



Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
Abteilung Ernährungstoxikologie

**Humane Alkoholdehydrogenasen und
Aldehyddehydrogenasen: Bedeutung für den
Metabolismus von Methylpyrenderivaten und
von 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Ernährungstoxikologie“

Eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

vorgelegt von
Ronny Kollock
geboren am 23.04.1978 in Brandenburg an der Havel

Nuthetal, Juni 2007

Elektronisch veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2007/1570/>
[urn:nbn:de:kobv:517-opus-15703](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-15703)
[<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-15703>]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
Abbildungen	VII
Tabellen	IX
1. Einleitung	1
1.1 Fremdstoffmetabolisierende Enzyme	1
1.1.1 Alkoholdehydrogenasen.....	2
1.1.2 Aldehyddehydrogenasen	7
1.2 Alkylierte Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe	11
1.2.1 Rolle von ADH und ALDH im Metabolismus von alk-PAK	11
1.3 5-(Hydroxymethyl)-2-fufural	12
1.3.1 Rolle von ADH und ALDH im Metabolismus von HMF	13
1.4 Fragestellung	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits.....	16
2.1.2 Plasmide	18
2.1.3 Oligonukleotide	19
2.1.4 Biologisches Material.....	20
2.1.5 Geräte	21
2.1.6 Verbrauchsmaterial	23
2.2 Expression der humanen ADH in Bakterien	23
2.2.1 Synthese der hADH-cDNA	23
2.2.1.1 Amplifikation von <i>hADH1A</i> -, <i>1B</i> - und <i>1C</i> -cDNA.....	24
2.2.1.2 Amplifikation von <i>hADH2</i> -, <i>3</i> - und <i>4</i> -cDNA	26
2.2.1.3 Amplifikation der <i>hADH5</i> -cDNA	27
2.2.2 Agarosegelelektrophorese	28

2.2.3 Klonierung der hADH-cDNA in den Vektor pKK233-2	28
2.2.3.1 Klonanalyse	31
2.2.4 Korrektur der hADH5a-Sequenz und Erzeugung der hADH5b- und 5c-Sequenzen	33
2.2.5 Verifizierung der Existenz des hADH5c-RT-PCR-Produkts	34
2.2.6 Anlegen von DMSO-Stocks	35
2.2.7 Herstellung kompetenter Zellen	35
2.2.8 Transformation von <i>S. typhimurium</i> TA1538	36
2.2.9 Umklonierung der hADH-cDNA in den Vektor pKN	36
2.2.10 Transformation von <i>S. typhimurium</i> TA100	38
2.2.11 Bestimmung der spontanen Mutationsrate	38
2.3 Generierung von Antisera gegen humane ADH	39
2.3.1 Klonierung der hADH-cDNA in den Vektor pET-28b(+)	39
2.3.2 Transformation von <i>E. coli</i> BL21 (DE3), Induktion der hADH-Expression und „inclusion body“-Test	41
2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.3.4 Coomassie-Färbung	44
2.3.5 Präparation von „inclusion bodies“	45
2.3.6 Proteinbestimmung	46
2.3.7 Immunisierung von Kaninchen und Serumgewinnung	46
2.4 Charakterisierung der hADH-exprimierenden Bakterienstämme	47
2.4.1 Herstellung von Bakterienzytosol	47
2.4.2 Western-Blot	48
2.4.2.1 Proteintransfer	48
2.4.2.2 Immundetektion	49
2.4.2.2.1 Reduktion der Kreuzreaktivitäten bei der Immundetektion	50
2.4.2.2.3 Entfernen gebundener Antikörper („Stripping“)	50
2.4.3 Bestimmung des hADH-Anteils am zytosolischen Gesamtprotein in den transformierten Bakterien	51
2.4.4 Bestimmung der ADH-Aktivität	51
2.4.4.1 Bestimmung der ADH-Aktivität gegenüber benzylischen Alkoholen alkylierter PAK	52
2.5 Expression von humaner ADH5a in Säugerzellen	54
2.5.1 Klonierung der hADH5a-cDNA in den Vektor pSI	54
2.5.2 Transfektion von pSI-hADH5a in V79-Zellen und Klonanalyse	57

2.5.3 Anlegen einer Stammkultur und Herstellung von V79-Zellzytosol.....	59
2.5.4 Stabilitätsüberprüfung einer Zelllinie durch Langzeitpassagieren.....	60
2.6 Partielle Reinigung von hADH1C, 2, 3 und 4.....	61
2.7 Enzymkinetische Analysen mit den partiell gereinigten Enzymen	63
2.7.1 Untersuchung des Einflusses von Modulatoren (Lösungsmittel [DMSO], BSA und ADH-Inhibitoren	66
2.7.1.1 <i>Untersuchung des Einflusses von Ethanol auf die hADH2-katalysierte Oxidation von Pyrenylmethanolen</i>	68
2.8 Expression der humanen ALDH2 und 3A1 in Bakterien für enzymkinetische Analysen mit Pyrenderivaten und HMF als Substrate	69
2.8.1 Enzymkinetische Analysen.....	69
3. Ergebnisse	71
3.1 Generierung von Antiseren gegen humane ADH.....	71
3.1.1 Nutzung der Antiseren zur ADH-Detektion in humanen Organproben.....	73
3.2 Expression der humanen ADH in Bakterien	75
3.2.1 Enzymatische Aktivität der heterolog exprimierten Proteine	77
3.3 Expression humaner ADH5a in Säugerzellen	78
3.3.1 Enzymatische Aktivität der heterolog exprimierten hADH5a	80
3.4 Partielle Reinigung der humanen Enzyme ADH1C, 2, 3 und 4.....	80
3.5 Humane ADH im alk-PAK-Metabolismus	82
3.5.1 Kinetische Analysen mit den partiell gereinigten Enzymen	84
3.5.1.1 ADH2.....	84
3.5.1.1.1 <i>Einfluss von DMSO auf die ADH2-Aktivität</i>	84
3.5.1.1.2 <i>Einfluss von BSA auf die ADH2-Aktivität.....</i>	85
3.5.1.1.3 <i>ADH2-katalysierte Oxidation von Pyrenylmethanolen und Reduktion von Pyrenaldehyden.....</i>	86
3.5.1.2 ADH4.....	88
3.5.1.2.1 <i>Einfluss von DMSO auf die ADH4-Aktivität</i>	88
3.5.1.2.2 <i>ADH4-katalysierte Oxidation von Pyrenylmethanolen und Reduktion von Pyrenaldehyden.....</i>	88
3.5.1.3 ADH1C	89
3.5.1.3.1 <i>Einfluss von DMSO auf die ADH1C-Aktivität.....</i>	89
3.5.1.3.2 <i>ADH1C-katalysierte Oxidation von Pyrenylmethanolen und Reduktion von Pyrenaldehyden.....</i>	90
3.5.1.4 ADH3.....	91

3.5.1.4.1 Einfluss von DMSO auf die ADH3-Aktivität	91
3.5.1.4.2 ADH3-katalysierte Oxidation von Pyrenylmethanolen und Reduktion von Pyrenaldehyden	92
3.5.2 Inhibition der hADH-katalysierten Oxidation, insbesondere von Pyrenylmethanolen	93
3.6 Humane ADHs im HMF-Metabolismus.....	97
3.6.1 Kinetische Analysen mit den partiell gereinigten Enzymen	98
3.7 Humane ALDH im Metabolismus von alk-PAK und von HMF.....	100
4. Diskussion.....	102
4.1 Humane ADH und ALDH im Metabolismus von alk-PAK	102
4.1.1 ADH	102
4.1.2 ALDH.....	104
4.2 Pentachlorphenol, ein neu erkannter potenter ADH-Inhibitor	106
4.3 Humane ADH und ALDH im Metabolismus von HMF	107
4.3.1 ADH	107
4.3.2 ALDH.....	108
4.4 Humane ADH5: Erkenntnisse und offene Fragen	111
4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick	112
5. Zusammenfassung / Summary.....	115
5.1 Zusammenfassung.....	115
5.2 Summary	117
6. Literaturverzeichnis.....	119
7. Publikationen	133
7.1 Artikel in Fachzeitschriften.....	133
7.2 Tagungsbeiträge	133
Lebenslauf	i
Danksagung.....	ii

Abkürzungen

ACF	„aberant crypt foci“
ADH	Alkoholdehydrogenase
AhR	„aryl hydrocarbon receptor“
ALDH	Aldehyddehydrogenase
alk-PAK	alkylierte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	complementäre DNA
CYP	Cytochrom P450
DEAE	Diethylaminoethyl
DFP	2,5-Diformylfuran
DHMF	2,5-(Dihydroxymethyl)furan
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FDCA	2,5-Furandicarbonsäure
FFCA	5-Formyl-2-furancarbonsäure
1-F-x-MP	1-Formyl-x-methylpyren
x-FP	x-Formylpyren
FPLC	„Fast Protein Liquid Chromatography“
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Hillkoeffizient
hGen/Protein	Präfix zur Bezeichnung humaner Gene und Proteine
HMF	5-(Hydroxymethyl)-2-fufural
HMFA	5-(Hydroxymethyl)-2-furancarbonsäure
HMFG	N-(5-Hydroxymethyl-2-furoyl)glycin
1-HM-x-MP	1-(Hydroxymethyl)-x-methylpyren
x-HMP	x-Hydroxymethylpyren
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kB	Kilobase
kDa	Kilodalton (1 kDa = 1×10^3 g/mol)
$K_{0,5}$	Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit bei sigmoidaler Kinetik (entspricht dem K_m -Wert der Michaelis-Menten-Kinetik)
K_i	(kompetitive) Inhibitorkonstante, ein Maß für die Affinität des Inhibitors zum freien Enzym
K_i'	(unkompetitive) Inhibitorkonstante, ein Maß für die Affinität des Inhibitors zum Enzym-Substrat-Komplex
K_m	Michaelis-Konstante
MPMS	Methylpyrenylmercaptursäure
MWCO	Molekulargewichtsausschlussgrenze
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
OD	optische Dichte
PA-Gel	Polyacrylamidgel
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerasekettenreaktion
RT	reverse Transkription
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	Standardfehler
SMF	5-(Sulfooxymethyl)-2-furfural
SULT	lösliche Sulfotransferase
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V_{\max}/K_m	Maß für die katalytische Effizienz
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Masseprozent

Abbildungen

Abb. 1: Schematische Darstellung der Lage der humanen <i>ADH</i> -Gene auf Chromosom 4q21-23.....	4
Abb. 2: Dendogramm der humanen <i>ALDH</i> -Gene.....	7
Abb. 3: Mögliche Metabolisierung von alk-PAK an der Seitenkette am Beispiel von 1-Methylpyren.....	12
Abb. 4: SULT-katalysierte Bioaktivierung von HMF.....	13
Abb. 5: Möglicher Metabolismus von HMF.....	14
Abb. 6: Schematische Darstellung der amplifizierten hADH1-cDNA.....	25
Abb. 7: Schematische Darstellung der amplifizierten hADH2-, 3- und 4-cDNA.....	26
Abb. 8: Schematische Darstellung der amplifizierten hADH5-cDNA.....	27
Abb. 9: Plasmidkarte des Vektors pKK233-2.....	29
Abb. 10: Klonanalyse am Beispiel der Klonierung von hADH1B.....	32
Abb. 11: Amplifikation von hADH5b- und 5c-cDNA.....	35
Abb. 12: Plasmidkarten der Vektoren pKK233-2 und pKN.....	37
Abb. 13: Schematische Darstellung der Klonierung von hADH-cDNA in den Vektor pET-28b(+) am Beispiel von hADH1A.....	41
Abb. 14: Induktion der hADH-Expression in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) und „inclusion body“-Test am Beispiel von hADH1A und 2.....	43
Abb. 15: Absorptionsspektren von NAD und NADH.....	52
Abb. 16: Strukturformeln der als Substrate humaner Alkoholdehydrogenasen getesteten benzyllischen Alkohole alkylierter polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe.....	53
Abb. 17: Schematische Darstellung der Klonierung von hADH5a-cDNA in den Vektor pSI.....	55
Abb. 18: Schematische Darstellung der Transfektion von pSI-hADH5a in V79-Zellen. .57	57
Abb. 19: Schematische Darstellung der Langzeitpassagierung einer V79-hADH5a-Zelllinie.....	60
Abb. 20: Absorptionsspektren der Pyrenylmethanole 1-, 2- und 4-HMP sowie ihrer korrespondierenden Aldehyde in 0,1 M Glycin/NaOH pH 10.....	64
Abb. 21: Inhibitionsarten im Lineweaver-Burk-Plot (A). Graphische Ermittlung der	

