat, es va establir que, tot i la importància de la posició 223 en la discriminació de coenzim, altres posicions haurien de contribuir en la determinació de la preferència NAD(H)/NADP(H) (Fan et al., 1991). De fet, treballs de mutagènesi dirigida en l'ADH8 d'amfibi apunten, de manera preliminar, que la preferència pel NADP(H) depèn, no només del residu en la posició 223, sinó també de les posicions 224 i 225 (Figura 7, Rosell et al., 2000). Els altres residus importants en la unió del coenzim no presenten en ADH8 substitucions que puguin contribuir substancialment en la preferència NAD(H)/NADP(H) (Article IV, Taula). Entre elles, Gly47 és interessant ja que la seva presència, en substitució de residus bàsics, es correlaciona amb valors elevats de kcat (Stone et al. 1993b; Article I), com els trobats en l'ADH8.

La dependència de NADP(H) exhibida per l'ADH d'estómac de *Rana perezi* (ADH8) planteja la qüestió d'una especificitat funcional inèdita en les ADH de vertebrat, ja que molt probablement actua fisiològicament com a reductasa i no com a deshidrogenasa. Les concentracions cel·lulars relatives $NAD^+/NADH$ i $NADP^+/NADPH$ estan desplaçades, de manera que el NAD^+ i el $NADPH$ són les formes majoritàries en teixits de mamífer (Williamson et al., 1974), i hi ha evidències de que en la mucosa gàstrica d'amfibi també és així (Bannister, 1967). A més, les eficiències catalítiques que mostra l'ADH8 són consistentment més altes en les reaccions de reducció que en les d'oxidació (Article IV, Taules II i III). El fet que el tot-trans, el 9-cis i el 13-cis-retinal siguin bons substrats, mostrant el tot-trans-retinal la major eficiència catalítica, suggereixen que aquest enzim té una funció retinal reductasa, a diferència de la funció retinol deshidrogenasa de les ADH de mamífer. La funció retinal reductasa juga un paper en la reducció del retinal generat en l'intestí per l'escissió del β -carotè aportat en la dieta (von Lintig i Vogt, 2000). La reducció de tot-trans-retinal és un dels passos necessaris per a la regeneració de la rodopsina, en el cicle visual, i, en general, és important per a l'homeòstasi dels retinoides, tant en la regulació de la formació d'àcid retinoic a partir de retinal, com en l'emmagatzemament de retinil èsters formats a partir de retinol (Napoli, 1999; Duester, 2000). A més, cal considerar la reducció de tot-trans-retinal com una reacció clau en el desenvolupament d'amfibis, ja que aquest és el retinoide majoritari en els ous i les primeres fases del desenvolupament de *Xenopus* (Scadding i Maden, 1994).

Una aldo-keto reductasa activa amb etanol i retinoides

L'estudi en profunditat de les formes ADH del tracte digestiu de mamífer, i el posterior descobriment i caracterització de l'ADH8 d'estómac d'amfibi, ens van portar a estudiar les formes d'ADH en el tracte digestiu de les aus. Es va escollir el *Gallus domesticus* com a espècie model. L'anàlisi de les activitats etanol i 2-buten-1-ol deshidrogenasa en electroforesi en gel de midó va revelar que la llengua, l'esòfag i l'ull expressaven una forma enzimàtica lleugerament anòdica. Es tractava d'una activitat que preferia NADP⁺ en lloc de NAD⁺, en la reacció de tinció, i clarament diferenciable d'ADH1 i ADH3 (Article V, Figura 1).

Amb l'objectiu d'obtenir el cDNA corresponent a l'enzim responsable d'aquesta activitat, es va dissenyar una estratègia de clonatge basada en les seqüències consens ADH, incloent les ADH1, ADH4 i l'ADH NADP(H)-dependent (ADH8). D'acord amb això, es van dissenyar oligonucleòtids i es va preparar cDNA dels teixits allà on s'havia detectat l'activitat. L'aïllament dels fragments de cDNA obtinguts així va ser infructuós en no trobar cap seqüència ADH, homòloga d'ADH4 o d'ADH8. Sí que es va obtenir un clon amb l'ADH1, ja caracteritzada anteriorment (Estonius et al., 1990), que s'expressaria marginalment en llengua i esòfag, ja que no va ser detectada en electroforesi en gel de midó. Aquest resultat suggeria que els teixits analitzats no expressaven cap ADH-MDR homòloga a l'ADH4 o l'ADH8.

Per tal de determinar la naturalesa estructural de l'enzim responsable de l'activitat dependent de NADP(H), es va optar per l'anàlisi de la proteïna. Es va purificar fins a homogeneïtat l'enzim a partir d'esòfag i de llengua, i es va iniciar la seqüenciació en col.laboració amb el laboratori del Prof. Hans Jörnvall del Karolinska Institutet d'Estocolm. La informació corresponent als primers pèptids seqüenciats va revelar que l'enzim no era cap ADH de la família de les MDR, sinó que l'enzim pertanyia a la família AKR. Així, es van dissenyar oligonucleòtids degenerats complementaris a les seqüències peptídiques obtingudes, i es va procedir al clonatge del cDNA. Els extrems 3' i 5' es van obtenir pel mètode de RACE-PCR. El cDNA complet va ser de 1504 pb, incloent una marc obert de lectura de 317 aminoàcids (Article V, Figura 3). La determinació de seqüència directa de la proteïna va revelar que l'enzim madur contenia 316 aminoàcids amb l'extrem N-terminal acetilat.

En comparar la seqüència AKR completa amb les proteïnes de la superfamília AKR ja conegudes, es va observar un major similitud amb els grups aldosa reductases (AR) i afins a l'aldosa reductasa (AR-like), amb 66-69% i 68-69% d'identitat, respectivament. L'anàlisi filogenètica pel mètode de bootstrap va col.locar la nova seqüència de pollastre molt propera als clusters AR i AR-like (Article V, Figura 5).

La caracterització cinètica de l'enzim purificat dels teixits de pollastre va revelar que es tractava d'una oxidoreductasa dependent de NADP(H), essent la reducció la reacció més

afavorida. L'enzim va resultar ser força ineficient amb aldehids que són substrats característics de les AKR, com gliceraldehid i glioxal, i completament inactiu amb aldoses (glucosa, galactosa, ribosa i xilosa) i esteroides (corticoesterona, epiandroesterona, deshidroisoandrosterona, 5 α -androstan-17 β -ol-3-ona i 5-colesten-3 α -ol-7-ona). En canvi, es va observar que podia oxidar alcohols alifàtics, incloent etanol, pentanol, hexanol i octanol. L'eficiència catalítica amb etanol és molt baixa (0,022 mM⁻¹.min⁻¹), mostrant un valor de Km per a aquest substrat (720 mM) de l'ordre de l'exhibit per l'ADH dependent de NADP(H) de *Rana perezi* (600 mM). D'una manera similar al que s'observa en ADH1 i ADH4, els valors de Km amb alcohols alifàtics van decreixent a mesura que augmenta el nombre de carbonis de la cadena del substrat. En aquest enzim, però, les constants catalítiques amb els alcohols són molt baixes (16-32 min⁻¹), d'acord amb el fet que aquest enzim és molt més efectiu en la reducció que en l'oxidació.

La propietat més interessant d'aquest enzim és la seva activitat amb retinoides. Es van determinar valors de Km de 19-40 μ M per a diferents isòmers de retinol i retinal. Es va observar una elevada eficiència en la reducció de tot-trans i 9-cis-retinal (5300 i 32000 mM⁻¹.min⁻¹, respectivament). Les reaccions de reducció del 13-cis-retinal i d'oxidació del tot-trans i 9-cis-retinol van mostrar un menor eficiència catalítica, i no es va trobar activitat amb 13-cis-retinol (Article V, Taules III i IV).

Les propietats d'aquest enzim amb alcohols alifàtics i retinoides són una novetat en la família de les AKR. Per bé que l'oxidació d'alcohols és una reacció poc eficient per a l'enzim de pollastre i que és molt probable que tingui poca significació fisiològica, sí que és rellevant pel fet que indica un comportament mimètic de les ADH-MDR prèviament caracteritzades en mucoses d'altres vertebrats, especialment en mamífers i amfibis. Aquest fet encara és més evident si es tenen en compte les propietats enfront de retinoides. L'AKR de pollastre mostra una kcat/Km amb 9-cis-retinal molt alta, superior a la que exhibeixen les ADH4 humana i de rata (9000 i 2500 mM⁻¹.min⁻¹, respectivament), i l'ADH8 d'amfibi (7800 mM⁻¹.min⁻¹) per a aquest substrat. També té una eficiència elevada en la reducció de tot-trans-retinal, lleugerament superior a les mostrades per l'ADH4 (1750-3300 mM⁻¹.min⁻¹).

La capacitat que tenen enzims molt diferents d'utilitzar els mateixos substrats demostra que estructures distants poden convergir funcionalment. La convergència funcional a nivell evolutiu ha estat observada en altres famílies d'enzims, essent, actualment un camp d'interès per als enginyers de proteïnes (Orengo et al., 1994; Galperin et al., 1998; Todd et al., 1999). Per exemple, l'activitat disulfur reductasa apareix en la glutatió reductasa humana i en la tioredoxina reductasa d'*Escherichia coli*, tot i que són enzims amb setis actius i mecanismes catalítics diferents (Kuriyan et al., 1991). Un altre exemple d'aquest fenomen en són

l'hexoquinasa, la riboquinasa i la galactokinasa, tres enzims no emparentats estructuralment que realitzen la mateixa reacció de fosforilació de sucres (Bork et al., 1993). També s'ha observat convergència evolutiva entre la D-aminoàcid oxidasa, una oxidasa dependent de FAD, i el flavocitocrom B2, un flavoenzim (dependent de FMN), els quals catalitzen la mateixa reacció d'oxidació d' α -aminoàcids o α -hidroxiàcids, valent-se de centres catalítics amb arquitectures enantiomèriques (Mattevi et al., 1996). Així mateix, els TNF α de vertebrats i d'invertebrats són citoquines que desenvolupen la mateixa funció tot i tenir orígens filogenètics diferents (Beschlin et al., 1999). En un sentit ampli, l'evolució molecular hauria seleccionat aquelles estructures més versàtils, la plasticitat de les quals hauria permès que marcs estructurals molt diferents poguessin evolucionar, i arribar a unir-se i ser actius amb les mateixes molècules, per a desenvolupar funcions similars. En concordança amb aquesta idea, treballs d'anàlisi dels tipus de plegament de proteïnes coneguts revelen que en la naturalesa hi ha cinc superfamílies estructurals (superfolds) més abundants que les altres, i entre aquestes cinc hi figuren el barril (α/β)₈ i el plegament de Rossmann (Todd et al., 1999).

D'acord amb això, MDR, SDR i AKR serien un altre cas d'evolució convergent, i la funció retinal reductasa i retinol deshidrogenasa un exemple de la seva convergència (Figura 8). Aparentment, els teixits de la part superior del tracte digestiu i l'ull dels vertebrats necessiten una oxidoreductasa activa amb retinoides i alcohols. En mamífers, l'ADH4 i diverses SDRs (en ull) poden dur a terme aquesta funció, mentre que en amfibis i en aus, l'ADH8 i l'AKR, respectivament, podrien desenvolupar-la. És interessant l'especialització en l'ús del coenzim d'aquests enzims -NAD(H) en ADH4 i NADP(H) en ADH8 i AKR-, ja que suggereixen diferents adaptacions a la complexitat metabòlica d'aquests teixits, en cada grup de vertebrats.