apparenten Inhibitorkonstanten durch Sekundärauftragung (B)	66
Abb. 22: Kompetitive und unkompetitive Inhibition in den graphischen Darstellungen nach Dixon und Cornish-Bowden	67
Abb. 23: Gradientenprofil der zur Detektion von 1-FP (A) und 1-F-8-MP (B) verwendeten HPLC-Methoden.....	69
Abb. 24: Western-Blot eines 10 %igen SDS-PA-Gels zum Nachweis der heterolog exprimierten humanen ADH	71
Abb. 25: Reduktion der Kreuzreaktivität des Antiserum gegen ADH1A.....	73
Abb. 26: Expression von ADH in humanen Geweben	74
Abb. 27: Verifizierung der Expression von ADH5 in humaner Leber	75
Abb. 28: Enzymatische Aktivität der heterolog exprimierten hADH.....	78
Abb. 29: Test auf Expression humaner ADH5a in V79-Zellklonen.....	79
Abb. 30: Expressionsstabilität von hADH5a in V79-Zellklonen.....	79
Abb. 31: Enzymatische Aktivität in V79-Zellen exprimierter hADH5a	80
Abb. 32: Partielle Reinigung humaner ADH2	81
Abb. 33: Oxidation benzylischer alk-PAK-Alkohole durch humane ADH exprimiert in <i>S. typhimurium</i> TA100	83
Abb. 34: Ermittlung kinetischer Parameter durch nichtlineare Regression	84
Abb. 35: Einfluss von DMSO auf die katalytische Aktivität humaner ADH2	85
Abb. 36: Einfluss von BSA auf die ADH2-katalysierte Reduktion von Acetaldehyd.....	86
Abb. 37: Einfluss von DMSO auf die katalytische Aktivität humaner ADH4	88
Abb. 38: Einfluss von DMSO auf die katalytische Aktivität humaner ADH1C.....	90
Abb. 39: Einfluss von DMSO auf die katalytische Aktivität humaner ADH3	92
Abb. 40: Effekt von Cimetidin auf die hADH1C-katalysierte Oxidation von Ethanol und 4-HMP	94
Abb. 41: Effekt von Daidzein auf die hADH1C-katalysierte Oxidation von Ethanol und 4-HMP	95
Abb. 42: Inhibition der hADH2-katalysierten Oxidation von 1-HM-8-MP durch Ethanol	97
Abb. 43: Oxidation von HMF und HMFA durch humane ADH exprimiert in <i>S. typhimurium</i> TA100	98
Abb. 44: Einfluss von DMSO auf die katalytische Aktivität von hALDH2 und 3A1	100
Abb. 45: Postulierter HMF-Metabolismus im Menschen <i>in vivo</i>	114

Tabellen

Tabelle 1: Neue und alte Nomenklatur für ADH des Menschen, der Maus und der Ratte	3
Tabelle 2: Organverteilung der humanen ADH-Enzyme	4
Tabelle 3: Polymorphismen humaner Alkoholdehydrogenasen	6
Tabelle 4: Humane ALDH, chromosomale Lage und Überblick über die Nomenklatur	8
Tabelle 5: Substrate und Kosubstrate humaner ALDH	9
Tabelle 6: Rolle humaner ALDH im endogenen Stoffwechsel	10
Tabelle 7: Zur Amplifikation der hADH-cDNA sowie Modifikation und Verifizierung der klonierten cDNA verwendete Oligonukleotide.....	19
Tabelle 8: Bestimmung der ADH-Aktivität mit Pyrenderivaten als Substrate	65
Tabelle 9: Bestimmung der ALDH-Aktivität mit Pyrenaldehyden als Substrate.....	70
Tabelle 10: Immunreaktivität (Kreuzreaktivität) der gegen die humanen ADH generierten Antiseren	72
Tabelle 11: Allgemeine Daten zu den klonierten humanen ADH-cDNA und den kodierten Proteinen	76
Tabelle 12: Genutzte Expressionssysteme für die humanen ADH	77
Tabelle 13: Partielle Reinigung humaner ADH: Reinheitsgrad.....	82
Tabelle 14: Partielle Reinigung humaner ADH: ADH-Aktivität der FPLC-Fraktionen ...	82
Tabelle 15: Kinetische Parameter der hADH2-katalysierten Oxidation bzw. Reduktion von Pyrenylmethanolen und Ethanol bzw. Pyrenaldehyden und Acetaldehyd	87
Tabelle 16: Kinetische Parameter der hADH4-katalysierten Oxidation bzw. Reduktion von Pyrenylmethanolen und Ethanol bzw. Pyrenaldehyden und Acetaldehyd	89
Tabelle 17: Kinetische Parameter der hADH1C-katalysierten Oxidation bzw. Reduktion von Pyrenylmethanolen und Ethanol bzw. Pyrenaldehyden und Acetaldehyd	91
Tabelle 18: Kinetische Parameter der hADH3-katalysierten Oxidation bzw. Reduktion von Pyrenylmethanolen und 1-Octanol bzw. Pyrenaldehyden und Octanal...	93
Tabelle 19: Inhibition der hADH-katalysierten Alkoholoxidation durch verschiedene	

Chemikalien	96
Tabelle 20: Kinetische Parameter der hADH-katalysierten Oxidation von HMF und HMFA sowie der Reduktion von HMF	99
Tabelle 21: Kinetische Parameter der hALDH-katalysierten Oxidation von Pyrenaldehyden, ausgewählten Referenzsubstraten und HMF für ALDH3A1 und ALDH2	101
Tabelle 22: HMF als Substrat humaner SULT1A1, ALDH und ADH	109

1. Einleitung

1.1 Fremdstoffmetabolisierende Enzyme

Jedes Lebewesen einschließlich des Menschen wird täglich mit einer Vielzahl potentiell schädlicher Stoffe aus der Umwelt konfrontiert. Mittels eines Multi-Enzymsystems werden die aufgenommenen Stoffe in Metaboliten überführt, die in der Regel besser eliminiert werden können als die Ausgangsverbindungen. Diese fremdstoffmetabolisierenden Enzyme werden in Phase I- und Phase II-Enzyme eingeteilt. Die Phase I-Enzyme katalysieren sogenannte Funktionalisierungsreaktionen. Das sind zum einen Reaktionen bei denen funktionelle Gruppen, wie Hydroxyl-, Thiol-, Amino- oder Carboxylgruppen, in die Grundstruktur des Substrates eingefügt werden oder, z.B. durch Ringspaltung, demaskiert werden. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Cytochrome P450 (CYP), die hauptsächlich als Monooxygenasen wirken. Zum andern werden auch Modifikationen funktioneller Gruppen, z.B. Oxidation und Reduktion, zu den Phase I-Reaktionen gezählt. In diesem Zusammenhang sind vor allem Alkoholdehydrogenasen (ADH) und Aldehyddehydrogenasen (ALDH) von Bedeutung.

Die Phase II-Enzyme katalysieren Konjugationsreaktionen. Dazu benötigen sie funktionelle Gruppen, die entweder von vornherein im Substrat vorhanden waren, oder durch Phase I-Enzyme eingefügt wurden. Die wichtigsten Klassen der Phase II-Enzyme sind die Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen (UGT), die die Konjugation mit Glucuronsäure katalysieren, die Glutathion-S-Transferasen (GST), welche ihre Substrate mit dem Tripeptid Glutathion konjugieren, die *N*-Acetyltransferasen (NAT), die ihre Substrate acetylieren sowie die Sulfotransferasen (SULT), die ihre Substrate sulfonieren.

In den meisten Fällen werden auf diese Weise lipophile, schlecht ausscheidbare Substrate in hydrophilere, geladene Metaboliten überführt, die besser ausscheidbar sind als die Ausgangssubstanzen. Nahezu alle fremdstoffmetabolisierenden Enzyme besitzen eine ziemlich breite Substrattoleranz. Die Umsetzung der Substrate erfolgt relativ ungerichtet und zufällig, dadurch kommt es immer wieder mal vor, dass biologisch eigentlich inerte Substanzen in reaktive Metaboliten überführt werden. Diese können an zelluläre Makromoleküle, wie Proteine, RNA oder DNA binden und somit zu zytotoxischen

Wirkungen oder im Falle der Bindung an DNA zu Mutationen führen, welche die Induktion von Krebs bewirken können.

Interindividuelle Unterschiede bei der Reaktion auf bestimmte Substanzen können zum einen durch genetische Polymorphismen begründet sein, die bei fremdstoffmetabolisierenden Enzymen sehr häufig vorkommen (Daly *et al.*, 1993; Gonzalez & Idle, 1994). Zum andern spielen Koexpositionen mit weiteren Substanzen (z.B. Ethanol) eine wichtige Rolle. Dadurch können unter Umständen detoxifizierende Reaktionen inhibiert werden und der Metabolismus einer Substanz in Richtung Toxifizierung verschoben werden.

1.1.1 Alkoholdehydrogenasen

Als Alkoholdehydrogenasen werden Enzyme bezeichnet, die die Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden/Ketonen und die Reduktion von Aldehyden/Ketonen zu Alkoholen katalysieren. Entsprechende Enzyme kommen in allen untersuchten Organismen vor und gehören zu verschiedenen Enzymsuperfamilien. Mittelkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (MDR) (Nordling *et al.*, 2002), kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR) (Jörnvall *et al.*, 1995b), Aldo-Ketoreduktasen (AKR) (Crosas *et al.*, 2001), langkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (LDR) (Inoue *et al.*, 1989) und Eisen-abhängige Dehydrogenasen (Scopes, 1983) sind Beispiele für Enzymsuperfamilien, zu denen Enzyme mit Alkoholdehydrogenaseaktivität gehören.

Die wichtigste Enzymfamilie mit Alkoholdehydrogenaseaktivität in Wirbeltieren gehört zur MDR-Superfamilie. Es sind zytosolische, dimere, Zink-haltige Enzyme mit Untereinheiten von etwa 40 kDa Größe. Als Kosubstrat benötigen sie Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid (NAD bzw. NADH). In der vorliegenden Arbeit bezieht sich die Verwendung der Bezeichnung Alkoholdehydrogenasen (ADH) im folgenden ausschließlich auf die Mitglieder dieser Enzymfamilie. Studien über elektrophoretische und kinetische Eigenschaften, Antigenität und Aminosäuresequenz führten zur Einteilung der ADH in zunächst drei Klassen (Vallee & Bazzone, 1983). Zwei weitere Klassen wurden seitdem im Menschen identifiziert (Moreno & Parés, 1991; Yasunami *et al.*, 1991), eine sechste in Nagetieren (Höög & Brandt, 1995; Zheng *et al.*, 1993) und eine siebente im Huhn (Kedishvili *et al.*, 1997). Duester *et al.* schlugen 1999 ein einheitliches Nomenklatorsystem für die ADH der Wirbeltiere vor, basierend auf der weitgehend akzeptierten Klasseneinteilung (Duester *et al.*, 1999) (Tabelle 1). In der vorliegenden Arbeit wird diese ADH-Nomenklatur verwendet, trotz der Tatsache, dass sie bis heute nicht allgemein akzeptiert ist und in der aktuellen Literatur

sowohl die Verwendung der alten Nomenklatur, der neuen Nomenklatur und sogar einer Mischung aus beiden zu finden ist.

Tabelle 1: Neue und alte Nomenklatur für ADH des Menschen, der Maus und der Ratte.

Klasse	<i>Homo sapiens</i>			<i>Mus musculus</i>			<i>Rattus norvegicus</i>		
	neuer Name	alter Name (Gen)	alter Name (Protein)	neuer Name	alter Name (Gen)	alter Name (Protein)	neuer Name	alter Name (Gen)	alter Name (Protein)
	ADH1A	<i>ADH1</i>	α						
I	ADH1B	<i>ADH2</i>	β	ADH1	<i>Adh-1</i>	A ₂	ADH1	-	ADH-3
	ADH1C	<i>ADH3</i>	γ						
II	ADH2	<i>ADH4</i>	π	ADH2	-	Klasse II	ADH2	-	Klasse II
III	ADH3	<i>ADH5</i>	χ	ADH3	<i>Adh-2,</i> <i>Adh5</i>	B ₂	ADH3	-	ADH-2
IV	ADH4	<i>ADH7</i>	σ, μ	ADH4	<i>Adh-3,</i> <i>Adh7</i>	C ₂	ADH4	-	ADH-1
V	ADH5	<i>ADH6</i>	-						
VI							ADH6	-	Klasse VI
VII				bisher nicht in Säugetieren nachgewiesen					

modifiziert nach Duester *et al.* (1999).

Die ADH-Familie entstand offensichtlich durch wiederholte Genduplikationen während der Evolution der Wirbeltiere (Jörnvall *et al.*, 1995a), zu den erst spät erfolgten Duplikationen gehört die Entstehung dreier *ADH1*-Gene beim Menschen. Deren Genprodukte haben ca. 94 % Aminosäuresequenzidentität und bilden *in vivo* außer Homodimeren auch funktionelle Heterodimere (Edenberg & Bosron, 1997). Alle sieben bekannten humanen *ADH*-Gene befinden sich in einem Gencluster von ca. 380 kb auf dem langen Arm von Chromosom 4 (Edenberg & Bosron, 1997; Osier *et al.*, 2002b) (Abb. 1). Alle *ADH* besitzen neun Exons und acht Introns (Edenberg & Brown, 1992; Žgombić-Knight *et al.*, 1995b). *ADH5* wurde zuerst als ein *ADH*-Gen beschrieben, dem das letzte Exon fehlt (Yasunami *et al.*, 1991). Eine neuere Arbeit zeigte jedoch, dass es sich um eine Spleiß-Variante (in dieser Arbeit als ADH5b bezeichnet) handelte und identifizierte das Volllängentranskript mit dem neunten Exon (ADH5a in dieser Arbeit) (Strömberg & Höög, 2000). Eine weitere Spleiß-Variante von

ADH5 existiert mit nur sieben Exons (ADH5c in dieser Arbeit), bei der durch Deletion von Exon 7 das Leseraster von Exon 8 verschoben wird und ein frühes Stoppcodon eben im Exon 8 entsteht (Strausberg *et al.*, 2002).

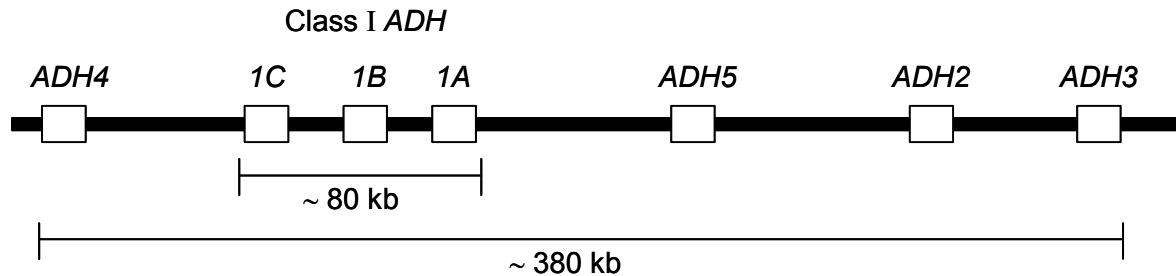


Abb. 1: Schematische Darstellung der Lage der humanen *ADH*-Gene auf Chromosom 4q21-23. Modifiziert nach Osier *et al.* (1999).

Bis auf ADH4 werden alle humanen ADH stark in der Leber exprimiert, darüber hinaus auch in vielen weiteren Organen wie Niere, Lunge und Darm. ADH4 wird hauptsächlich in den Epithelien des oberen Verdauungstrakts bis zum Magen exprimiert. Tabelle 2 stellt die Organverteilung der humanen ADH-Enzyme umfassend dar.

Tabelle 2: Organverteilung der humanen ADH-Enzyme.

Enzym	Hauptsächliche Expression
ADH1A	Leber
ADH1B	Leber, Niere, Lunge
ADH1C	Leber, Niere, Darm, Magen
ADH2	Leber, Niere
ADH3	ubiquitär (hoch in Leber)
ADH4	Epithelien des oberen Verdauungstraktes (Mund ^a , Ösophagus, Magen)
ADH5	Leber (bislang nur mRNA detektiert)

modifiziert nach Edenberg & Bosron (1997),^a (Dong *et al.*, 1996).

Für die Oxidation von Ethanol sind vorrangig die ADH1-Enzyme von Bedeutung (Agarwal, 2001), ebenfalls von Relevanz für den Ethanolmetabolismus sind ADH2 (Bosron *et al.*, 1979; Li *et al.*, 1977) sowie ADH4 (Hernández-Muñoz *et al.*, 1990; Seitz *et al.*, 1992).

ADH4 oxidiert zudem sehr effizient Retinol, weshalb diesem Enzym eine physiologische Bedeutung bei der Retinsäurebiosynthese zugeordnet wird (Duester, 1996; Yang *et al.*, 1994). ADH3 hat eine physiologische Funktion als Formaldehydscavenger. Dieses Enzym katalysiert die Glutathion-abhängige Oxidation von Formaldehyd (in Form des spontan gebildeten *S*-Hydroxymethylglutathions) zu *S*-Formylglutathion (Holmquist & Vallee, 1991; Uotila & Koivusalo, 1989). Darüber hinaus wurden aufgrund der katalytischen Eigenschaften der einzelnen ADH-Enzyme noch physiologische Funktionen im Metabolismus von Catecholaminen (Mårdh *et al.*, 1985; Mårdh *et al.*, 1986; Mårdh & Vallee, 1986), von Serotonin (Consalvi *et al.*, 1986; Svensson *et al.*, 1999), von Lipidperoxidationsprodukten (Sellin *et al.*, 1991), von 3 β -Hydroxy-5 β -steroiden (McEvily *et al.*, 1988), von Fettsäuren, Prostaglandinen und Leukotrienen (über Oxidation von ω -Hydroxyfettsäuren) (Edenberg & Bosron, 1997; Gotoh *et al.*, 1989) und von Gallensäuren (Marschall *et al.*, 2000) diskutiert. Über das Substratspektrum oder gar die Funktion der ADH5 ist faktisch nichts bekannt. Es existiert lediglich eine Arbeit, in der mit den Substraten Ethanol, Propanol und Benzylalkohol die ADH-Aktivität dieses Enzyms demonstriert werden konnte (Chen & Yoshida, 1991).

Für die meisten der humanen ADH sind in der Literatur Polymorphismen beschrieben (Tabelle 3). Die Polymorphismen der ADH1B und der ADH1C sind gut charakterisiert. Zudem existiert eine Vielzahl von Studien über Assoziationen bestimmter potentiell Alkohol-induzierter Erkrankungen (z.B. Karzinomen des oberen Verdauungstrakts) mit dem Genotyp dieser ADH mit jedoch teilweise widersprüchlichen Ergebnissen (Brennan *et al.*, 2004; Sturgis *et al.*, 2001; Tiemersma *et al.*, 2003; Visapää *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Yokoyama *et al.*, 2001; Yokoyama *et al.*, 2002). Übereinstimmend wurde jedoch berichtet, dass das Allel *ADH1B*2* (codiert für aktiveres Enzym) das Risiko für Alkoholismus senkt (Borràs *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1999). Das Allel *ADH1C*1* (codiert ebenfalls für die aktivere Variante) ist assoziiert mit dem Allel *ADH1B*2*, hat jedoch keinen unabhängigen Einfluss auf das Alkoholismusrisiko (Borràs *et al.*, 2000; Osier *et al.*, 1999).

Tabelle 3: Polymorphismen humaner Alkoholdehydrogenasen.

Enzym	SNP im Promoter	Allel	Aminosäureaustausch	Allelfrequenz
ADH1B		*1	-	90-100 % (Kaukasier) (Goedde <i>et al.</i> , 1992) 20-40 % (Asiaten) (Goedde <i>et al.</i> , 1992) 0-10 % (Kaukasier)
		*2	Arg ⁴⁷ His (Jörnvall <i>et al.</i> , 1984)	(Goedde <i>et al.</i> , 1992) 60-80 % (Asiaten) (Goedde <i>et al.</i> , 1992) 15-20 %
		*3	Arg ³⁶⁹ Cys (Carr <i>et al.</i> , 1989)	(Afroamerikaner) (Bosron <i>et al.</i> , 1983; McCarver <i>et al.</i> , 1997)
ADH1C		*1	-	50-60 % (Kaukasier) (Bosron & Li, 1986) > 90 % (Asiaten) (Bosron & Li, 1986) 40-50 % (Kaukasier)
		*2	Ile ³⁴⁹ Val, Arg ²⁷¹ Gln (Höög <i>et al.</i> , 1986)	(Bosron & Li, 1986) < 10 % (Asiaten) (Bosron & Li, 1986)
		* ³⁵¹ Thr	Pro ³⁵¹ Thr (Osier <i>et al.</i> , 2002a)	6-26 % (amerikanische Ureinwohner) (Osier <i>et al.</i> , 2002a)
ADH2	ja (Edenberg <i>et al.</i> , 1999)	*1	-	~30 % (Schweden) (Strömberg <i>et al.</i> , 2002)
		*2	Ile ³⁰⁸ Val (Strömberg <i>et al.</i> , 2002)	~70 % (Schweden) (Strömberg <i>et al.</i> , 2002)
ADH3	ja (Hedberg <i>et al.</i> , 2001)			
ADH4	ja (Buervenich <i>et al.</i> , 2000)	Referenztyp	-	
		* ⁷⁹ Ala	Gly ⁷⁹ Ala (Buervenich <i>et al.</i> , 2000)	

1.1.2 Aldehyddehydrogenasen

Aldehyddehydrogenasen (ALDH) katalysieren die irreversible Oxidation von Aldehyden zu Carbonsäuren. Als Kosubstrat benötigen sie Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid (NAD) oder Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotidphosphat (NADP). Zu dieser Enzymsuperfamilie gehörende Enzyme finden sich in allen untersuchten Lebensformen (Sophos & Vasiliou, 2003).

Im Menschen sind bisher 19 funktionelle *ALDH*-Gene identifiziert wurden (Vasiliou & Nebert, 2005) (Tabelle 4), die in elf Familien eingeteilt sind (Abb. 2). Streng genommen sind

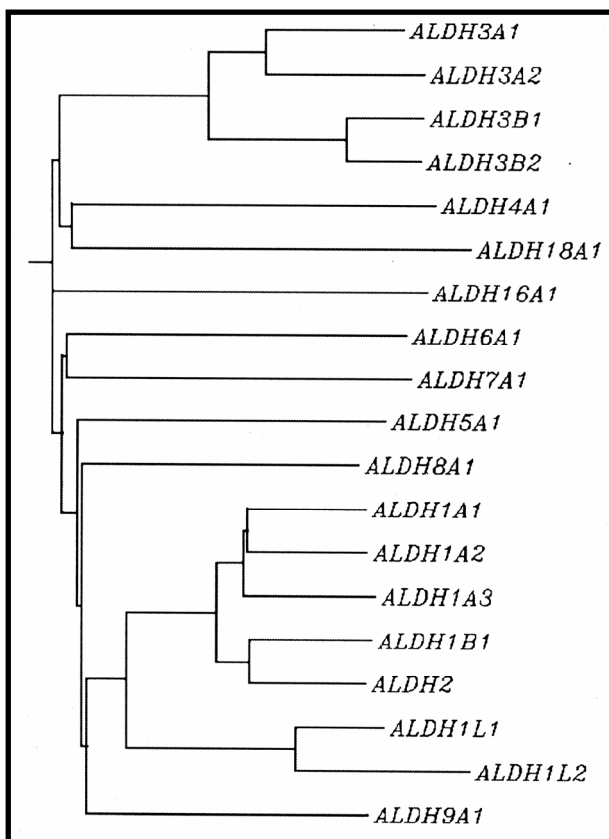


Abb. 2: Dendrogramm der humanen *ALDH*-Gene. Entnommen aus Vasiliou & Nebert (2005).

es nur zehn Familien, *ALDH2* gehört aufgrund der hohen Sequenzidentität eigentlich in die *ALDH1*-Familie (Unterfamilie *1B*) (siehe Abb. 2). Aus historischen Gründen wurde jedoch bei der Überarbeitung des *ALDH*-Nomenklatorsystems die *ALDH2* nicht umbenannt (Vasiliou *et al.*, 1999). Enzymatisch aktiv sind die humanen *ALDH* entweder als Homodimere (z.B. 1A3, 3A1 und 3A2) oder als Homotetramere (z.B. 1A1, 2 und 9A1).

Tabelle 4: Humane ALDH, chromosomale Lage und Überblick über die Nomenklatur.

ALDH	Chromosomale Lage	Historische bzw. Trivialnamen
1A1	9q21	ALDH-1, ALDH-II, RALDH1, E1
1A2	15q21,2	ALDH-11, RALDH2, ALDH1A7
1A3	15q26	ALDH-6, RALDH3, ALDH1A6
1B1	9p13	ALDH5, ALDH χ
1L1	3q21,3	10-Formyltetrahydrofolatdehydrogenase (FDH)
1L2	12q23,3	
2	12q24,2	ALDH-2, ALDH-I, E2
3A1	17p11,2	ALDH-3, ALDH-III
3A2	17p11,2	ALDH-V, ALDH-10, FALDH
3B1	11q13	ALDH-7
3B2	11q13	ALDH-8
4A1	1p36	ALDH-4, ALDH-IV, E4, Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylatdehydrogenase
5A1	6p22	E5, Succinatsemialdehyddehydrogenase (SSDH) CoA-abhängige
6A1	14q24	Methylmalonatsemialdehyddehydrogenase (MMSDH)
7A1	5q31	Antiquitin, ATQ1
8A1	6q24,1-q25,1	ALDH-12
9A1	1q22-q23	ALDH-9, E3, γ -Aminobutyraldehyddehydrogenase
16A1	19q13.33	
18A1	10q24,3-q24,6	Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylatsynthase

modifiziert nach Sládek (2003) und Vasiliou & Nebert (2005).

Tabelle 5 zeigt die Substrat- und Kosubstratpräferenzen der humanen ALDH. Wie man aus den Substratpräferenzen der einzelnen Enzyme schon ableiten kann, haben die meisten der humanen ALDH spezifische Funktionen im endogenen Stoffwechsel (Tabelle 6). Die meisten ALDH katalysieren jedoch auch (mit geringerer Effizienz) die Oxidation einer Vielzahl (auch xenobioter) weiterer Aldehyde. Von besonderer Bedeutung für den Metabolismus xenobioter (v.a. aromatischer) Aldehyde ist wahrscheinlich die ALDH3A1. Dies läßt sich zum einen aus

dem bekannten Substratspektrum dieses Enzyms schließen (Tabelle 5), zum anderen ist die ALDH3A1 *in vivo* (Ratte) (Deitrich *et al.*, 1978; Törrönen *et al.*, 1981) und *in vitro* (Ratte, Mensch) (Marselos *et al.*, 1986) über den Arylhydrocarbon- (Ah-) Rezeptor induzierbar.