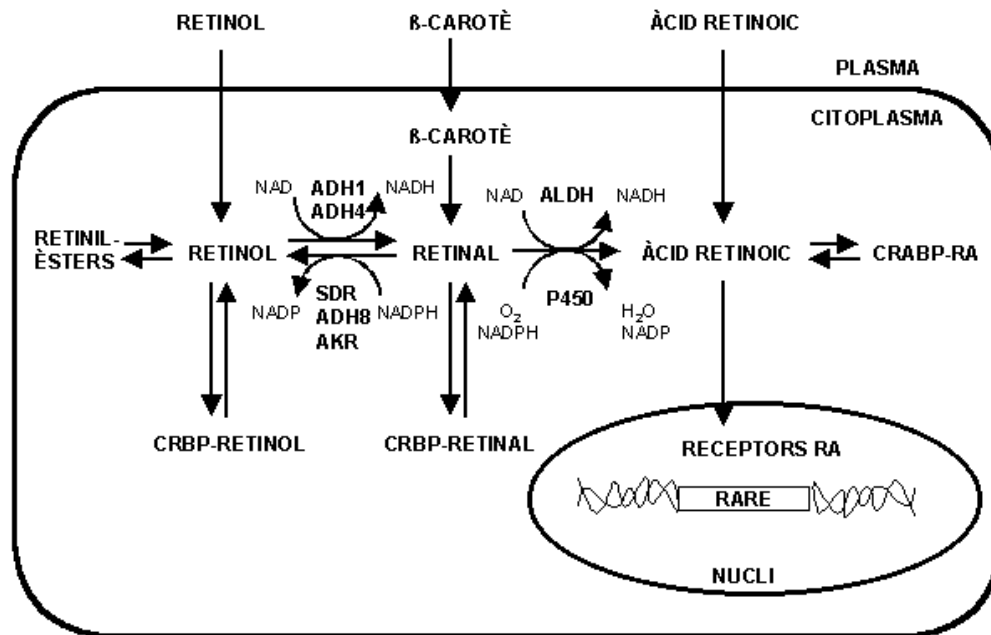


FIGURA 8. Esquema de la via metabòlica dels retinoides, incloent etapes catalitzades per enzims de les famílies ADH, SDR i AKR (modificat de Duester, 1996).

Els enzims de les famílies MDR, SDR i AKR es poden trobar en les mateixes espècies desenvolupant funcions similars. En aquest sentit, s'ha vist que ratolins knock out per a *adh1*, *adh3* o *adh4* es desenvolupen i es reproduïxen amb normalitat amb dietes no deficientes amb vitamina A (Deltour et al., 1999), la qual cosa revela que les funcions desenvolupades per a cada un d'aquests tres gens pot estar coberta per les altres dues ADH o per altres gens, ja siguin de la família MDR com de les SDR, AKR o altres tipus d'enzims. La redundància de gens per a determinades funcions biològiques pot ser entesa com a un dispositiu que probablement augmenta la capacitat de supervivència dels organismes.

Conclusions

Conclusions

ADH4 humana i de rata

1. El cDNA de l'ADH4 humana conté un total de 2055 pb, amb una pauta oberta de lectura de 1158 pb, i regions 5' i 3' no codificants de 24 i 873 pb, respectivament. La seqüència proteica resultant conté 374 aminoàcids, amb una identitat amb les altres ADH humanes de 59-70%, mostrant el valor més alt (70%) amb l'ADH1. Una diferència notable respecte les ADH1 és la deleció de l'aminoàcid que correspondria a la posició 117.
2. El cDNA de l'ADH4 de rata, clonat a partir d'una biblioteca de cDNA i mitjançant RT-PCR, conté un total de 2052 pb, amb una pauta oberta de lectura de 1122 pb, i regions 5' i 3' no codificants de 57 i 873 pb, respectivament. L'extrem N-terminal de l'ADH4 de rata conté la seqüència MDTAG, en lloc de -SNRV, que s'havia proposat provisionalment en la seqüenciació de la proteïna.
3. L'estructura primària de l'ADH4 de rata es típica de les ADH-MDR de mamífer. Així, l'estructura terciària de l'ADH4 de rata, amb una identitat seqüencial del 88% amb la humana, és compatible amb l'arquitectura general de les ADH, el que ha permès la construcció del seu model molecular.
4. Els estudis cinètics realitzats amb l'ADH4 de rata recombinant i el mutant A294V (en paral·lel amb la mutació recíproca realitzada en l'ADH4 humana) indiquen que la posició 294 és responsable, en gran mesura, de les diferències cinètiques entre aquests dos enzims enfront de l'etanol. Aquestes mutacions, no obstant, no modifiquen significativament les propietats dels enzims ADH4 enfront dels retinoides.
5. La distància Ile116-Val294, en l'estructura de l'ADH4 humana, és de 4,8 Å. En el model estructural de l'ADH4 de rata, la distància Leu116-Ala294 és de 6,8 Å. Aquests valors indiquen que, en l'enzim humà, l'accessibilitat al seti actiu resulta disminuïda.
6. L'estudi de docking, amb els isòmers de retinol assajats in vitro revela que el tot-trans, el 9-cis i el 13-cis-retinol poden unir-se a la butxaca d'unió del substrat de l'ADH4 humana i de rata. La distància entre l'oxigen del grup hidroxil del substrat i el zinc catalític és inferior a 2,5 Å en el cas dels isòmers tot-trans i 9-cis, i adopten una orientació en la cavitat adequada per a una interacció catalíticament productiva. En canvi, l'isòmer 13-cis

mostra una orientació i una distància amb el zinc que no són compatibles amb un estat de transició.

7. El conjunt d'evidències acumulades suggereix que l'ADH4 té la funció retinol deshidrogenasa conservada en home i rata, i, probablement, en altres mamífers. No és així en el cas de la funció etanol deshidrogenasa, molt més rellevant en l'ADH4 humana que en l'enzim de rata.

ADH d'estómac de Rana perezi

8. El cDNA de l'ADH d'estómac de Rana perezi conté un total de 1268 pb, amb una pauta oberta de lectura de 1122 pb i una regió 3' no traduïda de 144 pb. La seqüència mostra un 60% d'identitat amb les ADH1 i un 58% amb les ADH4 de mamífer. La proximitat estructural amb ADH1 es fa més evident quan es comparen els extrems 3' no codificants, observant-se un 47% d'identitat amb ADH1 i un 22% amb ADH4.
9. El tret estructural més peculiar de l'ADH d'estómac de Rana perezi és la substitució de l'Asp223, conservat en totes les ADH de vertebrat, per Gly. En les ADH, l'Asp223 determina la preferència per NAD(H) en lloc de NADP(H). A més, l'entorn més hidrofílic, definit per les substitucions Ile224Thr i Asn225His, podria contribuir en la dependència de NADP(H). Les característiques úniques de l'ADH d'estómac de Rana perezi fan que constitueixi una classe diferenciada d'ADH, anomenada ADH8.

AKR de Gallus domesticus

10. El tracte digestiu superior i l'ull de pollastre (Gallus domesticus) contenen un enzim dependent de NADP(H), actiu amb etanol i retinoides (funcionalment similar a ADH4 i ADH8). Estructuralment, aquest enzim pertany a la família de les aldo-ceto reductases (AKR).
11. El cDNA de l'AKR de pollastre conté un total de 1504 pb, amb una pauta oberta de lectura de 951 pb, i regions 5' i 3' no codificants de 44 i 509 pb, respectivament. L'enzim actiu és un monòmer de 36 kDa. L'AKR de pollastre mostra una identitat seqüencial del 66-69% amb les aldosa reductases i del 68-69% amb les aldosa reductases-like.
12. L'estudi del patró d'expressió, mitjançant transferència Northern, indica que aquest enzim s'expressa en llengua, esòfag i ull, però no en fetge, cervell, cor, múscul esquelètic i instestí prim.

13. A diferència de les aldosa reductases, l'AKR de pollastre no és activa ni amb glucosa i altres aldoses, ni amb esteroides i, en canvi, és activa amb etanol i altres alcohols alifàtics primaris. A més, és molt eficient en la reducció de tot-trans i 9-cis-retinal. Aquestes característiques no havien estat mai trobades en enzims de la família AKR.

14. L'anàlisi de la seqüència i l'estudi del model de l'estructura terciària de l'AKR de pollastre indiquen que els residus que conformen la cavitat on s'uneix el substrat són majoritàriament hidrofòbics. Les posicions 47 i 111, molt properes al centre actiu de l'enzim i importants per a l'especificitat de substrat, estan ocupades per Phe i Tyr, respectivament, aminoàcids mai trobats simultàniament en una AKR. Els estudis de docking mostren que el tot-trans i el 9-cis-retinal es poden unir a l'AKR de pollastre, i l'oxigen del seu grup aldehid ocupa una posició, respecte la Tyr48 i la nicotinamida del NADP, compatible amb la catàlisi. Simulacions realitzades amb l'estructura de l'aldosa reductasa humana, resolta per cristal·lografia de raigs X, indiquen que el tot-trans i el 9-cis-retinal també podrien ser substrats d'aquest enzim.

15. El pollastre, que aparentment no conté cap ADH de la família MDR específica de tracte digestiu superior i ull, conté una AKR amb propietats similars a l'ADH4 de mamífer i l'ADH8 d'amfibi, pel que fa les funcions etanol i retinol deshidrogenasa. A més, l'AKR de pollastre comparteix amb l'ADH8 una major especificitat pel NADP(H). Per tant, les ADH-MDR i les AKR constitueixen un nou cas de convergència funcional a nivell evolutiu.