Tabelle 5: Substrate und Kosubstrate humaner ALDH. Bevorzugte Substrate bzw. Kosubstrate im Fettdruck.

ALDH	Substrate	Kosubstrat
1A1	Retinal (<i>all-trans</i>- und <i>9-cis</i>-) (Vasiliou <i>et al.</i> , 2004), Acetaldehyd, Aldophosphamid	NAD
1A2	Retinal (<i>all-trans</i>- > <i>9-cis</i>-) (Vasiliou <i>et al.</i> , 2004), mittelkettige gesättigte Aldehyde	NAD , NADP
1A3	Retinal (<i>all-trans</i>-) (Vasiliou <i>et al.</i> , 2004)	NAD
1B1	Acetaldehyd, andere aliphatische Aldehyde	NAD
1L1	10-Formyltetrahydrofolat , Propionaldehyd	NADP , NAD
1L2	unbekannt	unbekannt
2	Acetaldehyd , Chloracetaldehyd	NAD
3A1	aromatische und mittelkettige Aldehyde , Aldophosphamid	NAD , NADP
3A2	mittel- und langkettige ungesättigte und gesättigte aliphatische Aldehyde , aromatische Aldehyde (Ziegler & Vasiliou, 1999)	NAD , NADP
3B1	unbekannt	unbekannt
3B2	unbekannt	unbekannt
4A1	Glutamyl-γ-semialdehyd , andere Carbonsäuresemialdehyde	NAD , NADP
5A1	Succinylsemialdehyd , Aldophosphamid	NAD
6A1	Malonylsemialdehyd , Methylmalonylsemialdehyd	NAD
7A1 ^a	unbekannt	unbekannt
8A1	Retinal (<i>9-cis</i>- >> <i>all-trans</i>-) (Vasiliou <i>et al.</i> , 2004), aromatische und mittelkettige aliphatische Aldehyde	NAD , NADP
9A1	γ-Trimethylaminobutyraldehyd , γ-Aminobutyraldehyd , Betainaldehyd, andere Aminoaldehyde, Retinal, Acetaldehyd	NAD , NADP
16A1	unbekannt	unbekannt
18A1	Glutamat , γ-Glutamylphosphat , Glutamyl- γ -semialdehyd	NADP

modifiziert nach Sládek (2003), ^a ALDH-Aktivität wurde für das orthologe Fischenzym (Streifenbrasse und Graskrapfen) gezeigt (Kosubstrat NAD) (Chan *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2002).

Tabelle 6: Rolle humaner ALDH im endogenen Stoffwechsel.

Funktion	beteiligte ALDH
Retinsäurebiosynthese	1A1, 1A2, 1A3, 8A1
Folsäuremetabolismus	1L1
Metabolismus von Aldehyden, die bei der Lipidperoxidation entstehen, z.B. 4-Hydroxynonenal	1A1, 3A1, 2
Fettaldehydmetabolismus	3A2
Prolin- und Argininkatabolismus	4A1
Valin- und Pyrimidinkatabolismus (Roe <i>et al.</i> , 1998; Vasiliou <i>et al.</i> , 2000)	6A1
GABA-Metabolismus	5A1 (Katabolismus), 9A1 (Biosynthese)
Carnitinbiosynthese (Vaz <i>et al.</i> , 2000)	9A1
Prolin- und Argeninbiosynthese	18A1
Ethanolmetabolismus	2, 1A1, 1B1

modifiziert nach Vasiliou *et al.* (2004).

Die humanen ALDH werden konstitutiv in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Subzellulär finden sie sich im Zytosol, in den Mitochondrien und auch im endoplasmatischen Reticulum. So wird die zytosolische ALDH3A1 in Magenmukosa, Netzhaut, Brustdrüse, Lunge, Linse, Ösophagus, Speicheldrüsen, Haut und weiteren Organen, nicht jedoch der Leber, konstitutiv exprimiert (höchste Expression in Magen, Netzhaut und Lunge). Die mitochondriale ALDH2 findet sich in Leber, Niere, Herz, Skelettmuskulatur, Lunge, Linse, Gehirn, Pankreas, Prostata, Milz und anderen Organen (höchste Expression in Leber, Niere und Linse) (Sládek, 2003).

Genetische Variationen sind für viele der humanen ALDH bekannt (Vasiliou & Pappa, 2000). Im Falle der ALDH3A2 (De Laurenzi *et al.*, 1996), 4A1 (Valle *et al.*, 1976) und 5A1 (Chambliss *et al.*, 1998; Gibson *et al.*, 1998) sind sie die Ursache seltener autosomal rezessiver Erbkrankheiten. Genetische Polymorphismen sind außerdem beschrieben für die ALDH1B1 (Sherman *et al.*, 1993), 2 (Yoshida *et al.*, 1985), 3A1 (Vasiliou & Pappa, 2000) und 9A1 (Lin *et al.*, 1996). Funktionelle Konsequenzen sind jedoch nur für den Polymorphismus der ALDH2 sicher nachgewiesen. Die in Asiaten häufige inaktive Variante ALDH2*2 ist durch Akkumulation von Acetaldehyd verantwortlich für die Ethanolintoleranz der Betroffenen (Goedde *et al.*, 1979).

1.2 Alkylierte Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe

Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind aromatische Verbindungen mit kondensierten Ringsystemen. Von alkylierten PAK (alk-PAK) spricht man, wenn diese Verbindungen nicht-aromatische Teilstrukturen wie Alkyl-Seitenketten und/oder fünfgliedrige Ringe enthalten. PAK entstehen beim Erhitzen organischen Materials unter Sauerstoffmangel. Um so geringer die Temperatur bei diesem Prozess ist, um so höher ist der Anteil an alk-PAK. Die Belastung der Umwelt mit PAK resultiert hauptsächlich aus dem Kraftverkehr und den Emissionen von Heizungen. Durch Ablagerung solcher freigesetzter PAK-Partikel kann eine Kontamination von Blattgemüse und Obst erfolgen, was vor allem in verkehrsreichen Gegenden auch der Fall ist (Grimmer, 1988). Weitere nahrungsrelevante Belastungsquellen für den Menschen sind pflanzliche Öle und Fette (Grimmer, 1988; Guillén & Sopelana, 2004), gegrilltes Fleisch (vorrausgesetzt, Fett tropft in die Glut) sowie Räucherware (Tóth & Potthast, 1984). Des Weiteren erfolgt eine Exposition durch das Rauchen.

Alk-PAK sind von besonderer toxikologischer Relevanz, weil sie neben oder anstatt der Bildung von vicinalen Dihydrodiolepiden als Bioaktivierungsweg (Thakker *et al.*, 1985), alternative Aktivierung an der Alkylseitenkette erlauben. In erster Linie die Bildung reaktiver benzyliischer Schwefelsäureester ist hier zu nennen (Surh & Miller, 1994). Der erste Schritt dieses Aktivierungsweges ist die Hydroxylierung der Seitenkette durch CYP (Engst *et al.*, 1999), gefolgt von der anschließenden Sulfokonjugation durch SULT (Meinl *et al.*, 2002) (siehe auch Abb. 3).

1.2.1 Rolle von ADH und ALDH im Metabolismus von alk-PAK

Die SULT-katalysierte Bioaktivierung von benzyliischen alk-PAK-Alkoholen kann durch ADH-katalysierte Oxidation zum Aldehyd und nachfolgende ALDH-katalysierte Oxidation zur Carbonsäure konkurriert werden (Abb. 3). Tatsächlich wurde an Ratten verabreichtes 1-Hydroxymethylpyren (benzyliischer Alkohol von 1-Methylpyren) hauptsächlich als Carbonsäuren und deren Glucuronsäure-Konjugate ausgeschieden (Ma *et al.*, 2002). Gleichzeitige Verabreichung von Ethanol (ADH-Substrat) oder 4-Methylpyrazol (ADH-Inhibitor) führte zu einer dramatischen Zunahme von DNA-Addukten in den Geweben der Ratte (Ma *et al.*, 2002). Auch die Gabe von Disulfiram führte zu einer Steigerung des Adduktsniveaus, wenn auch in geringerem Maße (Ma *et al.*, 2002). Diese Daten legen,

zumindest für 1-Methylpyren, eine entscheidene Bedeutung von ADH und ALDH im Metabolismus von alk-PAK nahe.

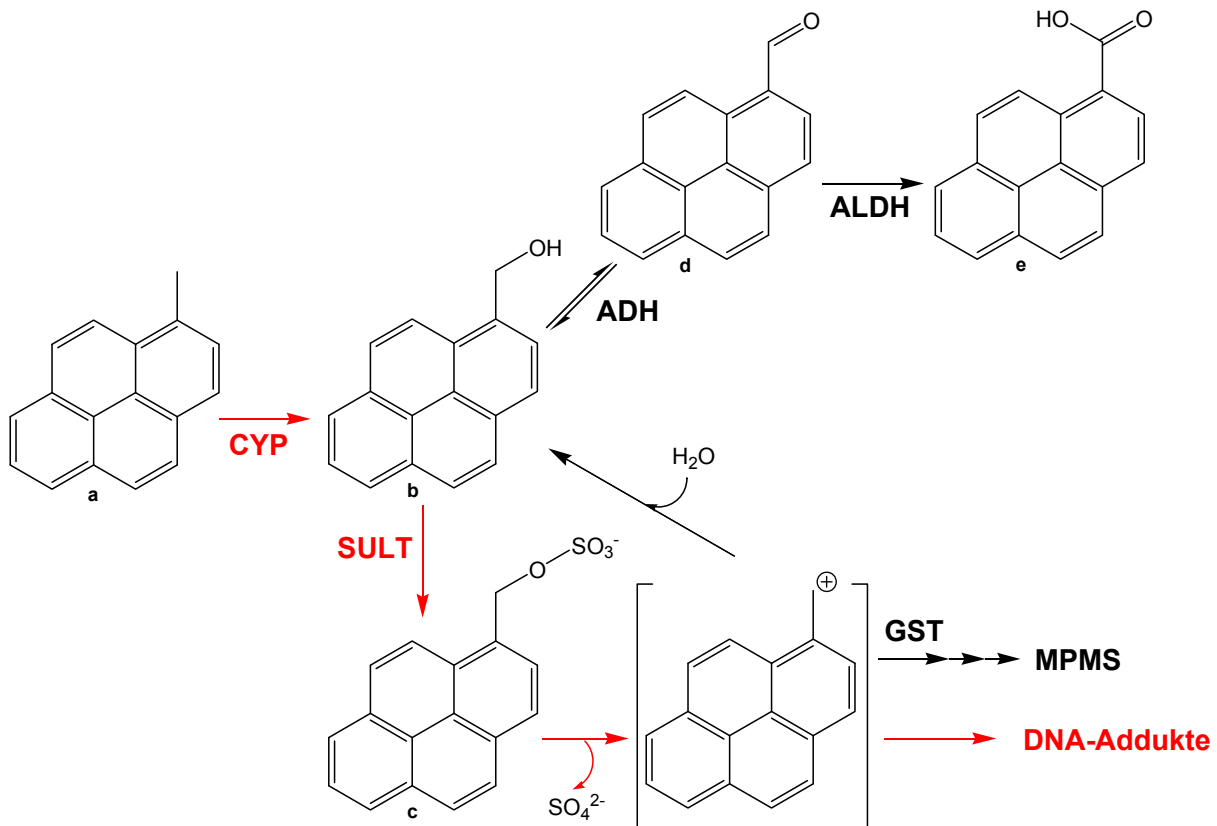


Abb. 3: Mögliche Metabolisierung von alk-PAK an der Seitenkette am Beispiel von 1-Methylpyren (a). Bioaktivierung (rot) von 1-Methylpyren (a) durch Hydroxylierung der Methylgruppe zu 1-Hydroxymethylpyren (b) und anschließende Sulfokonjugation zum instabilen 1-Sulfooxymethylpyren (c). Bioinaktivierung durch, die Sulfokonjugation konkurrierende, Oxidation von 1-Hydroxymethylpyren (b) über 1-Formylpyren (d) zu Pyrenyl-1-carbonsäure (e). Zudem Bioinaktivierung durch GST-katalysierte Glutathion-Konjugation von 1-Sulfooxymethylpyren (c) und anschließende Prozessierung zur 1-Methylpyrenylmercaptursäure (MPMS).

1.3 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural

5-(Hydroxymethyl)-2-furfural (HMF) ist eine nahrungsrelevante, potentiell gentoxische Verbindung, die bei der Hitzebehandlung zuckerhaltiger Matrices entsteht. Die Bildung geschieht während der Maillard-Reaktion aus reduzierenden Zuckern (Mauron, 1981) und/oder durch Säure-katalysierte Zuckerdehydrierung (Antal *et al.*, 1990). Dementsprechend finden sich die höchsten HMF-Gehalte (g/kg bzw. g/l) in zuckerreichen, säurehaltigen Lebensmitteln, die während ihrer Herstellung einer Hitzebehandlung unterzogen wurden. Beispiele sind getrocknete Früchte, Pflaumenmus und Balsamico Essig (Murkovic & Pichler,

2006; Theobald *et al.*, 1998). Die Hauptexpositionsquellen für den Durchschnittsmenschen sind dunkle Brotsorten, Kaffee, Kaffeeersatz und Trockenobstprodukte (Bachmann *et al.*, 1997). Schätzungen für die mittlere tägliche HMF-Aufnahme mit der Nahrung geben Werte von 30-60 mg/d (Janowski *et al.*, 2000) bzw. bis zu 150 mg/d (Simonyan, 1971) an.

Die Struktur von HMF legt ein mögliches gentoxisches und kanzerogenes Potential nahe. In der Tat führt auf die Haut aufgetragenes HMF bei Mäusen zur Bildung von Hautpapilloma (Miyakawa *et al.*, 1991). Zudem konnte die Initiation und Promotion präneoplastischer Läsionen, sogenannter „aberrant crypt foci“ (ACF), im Kolon von Ratten gezeigt werden (Zhang *et al.*, 1993). Der wahrscheinlichste metabolische Aktivierungsweg für HMF ist die Sulfokonjugation der Hydroxylgruppe mit nachfolgender Generierung eines hochreaktiven Carbokations durch spontane Abspaltung von Sulfat (Abb. 4). Der Nachweis, dass HMF durch Rattenleberhomogenat sulfokonjugiert wird, erfolgte bereits 1994 (Surh & Tannenbaum, 1994). Außerdem ist das Sulfat des HMF, im Gegensatz zu HMF selbst, ein direktes Mutagen (Surh & Tannenbaum, 1994). Die SULT-Enzyme von Mensch, Maus und Ratte mit der höchsten Aktivität gegenüber HMF konnten identifiziert werden (Sommer *et al.*, 2003; Sommer, 2006). Darüber hinaus war HMF in modifizierten *in vitro* Mutagenitätstests (humane SULT1A1 heterolog exprimiert in den Zielzellen) mutagen (Sommer, 2006).

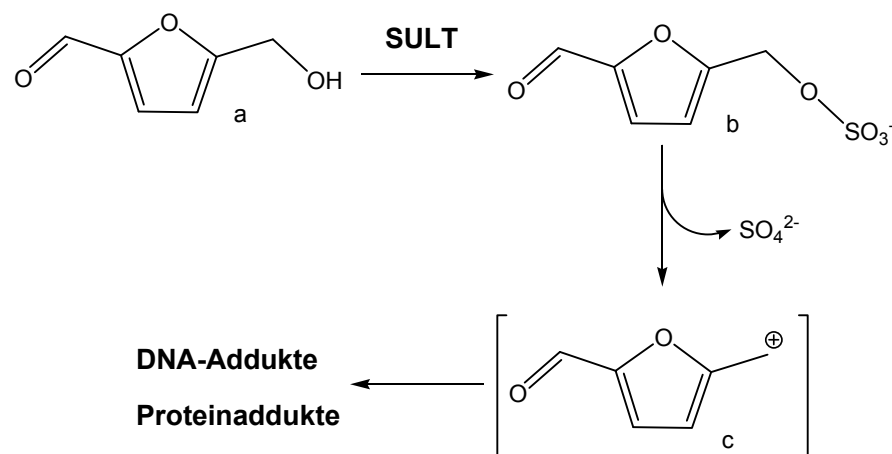


Abb. 4: SULT-katalysierte Bioaktivierung von HMF (a). Sulfokonjugation zu 5-(Sulfooxymethyl)-2-furfural (SMF) (b) und anschließende Bildung eines hochreaktiven Carbokations (c) durch spontane Abspaltung von Sulfat.

1.3.1 Rolle von ADH und ALDH im Metabolismus von HMF

Die SULT-katalysierte Bioaktivierung kann durch ADH- und ALDH-katalysierte Oxidation konkurriert werden (Abb. 5). Tatsächlich scheiden sowohl Menschen (Jellum *et al.*, 1973) als

auch Ratten und Mäuse (Godfrey *et al.*, 1999) nach HMF-Exposition die oxidierten Metaboliten 5-(Hydroxymethyl)-2-furancarbonsäure (HMFA) und 2,5-Furandicarbonsäure (FDCA) renal aus. Darüber findet sich im Urin der Nager (Germond *et al.*, 1987; Godfrey *et al.*, 1999) und auch des Menschen (Pettersen & Jellum, 1972) das Glycin-Konjugat der HMFA, *N*-(5-Hydroxymethyl-2-furoyl)glycin (HMFG). Diese Beobachtungen legen nahe, dass ADH und ALDH einen wesentlichen Anteil an der Metabolisierung von HMF haben.

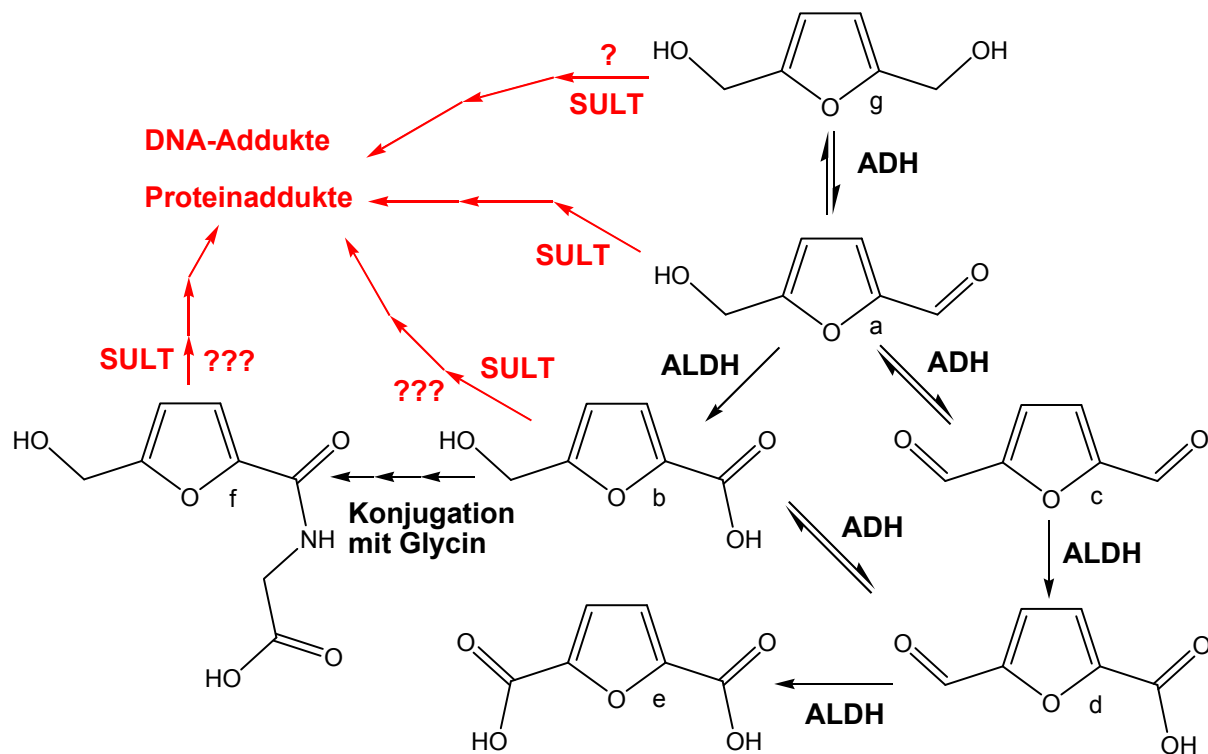


Abb. 5: Möglicher Metabolismus von HMF (a). Für die SULT-vermittelte Bioaktivierung (rot) siehe Abb. 4. ADH- und ALDH-katalysierter oxidativer Metabolismus führt *in vivo* zu 5-(Hydroxymethyl)-2-furancarbonsäure (HMFA) (b) und 2,5-Furandicarbonsäure (FDCA) (e), zudem wird das Glycinkonjugat der HMFA (f) gebildet. Intermediate der ADH- und ALDH-katalysierten Reaktionen sind 2,5-Diformylfuran (DFF) (c) und 5-Formyl-2-furancarbonsäure (FFCA) (d). Auch eine ADH-katalysierte Reduktion von HMF zu 2,5-(Dihydroxymethyl)furan (DHMF) (g) ist theoretisch möglich.

1.4 Fragestellung

Die benzyliche Hydroxylierung und nachfolgende Sulfokonjugation ist ein wichtiger Bioaktivierungsweg für alk-PAK. Studien mit 1-HMP in Ratten legen nahe, dass die Oxidation durch ADH und ALDH mit der Sulfokonjugation konkurriert und somit einen Detoxifizierungsweg darstellt (Ma *et al.*, 2002). Vordringliches Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung der hADH, die in diese Detoxifizierung involviert sind. Dazu wurden alle bekannten hADH heterolog exprimiert und untersucht, ob sie benzyliche Alkohole einer repräsentativen Auswahl von alk-PAK oxidieren. Die vielversprechendsten Formen wurden für enzymkinetische Analysen aufgereinigt. Desweiteren wurde der Einfluss von ADH-Inhibitoren und von Ethanol auf die Oxidation der benzylichen Alkohole analysiert. Ethanol ist ein konkurrierendes Substrat für ADH und eine Inhibition der ADH-vermittelten Detoxifizierung von alk-PAK ist somit wahrscheinlich. Dies ist deshalb von Bedeutung, weil Menschen oft gleichzeitig gegenüber alk-PAK und Ethanol exponiert sind (z.B. Rauchen und Trinken). Die ADH-Reaktion ist eine Gleichgewichtsreaktion, eine effiziente Detoxifizierung ist somit nur möglich, wenn der entstehende Aldehyd aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Am wahrscheinlichsten dürfte dies durch die ALDH-katalysierte Oxidation zur Carbonsäure geschehen. Im Rahmen einer an diese Arbeit angelehnten Diplomarbeit (Rost, 2007) wurden daher die hALDH2 und 3A1 (aus theoretischen Überlegungen heraus die vielversprechendsten Formen) heterolog exprimiert. Kinetische Analysen mit den Aldehyden der benzylichen Alkohole, die sich als die besten ADH-Substrate erwiesen hatten, wurden durchgeführt mit dem Ziel, die Hypothese zu überprüfen, dass diese hALDH tatsächlich von Bedeutung für die Inaktivierung von alk-PAK sind.

HMF, eine nahrungsrelevante potentiell genotoxische Substanz, dürfte aufgrund seines Metabolitenspektrum hauptsächlich oxidativ durch ADH und ALDH umgesetzt werden. Der wahrscheinlichste Bioaktivierungsweg ist auch diesem Fall die Sulfokonjugation (Sommer, 2006). Der oxidative Metabolismus stellt somit eine Detoxifizierung in Konkurrenz zur Sulfokonjugation da. Die hADH, die in den Metabolismus von HMF involviert sind, sollten identifiziert werden, zudem wurde die mögliche Involvierung der hALDH2 und 3A1 analysiert. Im Rahmen der vorhandenen Möglichkeiten wurden die im HMF-Metabolismus möglichen ADH- und ALDH-katalysierten Reaktionen analysiert, um den oxidativen Metabolismus von HMF soweit möglich enzymologisch aufzuklären.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Alle in der folgenden Liste nicht aufgeführten Chemikalien wurden in mindestens p.a. Qualität von folgenden Firmen bezogen:

- Fluka, Buchs, Schweiz
- Merck, Darmstadt, Deutschland
- Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland.

Alle Lösungen und Puffer wurden mit destilliertem Wasser angesetzt. Für molekularbiologische Arbeiten wurde steriles Reinstwasser verwendet.