Bibliografia

Bibliografia

- Aiello, L.P., Avery, R.L., Arrigg, P.G., Keyt, B.A., Jampel, H.D., Shah, S.T., Pasquale, L.R., Thieme, H., Iwamoto, M.A., Park, J.E., et al. (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1480-1487.
- Albalat, R., Marfany, G. i González-Duarte R. (1994) Analysis of nucleotide substitutions and amino acid conservation in the *Drosophila* Adh genomic region. *Genetica* **94**, 27-36.
- Algar, E.M., Seeley, T.L. i Holmes, R.S. (1983) Purification and molecular properties of mouse alcohol dehydrogenase isozymes. *Eur. J. Biochem.* **137**, 139-147.
- Algar, E.M., VandeBerg, J.L. i Holmes, R.S. (1992) A gastric alcohol dehydrogenase in the baboon: purification and properties of a 'high-Km' enzyme, consistent with a role in 'first pass' alcohol metabolism. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **16**, 922-927.
- Allali-Hassani, A. (1997) Functional and structural characterization of the human class IV alcohol dehydrogenase (σ -ADH). Heterologous expression and site-directed mutagenesis. *Tesi Doctoral*
- Allali-Hassani, A., Martínez, S.E., Peralba, J.M., Vaglenova, J., Vidal, F., Richart, C., Farrés J. i Parés, X. (1997) Alcohol dehydrogenase of human and rat blood vessels. Role in ethanol metabolism. *FEBS Lett.* **405**, 26-30.
- Allali-Hassani, A., Peralba, J.M., Martras, S., Farrés, J. i 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.
- Allenby, G., Bocquel, M.T., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Rosenberger, M., Lovey, A., Kastner, P., Grippo, J.F., Chambon, P., et al. (1993) Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 30-34.
- Altamirano, M.M., Blackburn, J.M., Aguayo, C. i Fersht, A.R. (2000) Directed evolution of new catalytic activity using the alpha/beta-barrel scaffold. *Nature* **403**, 617-622.
- Ang, H.L., Deltour, L., Zgombic-Knight, M., Wagner, M.A. i Duester, G. (1996a) 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.
- Ang, H.L., Deltour, L., Hayamizu, T.F., Zgombic-Knight, M. i Duester, G. (1996b) 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.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E. i Stohs, S.J. (1993) Carbon-tetrachloride-induced urinary excretion of formaldehyde, malondialdehyde, acetaldehyde and acetone in rats. *Pharmacology* **47**, 209-216.
- Bannister, W.H. (1967) The oxidation-reduction state of pyridine nucleotide in isolated frog gastric mucosa. *Experientia* **23**, 715-716.
- Barycki, J.J., O'Brien, L.K., Bratt, J.M., Zhang, R., Sanishvili, R., Strauss, A.W. i Banaszak, L.J. (1999) Biochemical characterization and crystal structure determination of human heart short chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase provide insights into catalytic mechanism. *Biochemistry* **38**, 5786-5798.
- Baylor, D. (1996) How photons start vision. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, **93**, 560-565.
- Benach, J., Atrian, S., González-Duarte, R., Ladenstein, R. (1998) The refined crystal structure of *Drosophila lebanonensis* alcohol dehydrogenase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **282**, 383-399.
- Benach, J., Atrian, S., González-Duarte, R., Ladenstein, R.. (1999) The catalytic reaction and inhibition mechanism of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: observation of an enzyme-bound NAD-ketone adduct at 1.4 Å resolution by X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* **289**, 335-355.
- Bennett, M.J., Schlegel, B.P., Jez, J.M., Penning, T.M. i Lewis, M. (1996) Structure of 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase complexed with NADP+. *Biochemistry* **35**, 10702-10711.
- Bernard, N., Johnsen, K., Holbrook, J.J. i Delcour, J. (1995) D175 discriminates between NADH and NADPH in the coenzyme binding site of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* D-lactate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 895-900.

- Beschin, A., Bilej, M., Brys, L., Torreele, E., Lucas, R., Magez, S. i De Baetselier, P. (1999) Convergent evolution of cytokines. *Nature* **400**, 627-628.
- Bjorkhem, I., Jörnvall, H. i Zeppezauer, E. (1973) Oxidation of omega-hydroxylated fatty acids and steroids by alcohol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 413-420.
- Blair, A.H. i Vallee, B.L. (1966) Some catalytic properties of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **5**, 2026-2034.
- Blakley, P.M. i Scott, W.J. Jr. (1984) Determination of the proximate teratogen of the mouse fetal alcohol syndrome. 1/2. Teratogenicity of ethanol and acetaldehyde. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **72**, 355-371.
- Bohren, K.M., Bullock, B., Wermuth, B., i Gabbay, K.H. (1989) The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *J. Biol. Chem.* **264**, 9547-9551.
- Bohren, K.M., Grimshaw, C.E. i Gabbay, K.H. (1992) Catalytic effectiveness of human aldose reductase. Critical role of C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **267**, 20965-20970.
- Boleda, M.D., Julià, P., Moreno, A. i 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. i 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.
- Bork, P., Sander, C. i Valencia, A. (1993) Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Sci.* **2**, 31-40.
- Borràs, E., Coutelle, C., Rosell, A., Fernández-Muixí, F., Broch, M., Crosas, B., Hjelmqvist, L., Lorenzo, A., Gutiérrez, C., Santos, M., Szczepanek, M., Heilig, M., Quattrocchi, P., Farrés J, Vidal, F., Richart, C., Mach, T., Bogdal, J., Jörnvall, H., Seitz, H.K., Couzigou, P., i Parés, X. (2000) Genetic polymorphism of alcohol dehydrogenase in europeans: the ADH2*2 allele decreases the risk for alcoholism and is associated with ADH3*1. *Hepatology* **31**, 984-989.
- Bosron, W.F., Li, T.K., Dafeldecker, W.P. i Vallee, B.L. (1979) Human liver pi-alcohol dehydrogenase: kinetic and molecular properties. *Biochemistry* **20**, 1101-1105.
- Bosron, W.F., Magnes, L.J. i Li, T.K. (1983) Kinetic and electrophoretic properties of native and recombined isoenzymes of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **22**, 1852-1857.
- Bosron, W.F., Yin, S.J. i Li, T.K. (1985a) Purification and characterization of human liver beta 1 beta 1, beta 2 beta 2 and beta 1nd beta 1nd alcohol dehydrogenase isoenzymes. *Prog. Clin. Biol. Res.* **174**, 193-206.
- Bosron, W.F., Gaither, J.W. i Magnes, L.J. (1985b) Kinetic characterization of two classes of dog liver alcohol dehydrogenase isoenzymes. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **9**, 228-234.
- Bosron, W.F. i Li, T.K. (1986) Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology* **6**, 502-510.
- Bränden, C.I., Eklund, H., Nordstrom, B., Boiwe, T., Soderlund, G., Zeppezauer, E., Ohlsson, I. i Akeson, A. (1973) Structure of liver alcohol dehydrogenase at 2.9-angstrom resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2439-2442.
- Bränden, C.I. i Eklund, H. (1977) Coenzyme-induced conformational changes and substrate binding in liver alcohol dehydrogenase. *Ciba Found. Symp.* **60**, 63-80.
- Bränden, C.I. i Eklund, H. (1980) Structure and mechanism of liver alcohol dehydrogenase, lactate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Experientia Suppl.* **36**, 40-84.
- Breton, R., Housset, D., Mazza, C. i Fontecilla-Camps, J.C. (1996) The structure of a complex of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and NADP⁺ identifies two principal targets for the design of inhibitors. *Structure* **4**, 905-915.
- Bühler, R., Hempel, J., Kaiser, R., von Wartburg, J.P., Vallee, B.L. i Jörnvall, H. (1984) Human alcohol dehydrogenase: structural differences between the beta and gamma subunits suggest parallel duplications in isoenzyme evolution and predominant expression of separate gene descendants in livers of different mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6320-6324.

- Canestro, C., Hjelmqvist, L., Albalat, R., Garcia-Fernandez, J., Gonzalez-Duarte, R. i Jornvall, H. (2000) Amphioxus alcohol dehydrogenase is a class 3 form of single type and of structural conservation but with unique developmental expression. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6511-6518.
- Cao, D., Fan, S.T. i Chung, S.S. (1998) Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J. Biol. Chem.* **273**, 11429-11435.
- Carugo, O. i Argos, P. (1997) NADP-dependent enzymes. I: Conserved stereochemistry of cofactor binding. *Proteins* **28**, 10-28.
- Cederbaum, A.I., Pietrusko, R., Hempel, J., Becker, F.F. i Rubin, E. (1975) Characterization of a nonhepatic alcohol dehydrogenase from rat hepatocellular carcinoma and stomach. *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 348-360.
- Cederlund, E., Peralba, J.M., Parés, X. i 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., Zhai, Y. i 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. i Popescu, G. i 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. i Napoli, J.L. (1996) Cloning of a rat cDNA encoding retinol dehydrogenase isozyme type III. *Gene* **169**, 219-222.
- Chai, X., Zhai, Y. i Napoli, J.L. (1997). cDNA cloning and characterization of a cis-retinol/3alpha-hydroxysterol short-chain dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**, 33125-33131.
- Chao, Y.C., Wang, M.F., Tang, H.S., Hsu, C.T. i Yin, S.J. (1994) Genotyping of alcohol dehydrogenase at the ADH2 and ADH3 loci by using a polymerase chain reaction and restriction-fragment-length polymorphism in Chinese alcoholic cirrhotics and non-alcoholics. *Proc. Natl. Sci. Coun. Repub. China* **18**, 101-106.
- Chao, Y.C., Young, T.H., Tang, H.S. i Hsu, C.T. (1997) Alcoholism and alcoholic organ damage and genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes in Chinese patients. *Hepatology* **25**, 112-117.
- Chen, R., Grobler, J.A., Hurley, J.H. i Dean, A.M. (1996) Second-site suppression of regulatory phosphorylation in *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase. *Protein Sci.* **5**, 287-295.
- Chen, R., Greer, A.F. i Dean, A.M. (1997) Structural constraints in protein engineering--the coenzyme specificity of *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **250**, 578-582.
- Chen, W.J., Loh, E.W., Hsu, Y.P., Chen, C.C., Yu, J.M. i Cheng, A.T. (1996) Alcohol-metabolising genes and alcoholism among Taiwanese Han men: independent effect of ADH2, ADH3 and ALDH2. *Br. J. Psychiatry* **168**, 762-776.
- Chen, C.S. i Yoshida, A. (1991) Enzymatic properties of the protein encoded by newly cloned human alcohol dehydrogenase ADH6 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 743-747.
- Cideciyan, A.V., Haeseleer, F., Fariss, R.N., Aleman, T.S., Jang, G.F., Verlinde, C.L., Marmor, M.F., Jacobson, S.G. i 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.
- Consalvi, V., Mårdh, G. i Vallee, B.L. (1986) Human alcohol dehydrogenases and serotonin metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 1009-1016.
- Corbier, C., Clermont, S., Billard, P., Skarzynski, T., Branlant, C., Wonacott, A. i Branlant, G. (1990) Probing the coenzyme specificity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **29**, 7101-7106.
- Cronholm, T., Larsen, C., Jvovall, J., Theorell, H. i Akesson, A. (1975) Steroid oxidoreductase activity of alcohol dehydrogenases from horse, rat, and human liver. *Acta. Chem. Scand. B.* **29**, 571-576.
- Crosas, B. (1994) Anàlisi genotípica de l'ADH1 humana i clonació del cDNA de l'ADH4 humana. Memòria tercer cicle.
- Dafeldecker, W.P., Meadow, P.E., Parés, X. i Vallee, B.L. (1981) Simian liver alcohol dehydrogenase: isolation and characterization of isoenzymes from *Macaca mulatta*. *Biochemistry* **20**, 6729-6734.