Acetaldehyd, > 99,5 %, Merck, Darmstadt, Deutschland

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) -Lösung 30 % (w/v), Roth, Karlsruhe, Deutschland

Agarose GTQ, Roth, Karlsruhe, Deutschland

Alkohole alkylierter PAKs, Dr. A. Seidel, BIU, Großhansdorf, Deutschland

ϵ -Aminocapronsäure, > 99 %, Roth, Karlsruhe, Deutschland

Ammoniumperoxodisulfat, \geq 98 %, Roth, Karlsruhe, Deutschland

Antibiotika:

- Ampicillin, Natriumsalz, 99 %, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Kanamycin, Kanamycin A Monosulfat (< 5 % Kanamycin B), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin (5000 U/ml Penicillin G, 5000 μ g/ml Steptomycinsulfat), Gibco, Eggenstein, Deutschland
- Puromycin, Gibco, Eggenstein, Deutschland

Bacto-Agar, Difco, Le Pont de Claix, Frankreich

BCA Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, USA

D-Biotin, \geq 99 %, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Bromphenolbau, P.P.H. Polskie Odczynniki Chemiczne, Gleiwitz (Gliwice), Polen
BSA (bovines Serumalbumin), $\geq 98\%$, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cimetidin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Coomassie[®] Brillantblau G250, Fluka, Buchs, Schweiz
Daidzein, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium), Gibco, Eggenstein, Deutschland
DMSO, $\geq 99,5\%$, Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA Polymerasen:

- *Pfu* DNA Polymerase, 2-3 U/ μ l, Promega, Mannheim, Deutschland
- *Taq* DNA Polymerase in Lagerungspuffer B, 5 U/ μ l, Promega, Mannheim, Deutschland

DNaseI, aus Rinderpankreas, grade II, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
50 \times dNTP Master Mix (12,5 mM), Invitex, Berlin, Deutschland
dNTP-Mix (2 mM), Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DTT, $\geq 99\%$, Fluka, Buchs, Schweiz
EDTA, $\geq 99\%$, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Enhanced Avian RT First Strand Synthesis Kit, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol, 99,9%, Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid, 1% (w/v), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fötale Kälberserum (FKS), Biochrom, Berlin, Deutschland
Freund's Adjuvant, complete und incomplete, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Gene Ruler[™] DNA Ladder Mix, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Glycerol 87%, p.a., Fluka, Buchs, Schweiz
L-Histidin, $> 99\%$, Merck, Darmstadt, Deutschland
5-(Hydroxymethyl)-furfural, 99%, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
5-(Hydroxymethyl)-2-furancarbonsäure, TRC, North York, Kanada
Invisorb[®] Spin DNA Extraction Kit (50), Invitex, Berlin, Deutschland
IPTG, dioxanfrei, Roth, Karlsruhe, Deutschland
jetPEI[™] Cationic Polymer Transfection Kit, Qbiogene, Heidelberg, Deutschland
Klenow-Fragment, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
LB-Agar (Luria/Miller), für die Molekularbiologie, Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium (Luria/Miller), für die Molekularbiologie, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lysozym, aus Hühnereiweiß, krist., Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Magermilchpulver, Sucofin, Zeven, Deutschland
2-Mercaptoethanol, 99%, Roth, Karlsruhe, Deutschland

4-Methylpyrazol, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

NAD, ≈ 98 %, Roth, Karlsruhe, Deutschland

NADH, 98 %, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Nonidet[®]P40, ICN Biomedicals, Eschwege, Deutschland

Octanal, ≥ 98 %, Fluka, Buchs, Schweiz

1-Octanol, $\geq 99,5$ %, Roth, Karlsruhe, Deutschland

Pentachlorphenol, ≥ 90 %, Fluka, Buchs, Schweiz

PhoenIX[™] Filter Maxiprep Kit, Qbiogene, Heidelberg, Deutschland

Plasmid Midi Kit (100), Qiagen, Hilden, Deutschland

Puffer für molekularbiologisch verwendete Enzyme:

- 10× PCR Puffer, Qiagen, Hilden, Deutschland
- 10× PCR Puffer für *Pfu* DNA Polymerase, Promega, Mannheim, Deutschland
- 10× Puffer für Klenow Fragment, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
- 10× Puffer für Restriktionsenzyme, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Pyrenaldehyde (1-, 2-, und 4-FP, 1-F-6-MP, 1-F-8-MP), Dr. A. Seidel, BIU, Großhansdorf, Deutschland

Qiaquick PCR Purification Kit (250), Qiagen, Hilden, Deutschland

Quick Change[®] Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, USA

Quick Ligation[™] Kit, New England Biolabs, Frankfurt/M., Deutschland

Restriktionsenzyme, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland oder New England Biolabs, Frankfurt/M., Deutschland

RNeasy[®] Mini Kit (50), Qiagen, Hilden, Deutschland

D (+)-Saccharose, $> 99,5$ %, Fluka, Buchs, Schweiz

SDS ultra pure, > 99 %, Roth, Karlsruhe, Deutschland

TEMED, p.a., Roth, Karlsruhe, Deutschland

Triton X-100, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Trypsin, 0,05 % (w/v) in 0,53 mM EDTA (Na-Salz), Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

L-Tryptophan, 98 %, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Tween[®]20, Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Plasmide

pBSpac Δ p, Selektionsplasmid mit Puromycinresistenzgen (de la Luna *et al.*, 1988)

pKK233-2, Clontech, Mountain View, USA

pKN, Derivat von pKK233-2 mit Neomycin-Resistenzgen (Glatt & Meinl, 2005)

pET-28b(+), Novagen, Darmstadt, Deutschland

pSI Mammalian Expression Vector, Promega, Mannheim, Deutschland

2.1.3 Oligonukleotide

T7 EEV Promoter Primer (10 µg/ml), Promega, Mannheim, Deutschland

Alle weiteren Oligonukleotide (Tabelle 7), BioTez, Berlin, Deutschland

Tabelle 7: Zur Amplifikation der hADH-cDNA sowie Modifikation und Verifizierung der klonierten cDNA verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
ADH1A-F	CTC CTG GTC TGC AGA GAA GAC AGA ATC AAC	PCR
ADH1A-R	CAA TTT CCA TTT CTT TGG AAA GCC CCC AAA	PCR
ADH1B-F	AAT CCA CAA AGA CTC ACA GTC TGC TGG TGG	PCR
ADH1B-R	TAT TTT TCC TCA ATG GCA AAG GTG ACA CAG	PCR
ADH1C-F	CAG AGA AGA AAT CCA CAA GTA CTC ACC AGC	PCR
ADH1C-R	TCA ATT TCC ATT TCT TTG GAA AGC TCC CAC	PCR
1A(B/C) cds-F	AGC ACA GCA GGA AAA GTA AT	PCR
1A(B/C) Hind-R	CAT CTG TAA AGC TTC AAA AC	PCR
1(A)B/C cds-F	AGC ACA GCA GGA AAA GTA ATC AAA TGC AAA G	PCR
1B/C Hind-R	GCA TCT CTA AAG CTT CAA AAC GTC AGG ACG	PCR
ADH2 Nco-F	ACA GTT TCC CAA AGA ACC ATG GGC ACC AAG	PCR
ADH2 Hind-R	ACC AGG AAG CTT CAC ATT CAA TCA GAT AGT ATT C	PCR
ADH3 Nco-F	GCC GAC CAG AAT CCG TGA CCA TGG CGA ACG	PCR
ADH3 Hind-R	ATT ATT TAA GCT TTT GAA TTA AAT CTT TAC A	PCR
ADH4 cds-F	GGC ACT GCT GGA AAA GTT ATT AAA TGC AAA GCA GCT GTG CTT	PCR
ADH4 Hind-R	GAC AAC ACA AGC TTC CTG CCA CTT TGG ATC	PCR
ADH5-F	CTA CAG TGA AAG TTG CTA CAG GAT CTC CCT TTC	PCR
ADH5b/c-R	CTG CAG CAG GGA CGA CCC TTC TTC TAC TCC	PCR
ADH5 cds-F	AGT ACT ACA GGC CAA GTC ATC AGA TGC AAA GCA GCC A	PCR

Fortsetzung Tabelle 7:

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
ADH5b/c Hind-R	CAC ACA AAG CTT AAA TTT ATG TGG GCA CTT TAC	PCR
ADH5a Hind-R	TGG GTC AAG CTT GTA TTA CAT TGT ACT TAA	PCR
5a-Kor.SNP1006-F	CTG GTT GCT GAT TAT ATG GCA GAG AAG	Mutagenese
5a-Kor.SNP1006-R	CTT CTC TGC CAT ATA ATC AGC AAC CAG	Mutagenese
5a→b-F	GAA AAC TGG AAA ATG GTA AGC TGT ATC CTG TTA C	Mutagenese
5a→b-R	GTA ACA GGA TAC AGC TTA CCA TTT TCC AGT TTT C	Mutagenese
5a→c-F	CTG GAC GTT CTG GCT GGA AGA GCA GAC AG	Mutagenese
5a→c-R	CTG TCT GCT CTT CCA GCC AGA ACG TCC AG	Mutagenese
ADH1 Nde-F	AGG AAA CAG CAT ATG AGC ACA GCA G	PCR
ADH2/4 Nde-F	AGG AAA CAG CAT ATG GGC AC	PCR
ADH3 Nde-F	AGG AAA CAG CAT ATG GCG AAC GAG	PCR
ADH5 Nde-F	AGG AAA CAG CAT ATG AGT ACT ACA G	PCR
ADH5 Xho-F	CAC ACA GGC TCG AGA CCA TGA GTA CTA CAG	PCR
pKK S2	TTC TGA AAT GAG CTG TTG AC	Sequenzierung
pKK R2	CTG TTT TAT CAG ACC GCT TC	Sequenzierung
pSI seqR	TTC ACT GCA TTC TAG TTG TG	Sequenzierung

ein F (forward) kennzeichnet Vorwärtsprimer, ein R (reverse) Rückwärtsprimer.

2.1.4 Biologisches Material

E. coli BL-21 (DE3), Novagen, Darmstadt, Deutschland

E. coli XL-1 Blue, Stratagene, La Jolla, USA

S. typhimurium LB5000 (Bullas & Ryu, 1983)

S. typhimurium TA100 und TA1538 (Maron & Ames, 1983)

V79-Mz, Sublinie (Glatt *et al.*, 1987) der etablierten Lungenfibroblastenzelllinie aus männlichen Chinesischen Hamster (Ford & Yerganian, 1958)

Humanes Lebergewebe, -zytosol, weitere humane Organzytosole, Abteilung Ernährungstoxikologie, DIfE Potsdam-Rehbrücke, Nuthetal, Deutschland

Humane Mundschleimhaut, R. Kollock, Abteilung Ernährungstoxikologie,
DIfE Potsdam-Rehbrücke, Nuthetal, Deutschland

Kaninchen, New Zealand White, Charles River, Sulzfeld, Deutschland

2.1.5 Geräte

Agarosegelelektrophorese-Apparatur: Agagel Mini, Biometra, Göttingen, Deutschland

Badthermostat C10-P5, Thermo Haake, Karlsruhe, Deutschland

Blot-Apparatur: Multiphor[®] II Nova Blot electrophoretic Unit, Amersham Biosciences,
Freiburg, Deutschland

FPLC-Anlage:

- Injektor: Model MV-6 6-port injection valve
- Pumpe: Model EP-1 Econo Pump
- Säule: Macro-Prep[®] Ion Exchange Media, DEAE, 50 ml oder Econo-Pac Cartridge High Q, 10 ml
- Detektor: Model EM-1 Econo UV Monitor, Model EG-1 Econo Gradient Monitor, BioRad, München, Deutschland

HPLC-Anlagen:

1) für NADH-Detektion

- Automatischer Probeninjektor ASI-100, HPLC-Pumpe P580 und Säulenofen STH585, Dionex, Idstein, Deutschland
- Säule: Hydrophere C18 (5 µm, 4×150 mm), YMC, Schermbeck, Deutschland
- UV-Detektor UV-970, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland

2) für Formylpyrendetektion

- Waters 2695 Separations Module und Waters 474 Fluoreszenzdetektor, Waters, Eschborn, Deutschland
- Säule: Supelcosil LC-18 (5 µm, 4,6×25 mm), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Inkubatoren:

- Brutschrank BD-Serie, Binder, Tuttingen, Deutschland
- CO₂-Brutschrank APT.line[®]CB, Binder, Tuttingen, Deutschland
- Schüttelinkubator Certomat[®]BS-1, B.Braun International, Melsungen, Deutschland
- Trockeninkubator Certomat[®]H inklusive Schüttler Certomat[®]R, B.Braun International, Melsungen, Deutschland

- Trockeninkubator (Brutschrank) kelvitron[®]t, Kendro, Hanau, Deutschland

Mikrotiterplattenreader, SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland

Mikrowelle HMT830A, Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland

Netzgeräte:

- für Agarosegelelektrophorese: Minicell Power Pack P20, Biometra, Göttingen, Deutschland
- für SDS-PAGE und Western Blot: Electrophoresis Power Supply EPS 600, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

PCR-Werkbank: DNA/RNA UV-Cleaner *UVC/T*, Labortechnik Ziege, Luckenwalde, Deutschland

pH-Meter CG840B und zugehörige pH-Elektrode, Schott, Mainz, Deutschland

Photometer:

- RNA/DNA Calculator Gene Quant II, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
- Ultrospec[®]Plus, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

SDS-PAGE-Apparatur: Hoefer[®]SE 600 Series Gel Electrophoresis Unit, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

Thermocycler: *T_{Gradient}* und *T3*, Biometra, Göttingen, Deutschland

Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Ultraschallstab: Vibra-cell[™] VC50T, Sonics & Materials, Gland, Schweiz

UV Band Elutor, Biometra, Göttingen, Deutschland

Video-Dokumentation:

- Eagle Eye[™] II, Stratagene, La Jolla, USA
- Luminescent Image Analyser LAS-1000, Fuji, Düsseldorf, Deutschland

Waagen:

- Basic, Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Feinwaage MC1, Sartorius, Göttingen, Deutschland

Wipptisch: Mini Rocking Platform, Biometra, Göttingen, Deutschland

Zellzählgerät Casy I TT, Schärfe, Reutlingen, Deutschland

Zentrifugen:

- Centrifuge 5403 und Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Centrifuge J2-MI, Beckman, Krefeld, Deutschland
- Optima[®]TLX Ultracentrifuge, Beckman, Krefeld, Deutschland

2.1.6 Verbrauchsmaterial

Alle bei der Beschreibung der Methoden nicht gesondert erwähnten Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland; Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Expression der humanen ADH in Bakterien

2.2.1 Synthese der hADH-cDNA

Zunächst wurde aus geeigneten humanem Gewebe (Mundschleimhaut für ADH4, Leber für alle anderen) mRNA isoliert. Dies erfolgte mit dem RNeasy[®] Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Die mRNA wurde anschließend mit dem Enhanced Avian RT First Strand Synthesis Kit in cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription, RT). Diese diente als Matrize zur Amplifikation der hADH-cDNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR) mittels spezifischer Primer.