- Dafeldecker, W.P., Parés, X., Vallee, B.L., Bosron, W.F. i Li, T.K. (1981) Simian liver alcohol dehydrogenase: isolation and characterization of isoenzymes from *Saimiri sciureus*. *Biochemistry* **20**, 856-861.
- Danielsson, O., Eklund, H. i 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.
- Danielsson, O., Shafqat, J., Estonius, M. i Jörnvall, H. (1994) Alcohol dehydrogenase class III contrasted to class I. Characterization of the cyclostome enzyme, the existence of multiple forms as for the human enzyme, and distant cross-species hybridization. *Eur. J. Biochem.* **225**, 1081-1088.
- Davis, G.J., Bosron, W.F., Stone, C.L., Owusu-Dekyi, K. i Hurley, T.D. (1996) X-ray structure of human beta3beta3 alcohol dehydrogenase. The contribution of ionic interactions to coenzyme binding. *J. Biol. Chem.* **271**, 17057-17061.
- Deetz, J.S., Luehr, C.A. i Vallee, B.L. (1984) Human liver alcohol dehydrogenase isozymes: reduction of aldehydes and ketones. *Biochemistry* **23**, 6822-6828.
- Deltombe-Lietaert, M.C., Delcour, J., Lenelle-Monfort, N. i Elens, A. (1979) Ethanol metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Experientia* **35**, 579-581.
- Deltour, L., Foglio, M.H. i Duester, G. (1999a) Impaired retinol utilization in Adh4 alcohol dehydrogenase mutant mice. *Dev. Genet.* **25**, 1-10.
- Deltour, L., Foglio, M.H. i 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.
- Detmar, M. 2000 The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. *J. Dermatol. Sci.* **24**, S78-S84.
- de Vries, C., Escobedo, J.A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. i Williams, L.T. (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**, 989-991.
- De Winter, H.L. i von Itzstein, M. (1995) Aldose reductase as a target for drug design: molecular modeling calculations on the binding of acyclic sugar substrates to the enzyme. *Biochemistry* **34**, 8299-8308.
- Díaz, B.V., Lenoir, M.C., Ladoux, A., Frelin, C., Demarchez, M. i Michel, S. (2000) Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J. Biol. Chem.* **275**, 642-650.
- Didierjean, C., Rahuel-Clermont, S., Vitoux, B., Dideberg, O., Branlant, G. i Aubry, A. (1997) A crystallographic comparison between mutated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Bacillus stearothermophilus* complexed with either NAD⁺ or NADP⁺. *J. Mol. Biol.* **268**, 739-759.
- Ditlow, C.C., Holmquist, B., Morelock, M.M. i Vallee, B.L. (1984) Physical and enzymatic properties of a class II alcohol dehydrogenase isozyme of human liver: π -ADH. *Biochemistry* **23**, 6363-6368.
- Dolferus, R., Osterman, J.C., Peacock, W.J. i Dennis, E.S. (1997) Cloning of the Arabidopsis and rice formaldehyde dehydrogenase genes: implications for the origin of plant ADH enzymes. *Genetics* **146**, 1131-1141.
- Donohue, P.J., Alberts, G.F., Hampton, B.S. i Winkles, J.A. (1994) A delayed-early gene activated by fibroblast growth factor-1 encodes a protein related to aldose reductase. *J Biol. Chem.* **269**, 8604-8609.
- Downes, J.E. i Holmes, R.S. (1995) Purification and properties of murine corneal alcohol dehydrogenase. Evidence for class IV ADH properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* **372**, 349-354.
- Dräger, U.C., Wagner, E. i McCaffery, P. (1998) Aldehyde dehydrogenases in the generation of retinoic acid in the developing vertebrate: a central role of the eye. *J. Nutr.* **128**, 463S-466S.
- Driessen, C.A., Janssen, B.P., Winkens, H.J., van Vugt, A.H., de Leeuw, T.L. i Janssen, J.J. (1995) Cloning and expression of a cDNA encoding bovine retinal pigment epithelial 11-cis retinol dehydrogenase. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**, 1988-1996.
- Duax, W.L., Ghosh, D. i Pletnev, V. (2000) Steroid dehydrogenase structures, mechanism of action, and disease. *Vitam. Horm.* **58**:121-148.

- Duester, G., Hatfield, G.W., Bühler, R., Hempel, J., Jörnvall, H. i Smith, M. (1984) Molecular cloning and characterization of a cDNA for the beta subunit of human alcohol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4055-4059.
- Duester, G., Shean, M.L., McBride, M.S. i Stewart, M.J. (1991) Retinoic acid response element in the human alcohol dehydrogenase gene ADH3: implications for regulation of retinoic acid synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1638-1646.
- Duester, G. (1996) Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* **35**, 12221-12227.
- 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., Farrés, J., Felder, M.R., Holmes, R.S., Höög, J.O., Parés, X., Plapp, B.V., Yin, S.J. i Jörnvall, H. (1999) Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Biochem Pharmacol.* **58**, 389-395.
- Duester, G. (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4315-4524.
- Eklund, H., Nordstrom, B., Zeppezauer, E., Soderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T., Soderberg, B.O., Tapia, O., Bränden, C.I. i Akeson, A. (1976) Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2-4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **102**, 27-59.
- Eklund, H. i Bränden, C.I. (1979) Structural differences between apo- and holoenzyme of horse liver alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **254**, 3458-3461.
- Eklund, H., Samama, J.P. i Jones, T.A. (1984) Crystallographic investigations of nicotinamide adenine dinucleotide binding to horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **23**, 5982-5996.
- Eklund, H., Muller-Wille, P., Horjales, E., Futer, O., Holmquist, B., Vallee, B.L., Höög, J.O., Kaiser, R. i Jörnvall, H. (1990) Comparison of three classes of human liver alcohol dehydrogenase. Emphasis on different substrate binding pockets. *Eur. J. Biochem.* **193**, 303-310.
- Engeland, K., Höög, J.O., Holmquist, B., Estonius, M., Jörnvall, H. i Vallee, B.L. (1993) Mutation of Arg-115 of human class III alcohol dehydrogenase: a binding site required for formaldehyde dehydrogenase activity and fatty acid activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2491-2494.
- Estonius, M., Karlsson, C., Fox, E.A., Höög, J.O., Holmquist, B., Vallee, B.L., Davidson, W.S. i Jörnvall, H. (1990) Avian alcohol dehydrogenase: the chicken liver enzyme. Primary structure, cDNA-cloning, and relationships to other alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **194**, 593-602.
- Estonius, M., Höög, J.O., Danielsson, O. i Jörnvall, H. (1994a) Residues specific for class III alcohol dehydrogenase. Site-directed mutagenesis of the human enzyme. *Biochemistry* **33**, 15080-15085.
- Estonius, M., Hjelmqvist, L. i Jörnvall, H. (1994b) Diversity of vertebrate class I alcohol dehydrogenase. Mammalian and non-mammalian enzyme functions correlated through the structure of a ratite enzyme. *Eur. J. Biochem.* **224**, 373-378.
- Fan, F., Lorenzen, J.A. i Plapp, B.V. (1991) An aspartate residue in yeast alcohol dehydrogenase I determines the specificity for coenzyme. *Biochemistry* **30**, 6397-6401.
- Feeney, R., Clarke, A.R. i Holbrook, J.J. (1990) A single amino acid substitution in lactate dehydrogenase improves the catalytic efficiency with an alternative coenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 667-672.
- Feener, E.P. i King, G.L. (1997) Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Lancet* **350**, S9-S13.
- Feldman, M.Y. (1973) Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **13**, 41-49.
- Felsted, R.L., Gee, M. i Bachur, N.R. (1974) Rat liver daunorubicin reductase. An aldo-keto reductase. *J. Biol. Chem.* **249**, 3672-3679.
- Fernández, M.R., Biosca, J.A., Torres, D., Crosas, B. i Parés, X. (1999) A double residue substitution in the coenzyme-binding site accounts for the different kinetic properties between yeast and human formaldehyde dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **274**, 37869-37875.

- Ferris, F.L., Davis, M.D. i Aiello, L.M. (1999) Treatment of diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.* **341**, 667-678.
- Filling, C., Marschall, H.U., Prozorovski, T., Nordling, E., Persson, B., Jörnvall, H. i Oppermann, U.C. (1999) Structure-function relationships of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenases involved in bile acid metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**, 389-394.
- Fliegmann, J. i Sandermann, H. Jr. (1997) Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase cDNA: a novel plant gene of detoxification. *Plant. Mol. Biol.* **34**, 843-854.
- Foglio, M.H. i Duester, G. (1999) Molecular docking studies on interaction of diverse retinol structures with human alcohol dehydrogenases predict a broad role in retinoid ligand synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1432**, 239-250.
- Frey, W.A. i Vallee, B.L. (1980) Digitalis metabolism and human liver alcohol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 924-927.
- Gabbay, K.H. (1975) Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annu. Rev. Med.* **26**, 521-536.
- Galperin, M.Y., Walker, D.R. i Koonin, E.V. (1998) Analogous enzymes: independent inventions in enzyme evolution. *Genome. Res.* **8**, 779-790.
- Ghosh, D., Wawrzak, Z., Weeks, C.M., Duax, W.L. i Erman, M. (1994) The refined three-dimensional structure of 3 alpha,20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and possible roles of the residues conserved in short-chain dehydrogenases. *Structure* **2**, 629-640.
- Ghyselinck, N.B., Bavik, C., Sapin, V., Mark, M., Bonnier, D., Hindelang, C., Dierich, A., Nilsson, C.B., Hakansson, H., Sauvant, P., Azais-Braesco, V., Frasson, M., Picaud, S. i Chambon, P. (1999) Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J.*, **18**, 4903-4914.
- Giri, P.R., Krug, J.F., Kozak, C., Moretti, T., O'Brien, S.J., Seuanez, H.N. i Goldman, D. (1989) Cloning and comparative mapping of a human class III (chi) alcohol dehydrogenase cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 453-460.
- Goedde, H.W., Agarwal, D.P., Fritze, G., Meier-Tackmann, D., Singh, S., Beckmann, G., Bhatia, K., Chen, L.Z., Fang, B., Lisker, R., et al. (1992) Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Hum. Genet.* **88**, 344-346.
- González-Fernández, F., Kurz, D., Bao, Y., Newman, S., Conway, B.P., Young, J.E., Han, D.P. i Khani, S.C. (1999) 11-cis retinol dehydrogenase mutations as a major cause of the congenital night-blindness disorder known as fundus albipunctatus. *Mol. Vis.* **5**, 41.
- González, R.G., Barnett, P., Aguayo, J., Cheng, H.M. i Chylack, L.T. (1984) Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes* **33**, 196-199.
- Graymore, C.N., Kissum, R.D. i Fernando, J.C. (1974) Coenzyme dependency of alcohol dehydrogenase in the retina of the rat. IV. Retinol dehydrogenase (RDH) activity in the developing normal and retinitis rat retina, and the effect on enzyme activity of increasing concentrations of NAD or NADP. *Exp. Eye. Res.* **19**, 167-174.
- Grimshaw, C.E., Matthews, D.A., Varughese, K.I., Skinner, M., Xuong, N.H., Bray, T., Hoch, J. i Whiteley, J.M. (1992) Characterization and nucleotide binding properties of a mutant dihydropteridine reductase containing an aspartate 37-isoleucine replacement. *J. Biol. Chem.* **267**, 15334-15339.
- Grimshaw, C.E. (1992) Aldose reductase: model for a new paradigm of enzymic perfection in detoxification catalysts. *Biochemistry* **31**, 10139-10145.
- Haeffner-Gormley, L., Chen, Z., Zalkin, H. i Colman, R.F. (1992) Importance of lysine-286 at the NADP site of glutamate dehydrogenase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* **31**, 7807-7814.
- Haeseleer, F., Huang, J., Lebioda, L., Saari, J.C. i 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. i Yin, S.J. (1998) Contribution to first-pass metabolism of ethanol and inhibition by ethanol for retinol oxidation in human alcohol dehydrogenase family—implications for etiology of fetal alcohol syndrome and alcohol-related diseases. *Eur. J. Biochem.* **254**, 25-31.