RT-Ansatz: 5 µl mRNA
1 µl dNTP-Mix (10 mM)
1 µl oligo-dT-Primer (70 µM)
ad 10 µl H₂O (RNase-frei)

Dieser Ansatz wurde zur Denaturierung der mRNA-Sekundärstrukturen 10 min bei 80 °C im Thermocycler inkubiert. Danach wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt und folgende Komponenten zugegeben:

2 µl 10× RT-Puffer
20 U reverse Transkriptase
20 U RNase Inhibitor
ad 20 µl H₂O (RNase-frei)

Im Thermocycler erfolgte anschließend die RT (60 min, 45 °C) mit nachfolgender Hitzeinaktivierung (70 °C, 15 min). Die erzeugte cDNA diente dann für die PCR als Matrize.

PCR-Ansatz: 2 µl cDNA
5 µl 10× PCR-Puffer
je 1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 µM)
1,25 U *Taq* DNA Polymerase
0,25 µl dNTP-Mix (12,5 mM)
ad 50 µl H₂O

Die PCR erfolgte im Thermocycler nach folgendem Programm:

Initiale Denaturierung:	2 min	95 °C	
Denaturierung:	30 s	94 °C	
Primeranlagerung:	45 s	je nach zu amplifizierender ADH-cDNA	
Extension:	2 min	72 °C	× 40
finale Extension:	10 min	72 °C	

Der Erfolg der PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft (Abschnitt 2.2.2).

2.2.1.1 Amplifikation von *hADH1A*-, *1B*- und *1C*-cDNA

Aufgrund der hohen Sequenzidentität (92,2 %) der kodierenden Sequenzen mussten zur spezifischen Amplifikation von ADH1A-, 1B- und 1C-cDNA zwei aufeinanderfolgende PCR durchgeführt werden, wobei das erste PCR-Produkt als Matrize für die zweite PCR diente (nested PCR). Im nicht kodierenden Bereich der cDNA konnten spezifische Primer definiert werden (Sequenz siehe Tabelle 7) mit denen die erste PCR durchgeführt wurde (Ansatz und Programm siehe Abschnitt 2.2.1). Die Oligonukleotide ADH1A-F und -R (Anlagerungstemperatur 59,8 °C) dienen zur Amplifikation von ADH1A-cDNA, ADH1B-F und -R (59,4 °C) von ADH1B-cDNA und ADH1C-F und -R (60,9 °C) von ADH1C-cDNA.

Die PCR-Produkte wurden einer Reinigung mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (nach Protokoll des Herstellers, Elutionsvolumen, sofern nicht anders angegeben, 30 µl) unterzogen und nach adäquater Verdünnung als Matrize für die zweite PCR eingesetzt. Bei dieser zweiten

PCR dienten die Primer nicht allein der Amplifikation der cDNA, sondern zudem dem Einfügen von für das Klonieren in den pKK233-2-Vektor (Abschnitt 2.2.3) notwendigen Modifikationen (Abb. 6). So wurde der Vorwärtsprimer so gewählt, dass die cDNA jeweils ohne das Startkodon (ATG) amplifiziert wurde. Die Einführung einer *Nco* I-Schnittstelle (Erkennungssequenz CCATGG) war nicht möglich, da in den ADH1-cDNA nach dem ATG kein weiteres G folgte. Über den Rückwärtsprimer erfolgte jeweils die Einführung einer *Hin* dIII-Schnittstelle in der 3'-flankierenden Sequenz der cDNA. Die ADH1A-cDNA wurde mit den Primern 1A(B/C) cds-F und 1A(B/C) Hind-R (Anlagerungstemperatur 45,8 °C) amplifiziert, ADH1B- und 1C-cDNA mit den Primern 1(A)B/C cds-F und 1B/C Hind-R (60,6 °C) (Primersequenzen siehe Tabelle 7). Die PCR erfolgten wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben mit je 1 µl des gereinigten und verdünnten (1:5 für ADH1A und 1C, 1:10 für ADH1B) Produkts der ersten PCR als Matrize.

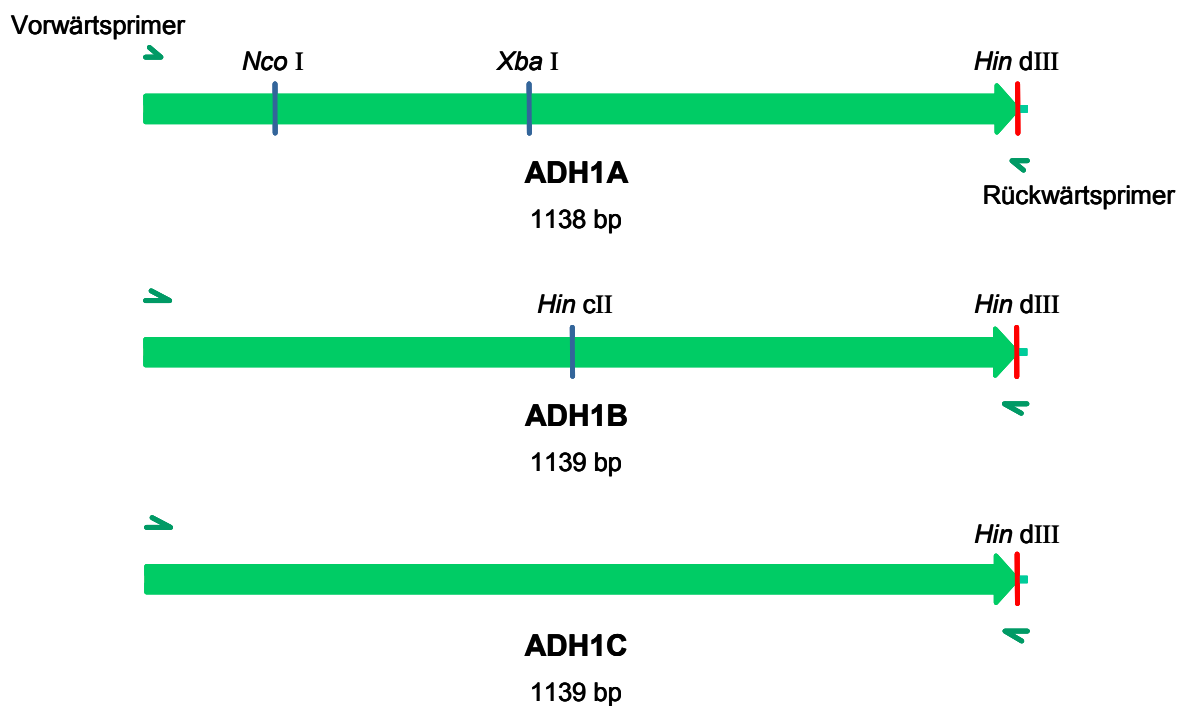


Abb. 6: Schematische Darstellung der amplifizierten hADH1-cDNA. Die kodierenden Sequenzen wurden ohne Startkodon (ATG) amplifiziert und in der 3'-flankierenden Sequenz wurde über den Rückwärtsprimer eine *Hin* dIII-Schnittstelle eingefügt (für das Klonieren in pKK233-2). Eingezeichnet sind weitere für Restriktionsanalysen relevante Schnittstellen (PCR-Spezifität, Klonanalyse).

2.2.1.2 Amplifikation von hADH2-, 3- und 4-cDNA

Die Amplifikation von hADH2-, 3- und 4-cDNA (Abb. 7) erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.1 beschrieben. ADH2-cDNA wurde mit den Primern ADH2 Nco-F und ADH2 Hind-R (Anlagerungstemperatur 60,5 °C), ADH3-cDNA mit ADH3 Nco-F und ADH3 Hind-R (56 °C) und ADH4 mit ADH4 cds-F und ADH4 Hind-R (60 °C) amplifiziert (Primersequenzen siehe Tabelle 7). Über die Rückwärtsprimer wurde jeweils eine *Hin* dIII-Schnittstelle in der 3'-flankierenden Sequenz eingefügt. Bei der Amplifikation von ADH2- und ADH3-cDNA wurde zudem über den Vorwärtsprimer eine *Nco* I-Schnittstelle (CCATGG) am Beginn der kodierenden Sequenz eingefügt. Da die ADH4-cDNA eine interne *Nco* I-Schnittstelle besitzt wurde sie, wie die ADH1-cDNA (Abschnitt 2.2.1.1), ohne Startkodon (ATG) amplifiziert.

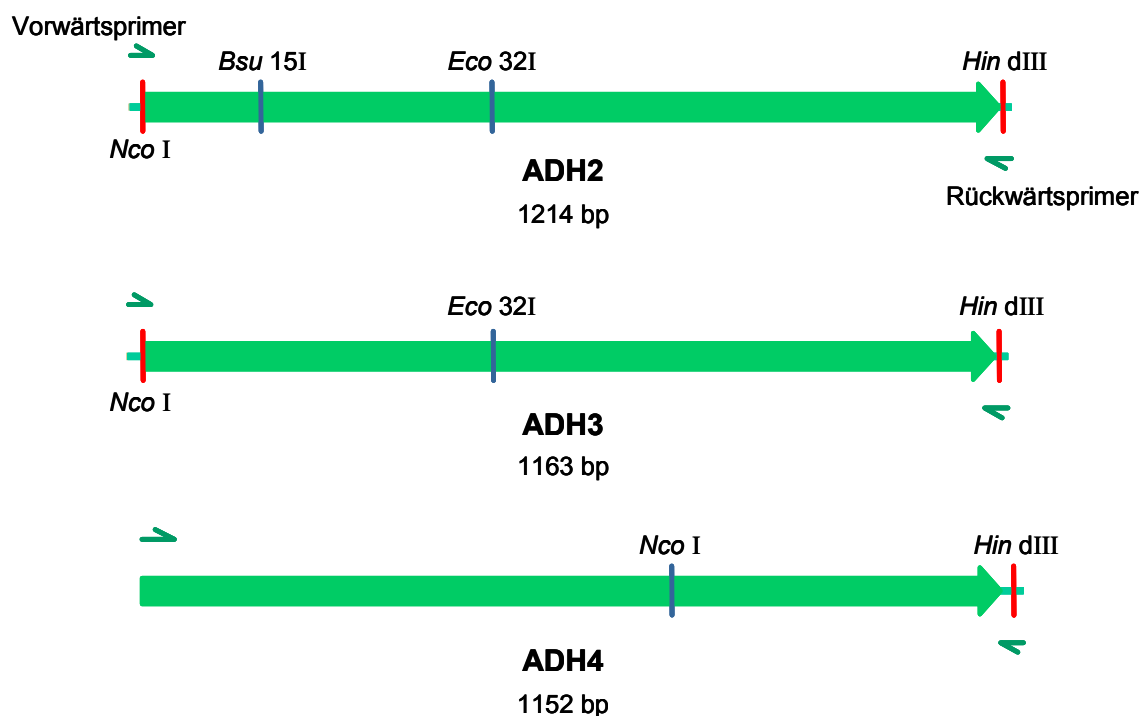


Abb. 7: Schematische Darstellung der amplifizierten hADH2-, 3- und 4-cDNA. Die kodierende Sequenz der ADH4-cDNA wurde ohne Startkodon (ATG) amplifiziert. In der 3'-flankierenden Sequenz wurde über den Rückwärtsprimer je eine *Hin* dIII-Schnittstelle und bei der Amplifikation von ADH2- und 3-cDNA am Beginn der kodierenden Sequenz über den Vorwärtsprimer je eine *Nco* I-Schnittstelle (CCATGG) eingefügt (für das Klonieren in pKK233-2). Eingezeichnet sind weitere für Restriktionsanalysen relevante Schnittstellen (PCR-Spezifität, Klonanalyse).