- Haselbeck, R.J., Ang, H.L. i Duester, G. (1997a) Class IV alcohol/retinol dehydrogenase localization in epidermal basal layer: potential site of retinoic acid synthesis during skin development. *Dev. Dyn.* **208**, 447-453.
- Haselbeck, R.J., Ang, H.L., Deltour, L. i Duester, G. (1997b) Retinoic acid and alcohol/retinol dehydrogenase in the mouse adrenal gland: a potential endocrine source of retinoic acid during development. *Endocrinology* **138**, 3035-3041.
- Hayes, J.D., Judah, D.J. i Neal, G.E. (1993) Resistance to aflatoxin B1 is associated with the expression of a novel aldo-keto reductase which has catalytic activity towards a cytotoxic aldehyde-containing metabolite of the toxin. *Cancer Res.* **53**, 3887-3894.
- Heesom, A.E., Hibberd, M.L., Millward, A. i Demaine, A.G. (1997) Polymorphism in the 5'-end of the aldose reductase gene is strongly associated with the development of diabetic nephropathy in type I diabetes. *Diabetes* **46**, 287-291.
- Hjelmqvist, L., Metsis, M., Persson, H., Höög, J.O., McLennan, J. i Jörnvall, H. (1995) Alcohol dehydrogenase of class I: kiwi liver enzyme, parallel evolution in separate vertebrate lines, and correlation with 12S rRNA patterns. *FEBS Lett.* **367**, 306-310.
- Hjelmqvist, L., Shafqat, J., Siddiqi, A.R. i Jörnvall, H. (1996) Linking of isozyme and class variability patterns in the emergence of novel alcohol dehydrogenase functions. Characterization of isozymes in *Uromastix hardwickii*. *Eur. J. Biochem.* **236**, 563-570.
- Hempel, J., Bühler, R., Kaiser, R., Holmquist, B., de Zalenski, C., von Wartburg, J.P., Vallee, B. i Jörnvall, H. (1984) Human liver alcohol dehydrogenase. 1. The primary structure of the α -isoenzyme. *Eur. J. Biochem.* **145**, 437-445.
- Hempel, J., Holmquist, B., Fleetwood, L., Kaiser, R., Barros-Soderling, J., Bühler, R., Vallee, B.L. i Jörnvall, H. (1985) Structural relationships among class I isozymes of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **24**, 5303-5307.
- Henry, D.N., Del Monte, M., Greene, D.A. i Killen, P.D. (1993) Altered aldose reductase gene regulation in cultured human retinal pigment epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **92**, 617-623.
- Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., Dyck, J.A., Stein, R.B., Eichele, G., Evans, R.M. i Thaller, C. (1992) 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* **68**, 397-406.
- Higuchi, S., Muramatsu, T., Matsushita, S., Murayama, M. i Hayashida, M. (1996) Polymorphisms of ethanol-oxidizing enzymes in alcoholics with inactive ALDH2. *Hum. Genet.* **97**, 431-434.
- Hoffmann, I., Ang, H.L. i Duester, G. (1998) Alcohol dehydrogenases in *Xenopus* development: conserved expression of ADH1 and ADH4 in epithelial retinoid target tissues. *Dev. Dyn.* **213**, 261-270.
- Holmes, R.S. (1978) Electrophoretic analyses of alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, aldehyde oxidase, sorbitol dehydrogenase and xanthine oxidase from mouse tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* **61**, 339-346.
- Holmes, R.S., Courtney, Y.R. i VandeBerg, J.L. (1986a) Alcohol dehydrogenase isozymes in baboons: tissue distribution, catalytic properties, and variant phenotypes in liver, kidney, stomach, and testis. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **10**, 623-630.
- Holmes, R.S. i Vandeberg, J.L. (1986b) Ocular NAD-dependent alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in the baboon. *Exp. Eye. Res.* **43**, 383-396.
- Höög, J.O., Heden, L.O., Larsson, K., Jörnvall, H. i von Bahr-Lindstrom, H. (1986) The gamma 1 and gamma 2 subunits of human liver alcohol dehydrogenase. cDNA structures, two amino acid replacements, and compatibility with changes in the enzymatic properties. *Eur. J. Biochem.* **159**, 215-218.
- Höög, J.O., von Bahr-Lindstrom, H., Heden, L.O., Holmquist, B., Larsson, K., Hempel, J., Vallee, B.L. i Jörnvall, H. (1987) Structure of the class II enzyme of human liver alcohol dehydrogenase: combined cDNA and protein sequence determination of the pi subunit. *Biochemistry* **26**, 1926-1932.
- Höög, S.S., Pawlowski, J.E., Alzari, P.M., Penning, T.M. i Lewis, M. (1994) Three-dimensional structure of rat liver 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase: a member of the aldo-keto reductase superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2517-2521.
- Höög, J.O. i Brandt, M. (1995) Mammalian class VI alcohol dehydrogenase. Novel types of the rodent enzymes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **372**, 355-364.

- Hur, M.W. i Edenberg, H.J. (1992) Cloning and characterization of the ADH5 gene encoding human alcohol dehydrogenase 5, formaldehyde dehydrogenase. *Gene* **121**, 305-311.
- Hurley, T.D., Edenberg, H.J. i 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.
- Hurley, T.D., Bosron, W.F., Hamilton, J.A. i 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.
- Hurley, T.D., Bosron, W.F., Stone, C.L. i Amzel, L.M. (1994) Structures of three human beta alcohol dehydrogenase variants. Correlations with their functional differences. *J. Mol. Biol.* **239**, 415-429.
- Hurley, T.D. i Vessell, D.L. (1995) The role of leucine 116 in determining substrate specificity in human B1 alcohol dehydrogenase. *Adv. Exp. Med. Biol.* **372**, 321-325
- Hurley, J.H., Chen, R. i Dean, A.M. (1996) Determinants of cofactor specificity in isocitrate dehydrogenase: structure of an engineered NADP⁺ → NAD⁺ specificity-reversal mutant. *Biochemistry* **35**, 5670-5678.
- Hyndman, D.J., Takenoshita, R., Vera, N.L., Pang, S.C. i Flynn, T.G. (1997) Cloning, sequencing, and enzymatic activity of an inducible aldo-ketoreductase from Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 13286-13291.
- Hyndman, D.J. i Flynn, T.G. Sequence and expression levels in human tissues of a new member of the aldo-keto reductase family. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1399**, 198-202.
- Ikeda, S., Okuda-Ashitaka, E., Masu, Y., Suzuki, T., Watanabe, K., Nakao, M., Shingu, K. i Ito, S. (1999) Cloning and characterization of two novel aldo-keto reductases (AKR1C12 and AKR1C13) from mouse stomach. *FEBS Lett.* **459**, 433-437.
- Ikuta, T., Fujiyoshi, T., Kurachi, K. i Yoshida, A. (1985) Molecular cloning of a full-length cDNA for human alcohol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 2703-2707.
- Impraim, C., Wang, G. i Yoshida, A. (1982) Structural mutation in a major human aldehyde dehydrogenase gene results in loss of enzyme activity. *Am. J. Hum. Genet.* **34**, 837-841.
- Jacobson KB. (1968) Alcohol dehydrogenase of *Drosophila*: interconversion of isoenzymes. *Science* **159**, 324-325.
- Jeffery, J. i Jörnvall, H. (1983) Enzyme relationships in a sorbitol pathway that bypasses glycolysis and pentose phosphates in glucose metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 901-905.
- Jez, J.M., Schlegel, B.P. i Penning, T.M. (1996) Characterization of the substrate binding site in rat liver 3alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase. The roles of tryptophans in ligand binding and protein fluorescence. *J. Biol. Chem.* **271**, 30190-30198.
- Jez, J.M., Bennett, M.J., Schlegel, B.P., Lewis, M., i Penning, T.M. (1997a) Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. J.* **326**, 625-636.
- Jez, J.M., Flynn, T.G. i Penning, T.M. (1997b) A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 639-647.
- Jörnvall, H., Persson, M. i Jeffery, J. (1981) Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4226-4230.
- Jörnvall, H., Danielsson, O., Eklund, H., Hjelmqvist, L., Höög, J.O., Parés X i Shafqat, J. (1993) Enzyme and isozyme developments within the medium-chain alcohol dehydrogenase family. *Adv. Exp. Med. Biol.* **328**, 533-544.
- Jörnvall, H. (1994) The alcohol dehydrogenase system. *EXS* **71**, 221-229.
- Jörnvall, H. i Höög, J.O. (1995) Nomenclature of alcohol dehydrogenases. *Alcohol. Alcohol.* **30**, 153-161.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., González-Duarte, R., Jeffery, J. i Ghosh, D. (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**, 6003-6013.

- Jörnvall, H., Höög, J., Persson, B. i Parés, X. (2000) Pharmacogenetics of the Alcohol Dehydrogenase System. *Pharmacology* **61**, 184-191.
- Juan, E. i González-Duarte R. (1980) Purification and enzyme stability of alcohol dehydrogenase from *Drosophila simulans*, *Drosophila virilis* and *Drosophila melanogaster* adhS. *Biochem. J.* **189**, 105-110.
- Julià, P., Farrés, J. i Parés, X. (1983) Purification and partial characterization of a rat retina alcohol dehydrogenase active with ethanol and retinol. *Biochem. J.* **213**, 547-550.
- Julià, P., Farrés, J. i Parés, X. (1987) Characterization of three isoenzymes of rat alcohol dehydrogenase. Tissue distribution and physical and enzymatic properties. *Eur. J. Biochem.* **162**, 179-189.
- Jurukovski, V., Markova, N.G., Karaman-Jurukovska, N., Randolph, R.K., Su, J., Napoli, J.L., Simon, M. (1999) Cloning and characterization of retinol dehydrogenase transcripts expressed in human epidermal keratinocytes. *Mol. Genet. Metab.* **67**, 62-73.
- Kaiser, R., Holmquist, B., Hempel, J., Vallee, B.L. i Jörnvall, H. (1988) Class III human liver alcohol dehydrogenase: a novel structural type equidistantly related to the class I and class II enzymes. *Biochemistry* **27**, 1132-1140.
- Kaiser, R., Fernández, M.R., Parés, X. i Jörnvall, H. (1993) Origin of the human alcohol dehydrogenase system: implications from the structure and properties of the octopus protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11222-11226.
- Kao, Y.L., Donaghue, K., Chan, A., Knight, J. i Silink, M. (1999) A novel polymorphism in the aldose reductase gene promoter region is strongly associated with diabetic retinopathy in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes* **48**, 1338-1340.
- Kawamura, M., Eisenhofer, G., Kopin, I.J., Kador, P.F., Lee, Y.S., Tsai, J.Y., Fujisawa, S., Lizak, M.J., Sinz, A. i Sato, S. (1999) Aldose reductase, a key enzyme in the oxidative deamination of norepinephrine in rats. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 517-524.
- Kedishvili, N.Y., Bosron, W.F., Stone, C.L., Hurley, T.D., Peggs, C.F., Thomasson, H.R., Popov, K.M., Carr, L.G., Edenberg, H.J. i Li, T.K. (1995) Expression and kinetic characterization of recombinant human stomach alcohol dehydrogenase. Active-site amino acid sequence explains substrate specificity compared with liver isozymes. *J. Biol. Chem.* **270**, 3625-3630.
- Kedishvili, N.Y., Gough, W.H., Chernoff, E.A., Hurley, T.D., Stone, C.L., Bowman, K.D., Popov, K.M., Bosron, W.F. i Li, T.K. (1997) cDNA sequence and catalytic properties of a chick embryo alcohol dehydrogenase that oxidizes retinol and 3beta,5alpha-hydroxysteroids. *J. Biol. Chem.* **272**, 7494-7500.
- Kedishvili, N.Y., Gough, W.H., Davis, W.I., Parsons, S., Li, T.K. i 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.
- Kim, C.I., Leo, M.A. i Lieber, C.S. (1992) Retinol forms retinoic acid via retinal. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 388-393.
- Kinoshita, J.H. i Nishimura, C. (1988) The involvement of aldose reductase in diabetic complications. *Diabetes Metab. Rev.* **4**, 323-337.
- Klein, R. i Klein, B.E. (1997) Diabetic eye disease. *Lancet* **350**, 197-204.
- Ko, B.C.B., Ruepp, B., Bohren, K.M., Gabbay, K.H. i Chung, S.S. (1997) Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human aldose reductase gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 16431-16437.
- Koen, A.L. i Shaw, C.R. (1966) Retinol and alcohol dehydrogenases in retina and liver. *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 48-54.
- Koivusalo, M., Baumann, M. i Uotila, L. (1989) Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.* **257**, 105-109.
- Korkhin, Y., Kalb (Gilboa), A.J., Peretz, M., Bogin, O., Burstein, Y. i Frolow, F. (1998) NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*. *J. Mol. Biol.* **278**, 967-981.
- Kumar, A., Shen, P.S., Descoteaux, S., Pohl, J., Bailey, G. i Samuelson, J. (1992) Cloning and expression of an NADP(+)-dependent alcohol dehydrogenase gene of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10188-10192.

- Kuriyan, J., Krishna, T.S., Wong, L., Guenther, B., Pahler, A., Williams, C.H. i Model, P. (1991) Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. *Nature* **352**, 172-174.
- Kurlandsky, S.B., Duell, E.A., Kang, S., Voorhees, J.J. i Fisher, G.J. (1996) Auto-regulation of retinoic acid biosynthesis through regulation of retinol esterification in human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 15346-15352.
- Kvassman, J., Larsson, A. i Pettersson, G. (1981) Substituent effects on the ionization step regulating desorption and catalytic oxidation of alcohols bound to liver dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **114**, 555-563.
- Kyte, J. i Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Lee, A.Y., Chung, S.K. i Chung, S.S. (1995) Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2780-2784.
- Lefrançois-Martínez, A.M., Tournaire, C., Martínez, A., Berger, M., Daoudal, S., Tritsch, D., Veyssiere, G. i Jean, C. (1999) Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 32875-32880.
- Li, C.Y., Zimmerman, C.L. and Wiedmann T.S. (1996) Solubilization of retinoids by bile salt/phospholipid aggregates. *Pharm. Res.* **13**, 907-913.
- Li, T.K. i Magnes, L.J. (1975) Identification of a distinctive molecular form of alcohol dehydrogenase in human livers with high activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**, 202-208.
- Li, T.K., Bosron, W.F., Dafeldecker, W.P., Lange, L.G. i 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.
- MacDonald, P.N. i Ong, D.E. (1987) Binding specificities of cellular retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein, type II. *J. Biol. Chem.* **262**, 10550-10556.
- Mak, O.T., Jörnvall, H. i Jeffery, J. (1982) The primary prostaglandin-inactivating enzyme of human placenta is a dimeric short-chain dehydrogenase. *Biosci. Rep.* **2**, 503-508.
- Mårdh, G., Luehr, C.A. i Vallee, B.L. (1985) Human class I alcohol dehydrogenases catalyze the oxidation of glycols in the metabolism of norepinephrine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4979-4982.
- Mårdh, G., Dingley, A.L., Auld, D.S. i Vallee, B.L. (1986) Human class II (pi) alcohol dehydrogenase has a redox-specific function in norepinephrine metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8908-8912.
- Marfany, G. i González-Duarte, R. (1993) Characterization and evolution of the Adh genomic region in *Drosophila guanche* and *Drosophila madeirensis*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2**, 13-22.
- Marschall, H.U., Oppermann, U.C., Svensson, S., Nordling, E., Persson, B., Hoog, J.O. i Jörnvall, H. (2000) Human liver class I alcohol dehydrogenase gammagamma isozyme: the sole cytosolic 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase of iso bile acids. *Hepatology* **31**, 990-996.
- Marsh, S., Nakhoul, F.M., Skorecki, K., Rubin, A., Miller, B.P., Leib, R., Levy, N.S. i Levy, A.P. (2000) Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor is markedly decreased in diabetic individuals who do not develop retinopathy. *Diabetes Care* **23**, 1375-1380.
- Martínez, M.C., Achkor, H., Persson, B., Fernández, M.R., Shafiqat, J., Farrés, J., Jörnvall, H. i Parés, X. (1996) Arabidopsis formaldehyde dehydrogenase. Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class p and liver class I alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **241**, 849-857.
- Martínez, S.E., Vaglenova, J., Sabrià, J.M., Martínez, M.C., Farrés, J., Parés, X. (2001) Distribution of alcohol dehydrogenase in the rat central nervous system. Consequences for brain ethanol and retinoid metabolism. *En prensa*.
- Maser, E. i Oppermann, U.C. (1997) Role of type-1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in detoxification processes. *Eur. J. Biochem.* **249**, 365-369.

- Matsuura, K., Deyashiki, Y., Bunai, Y., Ohya, I. i Hara, A. (1996) Aldose reductase is a major reductase for isocaproaldehyde, a product of side-chain cleavage of cholesterol, in human and animal adrenal glands. *Arch. Biochem. Biophys.* **328**, 265-271.
- Mattevi, A., Vanoni, M.A., Todone, F., Rizzi, M., Teplyakov, A., Coda, A., Bolognesi, M. i Curti, B. (1996) Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome b2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7496-7501.
- McEvily, A.J., Holmquist, B., Auld, D.S. i Vallee, B.L. (1988) 3 α -Hydroxy-5 β -steroid dehydrogenase activity of human liver alcohol dehydrogenase is specific to gamma-subunits. *Biochemistry* **27**, 4284-4288.
- McKinley-McKee, J.S. i Moss, D.W. (1965) Heterogeneity of liver alcohol dehydrogenase on starch-gel electrophoresis. *Biochem. J.* **96**, 583-587.
- McLeod, R., Ellis, E.M., Arthur, J.R., Neal, G.E., Judah, D.J., Manson, M.M. i Hayes, J.D. (1997) Protection conferred by selenium deficiency against aflatoxin B1 in the rat is associated with the hepatic expression of an aldo-keto reductase and a glutathione S-transferase subunit that metabolize the mycotoxin. *Cancer Res.* **57**, 4257-4266.
- Mezey, E. i Holt, P.R. (1971) The inhibitory effect of ethanol on retinol oxidation by human liver and cattle retina. *Exp. Mol. Pathol.* **15**, 148-156.
- Miles, E.W. i Davies, D.R. (2000) Protein evolution. On the ancestry of barrels. *Science* **289**, 1490.
- Molowa, D.T., Shayne, A.G. i Guzelian, P.S. (1986) Purification and characterization of chlordecone reductase from human liver. *J. Biol. Chem.* **261**, 12624-12627.
- Moreno, A. i Parés, X. (1991) Purification and characterization of a new alcohol dehydrogenase from human stomach. *J. Biol. Chem.* **266**, 1128-1133.
- Moreno, A. (1994) Alcohol deshidrogenasa de la clase IV. Tesis Doctoral.
- Moreno, A., Parés, A., Ortiz, J., Enriquez, J. i Parés, X. (1994) Alcohol dehydrogenase from human stomach: variability in normal mucosa and effect of age, gender, ADH3 phenotype and gastric region. *Alcohol Alcohol.* **29**, 663-671.
- Moreno, A., Farrés, J., Parés, X., Jörnvall, H. i Persson, B. (1996) Molecular modelling of human gastric alcohol dehydrogenase (class IV) and substrate docking: differences towards the classical liver enzyme (class I). *FEBS Lett.* **395**, 99-102.
- Moser, J., Bagchi, D., Akubue, P.I. i Stohs, S.J. (1993) Excretion of malondialdehyde, formaldehyde, acetaldehyde and acetone in the urine of rats following acute and chronic administration of ethanol. *Alcohol Alcohol.* **28**, 287-295.
- Muzio, G., Salvo, R.A., Taniguchi, N., Maggiora, M. i Canuto, R.A. (1999) 4-Hydroxynonenal metabolism by aldo/keto reductase in hepatoma cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**, 445-452.
- Nakamura, K., Iwahashi, K., Matsuo, Y., Miyatake, R., Ichikawa, Y. i Suwaki, H. (1996) Characteristics of Japanese alcoholics with the atypical aldehyde dehydrogenase 2*2. I. A comparison of the genotypes of ALDH2, ADH2, ADH3, and cytochrome P-4502E1 between alcoholics and nonalcoholics. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **20**, 52-55.
- 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.
- Napoli, J.L. (1999) Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1440**, 139-162.
- Napoli, J.L. (2001) 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 9 and other short-chain dehydrogenases/reductases that catalyze retinoid, 17beta- and 3alpha-hydroxysteroid metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* **171**, 103-109.
- Nau, H. i Blaner, W.S. (1999) Retinoids. *The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action.* (Springer, Berlin Heidelberg).
- Nishiyama, M., Birktoft, J.J. i Beppu, T. (1993) Alteration of coenzyme specificity of malate dehydrogenase from *Thermus flavus* by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **268**, 4656-4660.
- Nussrallah BA, Dam R i Wagner FW. (1989) Characterization of Coturnix quail liver alcohol dehydrogenase enzymes. *Biochemistry* **28**, 6245-6251.

- Okuda, A. i Okuda, K. (1983) Physiological function and kinetic mechanism of human liver alcohol dehydrogenase as 5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α ,26-tetrol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **258**, 2899-2905.
- Ong, D.E. i Chytil, F. (1975) Specificity of cellular retinol-binding protein for compounds with vitamin A activity. *Nature* **255**, 74-75.
- Orengo, C.A., Jones, D.T. i Thornton, J.M. (1994) Protein superfamilies and domain superfolds. *Nature* **372**, 631-634.
- Pailhoux, E.A., Martínez, A., Veyssiere, G.M. i Jean, C.G. (1990) Androgen-dependent protein from mouse vas deferens. cDNA cloning and protein homology with the aldo-keto reductase superfamily. *J. Biol. Chem.* **265**, 19932-19936.
- Pal, S., Iruela-Arispe, M.L., Harvey, V.S., Zeng, H., Nagy, J.A., Dvorak, H.F. i Mukhopadhyay, D. (2000) Retinoic acid selectively inhibits the vascular permeabilizing effect of VPF/VEGF, an early step in the angiogenic cascade. *Microvasc. Res.* **60**, 112-120.
- Parés, X., Julià, P. i Farrés, J. (1985) Properties of rat retina alcohol dehydrogenase. *Alcohol* **2**, 43-46.
- Parés, X. i Julià, P. (1990) Isoenzymes of alcohol dehydrogenase in retinoid metabolism. *Methods Enzymol.* **189**, 436-441.
- Parés, X., Moreno, A., Cederlund, E., Höög, J.O. i Jörnvall, H. (1990) Class IV mammalian alcohol dehydrogenase. Structural data of the rat stomach enzyme reveal a new class well separated from those already characterized. *FEBS Lett.* **277**, 115-118.
- Parés, X., Cederlund, E., Moreno, A., Saubi, N., Höög, J.O. i Jörnvall, H. (1992) Class IV alcohol dehydrogenase (the gastric enzyme). Structural analysis of human sigma sigma-ADH reveals class IV to be variable and confirms the presence of a fifth mammalian alcohol dehydrogenase class. *FEBS Lett.* **303**, 69-72.
- Park, D.H. i Plapp, B.V. (1991) Isoenzymes of horse liver alcohol dehydrogenase active on ethanol and steroids. cDNA cloning, expression, and comparison of active sites. *J. Biol. Chem.* **266**, 13296-13302.
- Penning, T.M. i Talalay, P. (1983) Inhibition of a major NAD(P)-linked oxidoreductase from rat liver cytosol by steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory agents and by prostaglandins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4504-4508.
- Penning, T.M., Pawlowski, J.E., Schlegel, B.P., Jez, J.M., Lin, H.K., Höög, S.S., Bennett, M.J. i Lewis, M. (1996) Mammalian 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Steroids* **61**, 508-523.
- Peralba, J.M. (1997) Estudi funcional i estructural del sistema alcohol deshidrogenasa i acció de la metadoxina en el tractament de la patologia alcohòlica. Tesi Doctoral.
- Peralba, J.M., Crosas, B., Martínez, S.E., Julià, P., Farrés, J. i Parés, X. (1999) Amphibian alcohol dehydrogenase. Purification and characterization of classes I and III from *Rana perezi*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**, 343-350.
- Perkins, S.J. (1986) Protein volumes and hydration effects. The calculations of partial specific volumes, neutron scattering matchpoints and 280-nm absorption coefficients for proteins and glycoproteins from amino acid sequences. *Eur. J. Biochem.* **157**, 169-180.
- Persson, B., Krook, M. i Jörnvall, H. (1991) Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur. J. Biochem.* **200**, 537-543.
- Persson, B., Bergman, T., Keung, W.M., Waldenstrom, U., Holmquist, B., Vallee, B.L. i Jörnvall, H. (1993) Basic features of class-I alcohol dehydrogenase: variable and constant segments coordinated by inter-class and intra-class variability. Conclusions from characterization of the alligator enzyme. *Eur. J. Biochem.* **216**, 49-56.
- Persson, B., Zigler, J.S. i Jörnvall, H. (1994) A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Sub-lines including zeta-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductase enoyl reductases, VAT-1 and other proteins. *Eur. J. Biochem.* **226**, 15-22.
- Persson, B., Krook, M. i Jörnvall, H. (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **372**, 383-395.

- Petrash, J.M., Harter, T.M., Devine, C.S., Olins, P.O., Bhatnagar, A., Liu, S. i Srivastava, S.K. (1992) Involvement of cysteine residues in catalysis and inhibition of human aldose reductase. Site-directed mutagenesis of Cys-80, -298, and -303. *J. Biol. Chem.* **267**, 24833-24840.
- Petrash, J.M., Harter, T.M. i Murdock, G.L. (1996) A potential role for aldose reductase in steroid metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **414**, 465-473.
- Pietruszko, R., Crawford, K. i Lester, D. (1973) Comparison of substrate specificity of alcohol dehydrogenases from human liver, horse liver, and yeast towards saturated and 2-enoic alcohols and aldehydes. *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 50-60.
- Pietruszko, R. (1979) Nonethanol substrates of alcohol dehydrogenase. *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol vol I* (Majchrowicz, E. i Noble, E.P., eds), Plenum Press, New York, pp 87-106.
- Pietruszko, R. (1982) Alcohol dehydrogenase from horse liver, steroid-active SS isozyme. *Methods Enzymol.* **89**, 428-434.
- Plapp, B.V., Sogin, D.C., Dworschack, R.T., Bohlken, D.P., Woenckhaus, C. i Jeck, R. (1986) Kinetics of native and modified liver alcohol dehydrogenase with coenzyme analogues: isomerization of enzyme-nicotinamide adenine dinucleotide complex. *Biochemistry* **25**, 5396-5402
- Popescu, G. i 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.
- Quadro, L., Blaner, W.S., Salchow, D.J., Vogel, S., Piantedosi, R., Gouras, P., Freeman, S., Cosma, M.P., Colantuoni, V. i Gottesman, M.E. (1999) Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J.* **18**, 4633-4644.
- Ramaswamy, S., el Ahmad, M., Danielsson, O., Jörnvall, H. i Eklund, H. (1996) Crystal structure of cod liver class I alcohol dehydrogenase: substrate pocket and structurally variable segments. *Protein Sci.* **5**, 663-671.
- Rastinejad, F., Wagner, T., Zhao, Q. i Khorasanizadeh, S. (2000) Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *EMBO J.* **19**, 1045-1054.
- Rattner, A., Smallwood, P.M. i 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**, 11034-43
- Reading, H.W. i Sorsby, A. (1966) Alcohol-dehydrogenase activity of the retina in the normal and dystrophic rat. *Biochem. J.* **99**, 3C-5C.
- Reynier, M. (1969) Pyrazole inhibition and kinetic studies of ethanol and retinol oxidation catalyzed by rat liver alcohol dehydrogenase. *Acta Chem. Scand.* **23**, 1119-1129.
- Rittner, H.L., Hafner, V., Klimiuk, P.A., Szweda, L.I., Goronzy, J.J. i Weyand, C.M. (1999) Aldose reductase functions as a detoxification system for lipid peroxidation products in vasculitis. *J. Clin. Invest.* **103**, 1007-1013.
- Rondeau, J.M., Tete-Favier, F., Podjarny, A., Reymann, J.M., Barth, P., Biellmann, J.F. i Moras, D. (1992) Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature* **355**, 469-472.
- Rosell, A., Torres, D., Peralba, J.M., Crosas, B., Farrés, J. i Parés, X. (2000) Bases estructurales de la especificidad de coenzima de una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP(H), única en vertebrados. *Proceedings del XXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología molecular.* p. 196. Comunicació escrita.
- Rossmann, M.G., Moras, D. i Olsen, K.W. (1974) Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* **250**, 194-199.
- Saari, J.C., (1999) in *Retinoids. The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action*, eds. Nau, H. i Blaner, W.S. (Springer, Berlin Heidelberg), pp 563-583.
- Sanghani, P.C., Stone, C.L., Ray, B.D., Pindel, E.V., Hurley, T.D. i Bosron, W.F. (2000) Kinetic mechanism of human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase *Biochemistry* **39**, 10720-10729.
- Sato, S., Lin, L.R., Reddy, V.N. i Kador, P.F. (1993) Aldose reductase in human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* **57**, 235-241.

- Sawicki, M.W., Erman, M., Puranen, T., Vihko, P. i Ghosh, D. (1999) Structure of the ternary complex of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 with 3-hydroxyestra-1,3,5,7-tetraen-17-one (equilin) and NADP⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 840-845.
- Scadding, S.R. i Maden, M. (1994) Retinoic acid gradients during limb regeneration. *Dev. Biol.* **162**, 608-617.
- Schwartz, M.F. i Jörnvall, H. (1976) Structural analyses of mutant and wild-type alcohol dehydrogenases from *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Biochem.* **68**, 159-168.
- Seeley, T.L. i Holmes, R.S. (1984) Purification and molecular properties of a Class II alcohol dehydrogenase (ADH-C2) from horse liver. *Int. J. Biochem.* **16**, 1037-1042.
- Sellin, S., Holmquist, B., Mannervik, B. i Vallee, B.L. (1991) Oxidation and reduction of 4-hydroxyalkenals catalyzed by isozymes of human alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **30**, 2514-2518.
- Shafqat, J., Hjelmqvist, L. i Jörnvall, H. (1996a) Liver class-I alcohol dehydrogenase isozyme relationships and constant patterns in a variable basic structure. Distinctions from characterization of an ethanol dehydrogenase in cobra, *Naja naja*. *Eur. J. Biochem.* **236**, 571-578.
- Shafqat, J., El-Ahmad, M., Danielsson, O., Martínez, M.C., Persson, B., Parés, X. i Jörnvall, H. (1996b) Pea formaldehyde-active class III alcohol dehydrogenase: common derivation of the plant and animal forms but not of the corresponding ethanol-active forms (classes I and P). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 5595-5599.
- Shara, M.A., Dickson, P.H., Bagchi, D. i Stohs, S.J. (1992) Excretion of formaldehyde, malondialdehyde, acetaldehyde and acetone in the urine of rats in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, paraquat, endrin and carbon tetrachloride. *J. Chromatogr.* **576**, 221-233.
- Shean, M.L. i Duester, G. (1993) The role of alcohol dehydrogenase in retinoic acid homeostasis and fetal alcohol syndrome. *Alcohol Alcohol. Supl.* **2**, 51-56.
- Shen, Y.C., Fan, J.H., Edenberg, H.J., Li, T.K., Cui, Y.H., Wang, Y.F., Tian, C.H., Zhou, C.F., Zhou, R.L., Wang, J., Zhao, Z.L. i Xia, G.Y. (1997) Polymorphism of ADH and ALDH genes among four ethnic groups in China and effects upon the risk for alcoholism. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **21**, 1272-1277.
- Simon, A., Hellman, U., Wernstedt, C. i Eriksson, U. (1995) The retinal pigment epithelial-specific 11-cis retinol dehydrogenase belongs to the family of short chain alcohol dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **270**, 1107-1112.
- Spilsbury, K., Garrett, K.L., Shen, W.Y., Constable, I.J. i Rakoczy, P.E. (2000) Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* **157**, 135-144 .
- Sporn, M.B., Roberts, A.B., i Goodman, D.S. (1994) *The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine.* (Raven, New York).
- Stone, C.L., Thomasson, H.R., Bosron, W.F. i Li, T.K. (1993a) Purification and partial amino acid sequence of a high-activity human stomach alcohol dehydrogenase. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **17**, 911-918.
- Stone, C.L., Hurley, T.D., Amzel, L.M., Dunn, M.F. i Bosron, W.F. (1993b) Kinetics of a glycine for Arg-47 human alcohol dehydrogenase mutant can be explained by Lys-228 recruitment into the pyrophosphate binding site. *Adv. Exp. Med. Biol.* **328**, 429-437.
- Strömberg, P. i 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., Kahn, B. i Napoli, J.L. (1998) cDNA cloning, tissue distribution, and substrate characteristics of a cis-Retinol/3 α -hydroxysterol short-chain dehydrogenase isozyme. *J. Biol. Chem.* **273**, 17910-17916.
- Su, Y., Varughese, K.I., Xuong, N.H., Bray, T.L., Roche, D.J. i Whiteley, J.M. (1993) The crystallographic structure of a human dihydropteridine reductase NADH binary complex expressed in *Escherichia coli* by a cDNA constructed from its rat homologue. *J. Biol. Chem.* **268**, 26836-26841.
- Svensson, S., Stromberg, P. i Höög, J.O. (1999) A novel subtype of class II alcohol dehydrogenase in rodents. Unique Pro(47) and Ser(182) modulates hydride transfer in the mouse enzyme. *J. Biol. Chem.* **274**, 29712-29719.

- Svensson, S., Höög, J.O., Schneider, G. i Sandalova, T. (2000) Crystal structures of mouse class II alcohol dehydrogenase reveal determinants of substrate specificity and catalytic efficiency. *J. Mol. Biol.* **302**, 441-453.
- Tanaka, F., Shiratori, Y., Yokosuka, O., Imazeki, F., Tsukada, Y. i Omata M. (1996) High incidence of ADH2*1/ALDH2*1 genes among Japanese alcohol dependents and patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* **23**, 234-239.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Tanabe, T., Yoshimoto, T., Tsuru, D. i Mitsui, Y. (1996a) Crystal structures of the binary and ternary complexes of 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **35**, 7715-7730.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Nakanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A. i Mitsui, Y. (1996b) Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 Å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family. *Structure* **4**, 33-45.
- Tarle, I., Borhani, D.W., Wilson, D.K., Quiocho, F.A. i Petrash, J.M. (1993) Probing the active site of human aldose reductase. Site-directed mutagenesis of Asp-43, Tyr-48, Lys-77, and His-110. *J. Biol. Chem.* **268**, 25687-25693.
- Terman, B.I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armellino, D.C., Gospodarowicz, D. i Bohlen, P. (1992) Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1579-1586.
- Thatcher, D.R. (1980) The complete amino acid sequence of three alcohol dehydrogenase alleloenzymes (AdhN-11, AdhS and AdhUF) from the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.* **187**, 875-883.
- Theorell, H. i Chance, B. (1951) Studies on liver alcohol dehydrogenase. II. The kinetics of the compound of horse liver alcohol dehydrogenase and reduced diphosphopyridine nucleotide. *Acta Chem. Scand.* **5**, 1127-1144.
- Thomasson, H.R., Edenberg, H.J., Crabb, D.W., Mai, X.L., Jerome, R.E., Li, T.K., Wang, S.P., Lin, Y.T., Lu, R.B. i Yin, S.J. (1991) Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men. *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 677-681.
- Thomasson, H.R., Crabb, D.W., Edenberg, H.J. i Li, T.K. (1993) Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and alcoholism. *Behav. Genet.* **23**, 131-136.
- Thornton, J.M., Orengo, C.A., Todd, A.E. i Pearl, F.M. (1999) Protein folds, functions and evolution. *J. Mol. Biol.* **293**, 333-342.
- Tilton, R.G., Kawamura, T., Chang, K.C., Ido, Y., Bjercke, R.J., Stephan, C.C., Brock, T.A. i Williamson, J.R. (1997) Vascular dysfunction induced by elevated glucose levels in rats is mediated by vascular endothelial growth factor. *J. Clin. Invest.* **99**, 2192-2202.
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C. i Abraham, J.A. (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* **266**, 11947-11954.
- Todd, A.E., Orengo, C.A. i Thornton, J.M. (1999) Evolution of protein function, from a structural perspective. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 548-556.
- Turner, A.J., Illingworth, J.A. i Tipton, K.F. (1974) Simulation of biogenic amine metabolism in the brain. *Biochem. J.* **144**, 353-360.
- Vallee, B.L. i Bazzzone, T.J. (1983) Isozymes of human liver alcohol dehydrogenase. *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.* **8**, 219-244.
- Vander Jagt, D.L., Robinson, B., Taylor, K.K. i Hunsaker, L.A. (1992) Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. *J. Biol. Chem.* **267**, 4364-4349.
- Vander Jagt, D.L., Kolb, N.S., Vander Jagt, T.J., Chino, J., Martínez, F.J., Hunsaker, L.A. i Royer, R.E. (1995) Substrate specificity of human aldose reductase: identification of 4-hydroxynonanal as an endogenous substrate. *Biochim. Biophys. Acta.* **1249**, 117-126.
- Várnai, P., Richards, W.G. i Lyne, P.D. (1999) Modelling the catalytic reaction in human aldose reductase. *Proteins* **37**, 218-227.

- Varughese, K.I., Skinner, M.M., Whiteley, J.M., Matthews, D.A. i Xuong, N.H. (1992) Crystal structure of rat liver dihydropteridine reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6080-6084.
- von Bahr-Lindstrom, H., Höög, J.O., Heden, L.O., Kaiser, R., Fleetwood, L., Larsson, K., Lake, M., Holmquist, B., Holmgren, A., Hempel, J., Vallee, B.L. i Jörnvall, H. (1986) cDNA and protein structure for the alpha subunit of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **25**, 2465-2470.
- von Bahr-Lindstrom, H., Jörnvall, H. i Höög, J.O. (1991) Cloning and characterization of the human ADH4 gene. *Gene* **103**, 269-274.
- von Lintig, J. i Vogt, K. (2000) Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal. *J. Biol. Chem.* **275**, 11915-1120.
- von Wartburg, J.P., Bethune, J.L. i Vallee, B.L. (1964) Human liver-alcohol dehydrogenase. Kinetic and physicochemical properties. *Biochemistry* **3**, 1775-1782.
- von Wartburg, J.P., Papenberg, J. i Aebi, H. (1965) An atypical human alcohol dehydrogenase. *Can. J. Biochem.* **43**, 889-898.
- Wagner, F.W., Burger, A.R. i 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. i Vallee, B.L. (1984) Physical and enzymatic properties of a class III isozyme of human liver alcohol dehydrogenase: χ -ADH. *Biochemistry* **23**, 2193-2199.
- Wagner-Romero, F. (1964) Thin-layer starch gel electrophoresis. *Experientia* **20**, 588-589.
- Watkins, W.D. i Tephly, T.R. (1971) Studies on the properties of retinal alcohol dehydrogenase from the rat. *J. Neurochem.* **18**, 2397-2406.
- Wermuth, B. (1981) Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase. *J. Biol. Chem.* **256**, 1206-1213.
- Wermuth, B., Burgisser, H., Bohren, K. i von Wartburg, J.P. (1982) Purification and characterization of human-brain aldose reductase. *Eur. J. Biochem.* **127**, 279-284.
- Winberg, J.O., Thatcher, D.R. i McKinley-McKee, J.S. (1982) Alcohol dehydrogenase from the fruitfly *Drosophila melanogaster*. Substrate specificity of the alleloenzymes AdhS and AdhUF. *Biochim. Biophys. Acta* **704**, 7-16.
- Williamson, D.H. i Brosnan, J.T. (1974) *a Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U. ed) Vol. 4, pp. 2266-2302, Verlag chemie/Academic Press, Weinheim, Germany.
- Wilson, D.K., Bohren, K.M., Gabbay, K.H. i Quioco, F.A. (1992) An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science* **257**, 458-460.
- Wilson, D.K., Nakano, T., Petrash, J.M. i Quioco, F.A. (1995) 1.7 Å structure of FR-1, a fibroblast growth factor-induced member of the aldo-keto reductase family, complexed with coenzyme and inhibitor. *Biochemistry* **34**, 14323-14330.
- Wippermann, U., Fliegmann, J., Bauw, G., Langebartels, C., Maier, K. i Sandermann, H. Jr (1999) Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase: protein sequence and catalytic properties. *Planta* **208**, 12-18.
- Wratten, C.C. i Cleland, W.W. (1963) Product inhibition studies on yeast and liver alcohol dehydrogenases. *Biochemistry* **2**, 935-941.
- Xie, P., Parsons, S.H., Speckhard, D.C., Bosron, W.F. i Hurley, T.D. (1997) X-ray structure of human class IV alcohol dehydrogenase. Structural basis for substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **272**, 18558-18563.
- Yabe-Nishimura, C. (1998) Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol. Rev.* **50**, 21-33.
- Yamamoto, H., Simon, A., Eriksson, U., Harris, E., Berson, E.L. i 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.

- Yamauchi, M. (1998) Association of polymorphism in the alcohol dehydrogenase gene 2 with alcohol-related organ injuries. especially liver cirrhosis. *Addict. Biol.* **3**, 151-157.
- Yang, Z.N., Davis, G.J., Hurley, T.D., Stone, C.L., Li, T.K. i Bosron, W.F. (1994) Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **18**, 587-591.
- Yang, Z.N., Bosron, W.F. i Hurley, T.D. (1997) Structure of human chi chi alcohol dehydrogenase: a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **265**, 330-343.
- Yasunami, M., Chen, C.S. i Yoshida, A. (1991) A human alcohol dehydrogenase gene (ADH6) encoding an additional class of isozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7610-7614.
- Ye, Q., Hyndman, D.J., Li, X., Flynn, T.G. i Jia, Z. (2000) Crystal structure of CHO reductase, a member of the aldo-keto reductase superfamily. *Proteins* **38**, 41-48.
- Yin, S.J., Chou, F.J., Chao, S.F., Tsai, S.F., Liao, C.S., Wang, S.L., Wu, C.W. i Lee, S.C. (1993) Alcohol and aldehyde dehydrogenases in human esophagus: comparison with the stomach enzyme activities. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **17**, 376-381.
- Yourey, P.A., Gohari, S., Su, J.L. i Alderson, R.F. (2000) Vascular endothelial cell growth factors promote the in vitro development of rat photoreceptor cells. *J. Neurosci.* **20**, 6781-6788.
- Yu, P.H., Lai, C.T. i Zuo, D.M. (1997) Formation of formaldehyde from adrenaline in vivo; a potential risk factor for stress-related angiopathy. *Neurochem. Res.* **22**, 615-620.
- Zgombic-Knight, M., Satre, M.A. i Dueter, G. (1994) Differential activity of the promoter for the human alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) gene ADH3 in neural tube of transgenic mouse embryos. *J. Biol. Chem.* **269**, 6790-6795.
- Zgombic-Knight, M., Ang, H.L., Foglio, M.H. i Dueter, G. (1995) Cloning of the mouse class IV alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) cDNA and tissue-specific expression patterns of the murine ADH gene family. *J. Biol. Chem.* **270**, 10868-10877.
- Zhi, X., Chan, E.M. i Edenberg, H.J. (2000) Tissue-specific regulatory elements in the human alcohol dehydrogenase 6 gene. *DNA Cell. Biol.* **19**, 487-497.
- Zimmerman, W.F., Yost, M.T. i Daemen, F.J. (1974) Dynamics and function of vitamin A compounds in rat retina after a small bleach of rhodopsin. *Nature* **250**, 66-67.