2.2.1.3 Amplifikation der hADH5-cDNA

ADH5a-cDNA wurde mit den Primern ADH5 cds-F und ADH5a Hind-R (Anlagerungstemperatur 57 °C) wie unter Abschnitt 2.2.1 beschrieben amplifiziert. Die analoge Amplifikation von ADH5b- und 5c-cDNA mit den Primern ADH5 cds-F und ADH5b/c Hind-R (58,5 °C) führte zu einer sehr niedrigen Ausbeute an PCR-Produkt. Deshalb wurde die Strategie der „nested PCR“ (Abschnitt 2.2.1.1) angewandt und zunächst mit den Primern ADH5-F und ADH5b/c-R (58,8 °C) ein über die kodierende Sequenz hinausgehender Abschnitt amplifiziert. Das Produkt dieser PCR (0,25 µl) diente dann als Matrize zur Amplifikation von ADH5b- und 5c-cDNA mit dem ursprünglichen Primerpaar (Primersequenzen siehe Tabelle 7). Über den Rückwärtsprimer erfolgte die Einführung je einer *Hin* dIII-Schnittstelle in der 3'-flankierenden Sequenz, der Vorwärtsprimer war so gewählt, dass die cDNA jeweils ohne Startkodon (ATG) amplifiziert wurden (Abb. 8).

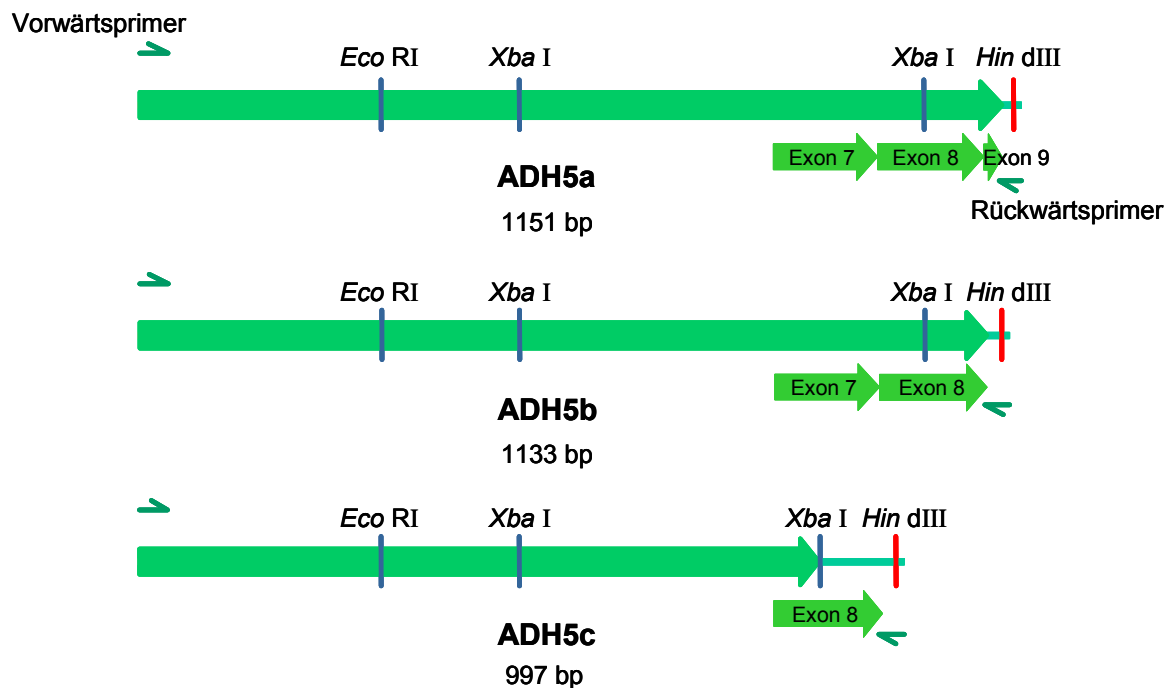


Abb. 8: Schematische Darstellung der amplifizierten hADH5-cDNA. Die kodierenden Sequenzen wurden ohne Startkodon (ATG) amplifiziert. In der 3'-flankierenden Sequenz wurde über den Rückwärtsprimer je eine *Hin* dIII-Schnittstelle eingefügt (für das Klonieren in pKK233-2). Eingezeichnet sind weitere für Restriktionsanalysen relevante Schnittstellen (PCR-Spezifität, Klonanalyse) sowie die durch das alternative Spleißen der mRNA betroffenen Exons.

2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Benötigte Puffer:

TAE-Puffer:

40 mM Tris

1 % (v/v) Essigsäure

1 mM EDTA

6× Probenpuffer:

0,01 M Tris/Acetat pH 8,0

50 % (w/v) Glycerol

0,02 % (w/v) Bromphenolblau

Zur Kontrolle des Erfolgs von PCR sowie zur Auswertung von Restriktionsanalysen, z.B. zur Klonanalyse (Abschnitt 2.2.3.1), wurden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Es wurden 1 %ige (w/v in TAE-Puffer) bzw. 2 %ige (bei erwarteten Fragmentgrößen < 500 bp) Gele mit einem Ethidiumbromidgehalt von 0,4 µg/ml verwendet. Den Proben wurde vor dem Auftragen auf das Gel 6× Probenpuffer (Verhältnis 5:1) zugegeben. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 10-20 min mit 80 (1 %ige Gele) bzw. 75 V (2 %ige Gele). Elektrophoresepuffer war der TAE-Puffer. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkalierte in die DNA und wurde nach Beendigung der Elektrophorese durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Die auf diese Weise sichtbar gemachte DNA wurde mit der Videodokumentation (Eagle Eye™II) festgehalten.

Für einige Applikationen (z.B. Vektorpräparation) wurden die DNA-Fragmente nach der Elektrophorese auf dem UV Band Elutor sichtbar gemacht, die gewünschte Bande ausgeschnitten und mit dem Invisorb® Spin DNA Extraction Kit aus der Agarose extrahiert (nach Protokoll des Herstellers).

2.2.3 Klonierung der hADH-cDNA in den Vektor pKK233-2

Zur Expression in Bakterien wurden die ADH-cDNA zunächst in den Expressionsvektor pKK233-2 (Abb. 9) kloniert. Dies erfolgte mit zwei verschiedenen Strategien, die nachfolgend detailliert beschrieben sind.

Die Klonierung von ADH2- und 3-cDNA in den pKK-Vektor konnte problemlos über die jeweiligen *Nco* I- und *Hin* dIII-Schnittstellen erfolgen. Dazu wurden die Vektor-DNA und die ADH-cDNA zunächst gemeinsam verdaut.

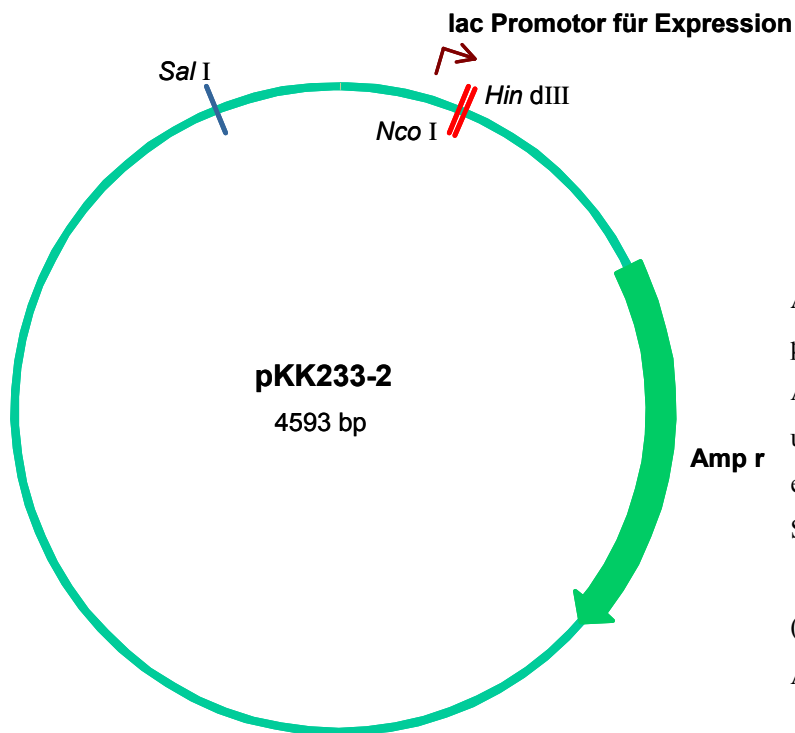


Abb. 9: Plasmidkarte des Vektors pKK233-2. Die Klonierung der ADH-cDNA erfolgte über die *Nco* I- und *Hin* dIII-Schnittstellen. Die ebenfalls eingezeichnete *Sal* I-Schnittstelle diente der Umklonierung der ADH-cDNA in den Vektor pKN (Abschnitt 2.2.9). *Amp^r* steht für Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase).

Um eine ausreichende Menge ADH-cDNA zu erhalten, wurden dafür zuvor zwei ADH2-PCR-Produkte sowie zehn ADH3-PCR-Produkte über je eine PCR-Reinigungssäule (Abschnitt 2.2.1.1) vereinigt.

Restriktionsansatz: ca. 5 μ g ADH-cDNA
 1 μ g pKK233-2
 6 μ l 10 \times Y⁺/Tango™ Puffer
 30 U *Nco* I
 30 U *Hin* dIII
 ad 60 μ l H₂O

Die Restriktion erfolgte für ca. 15 h bei 37 °C. Anschließend erfolgte zur Inaktivierung der Enzyme eine Inkubation bei 65 °C für 20 min. Zur Verbindung der ADH-cDNA mit den passenden Enden des Vektors erfolgte danach eine Ligation. Diese wurde mit dem Quick Ligation™ Kit durchgeführt. Die Ligation erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur (ca. 25 °C).

Ligationsansatz: 9 μ l Verdau
 10 μ l 2 \times Quick Ligation Reaktionspuffer
 1 μ l Quick T4 DNA Ligase

Anschließend wurden mit dem Ligationsansatz kompetente *E. coli* XL-1 (Abschnitt 2.2.7) transformiert (siehe weiter unten).

Für die Klonierung der weiteren ADH-cDNA (ADH1A, 1B, 1C, 4, 5a-c) musste eine andere Strategie angewendet werden. Zunächst wurde der pKK-Vektor mit *Nco* I verdaut (ca. 15 h, 37 °C) mit nachfolgender Hitzeinaktivierung (65 °C, 20 min).

Restriktionsansatz: 5 µg pKK233-2
5 µl 10× Y⁺/Tango™ Puffer
25 U *Nco* I
ad 50 µl H₂O

Der so verdaute Vektor und die ADH-cDNA wurden einer Behandlung mit dem Klenow-Fragment (Großes Fragment der *E. coli* DNA Polymerase I) unterzogen („blunting“). Das „blunting“ erfolgte durch Inkubation auf Eis für 20 min. Anschließend erfolgte zur Inaktivierung des Enzyms eine PCR-Reinigungsprozedur (Abschnitt 2.2.1.1). Das Klenow-Fragment besitzt 5'→3'-Polymerase-Aktivität sowie 3'→5'-Exonuklease-Aktivität. Für den vorliegenden Fall heißt dies, dass zum einen der durch den *Nco* I-Verdau des Vektors erzeugte 5'-Überhang aufgefüllt wird (glattes Ende mit ATG abschließend).

„blunting“-Ansatz: ca. 5 µg ADH-cDNA
10 µl pKK-*Nco* I-Verdau
5 µl 10× Puffer für Klenow Fragment
2,5 µl dNTP-Mix (2 mM)
20 U Klenow-Fragment
ad 50 µl H₂O

Zum anderen werden die durch die *Taq* DNA Polymerase angefügten Adenine am 3'-Ende der ADH-cDNA (ohne ATG amplifiziert) entfernt. Bei Ligation der so erzeugten glatten Enden entsteht somit wieder eine voll funktionsfähige kodierende Sequenz. Zunächst jedoch erfolgte noch ein *Hin* dIII-Verdau des „blunting“-Ansatzes (ca. 15 h, 37 °C) mit anschließender Hitzeinaktivierung (65 °C, 20 min). Dieser Verdau wurde dann wie oben beschrieben ligiert.

Restriktionsansatz: 30 μl „blunting“-Ansatz
5 μl 10 \times R⁺ Puffer
25 U *Hin* dIII
ad 50 μl H₂O

Die Transformation kompetenter *E. coli* XL-1 (Abschnitt 2.2.7) mit den Ligationsansätzen wurde wie folgt durchgeführt: der Ligationsansatz wurde zu 100 μl Suspension kompetenter *E. coli* (auf Eis aufgetaut) gegeben und zunächst für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 900 μl LB-Medium (2,5 % [w/v]) zugegeben und für weitere 60 min im Thermomixer inkubiert. Auf LB-Agar-Platten (4 % [w/v] mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) wurden 10 oder 100 μl oder auch der gesamte Transformationsansatz (nach ca. 30 s Zentrifugation [15300 \times g], Abgießen des Überstands und Pellet im Rücklauf resuspendiert) ausplattiert. Nach ca. 15 h Inkubation (über Nacht) im Brutschrank bei 37 °C sollten auf den Platten Bakterienklone gewachsen sein. Durch das Ampicillin konnten nur die Bakterien Klone bilden, die das pKK-Plasmid aufgenommen hatten. Dabei konnte jedoch noch nicht gesagt werden, dass der Vektor auch die ADH-cDNA enthielt, da er auch einfach religiert sein könnte.

2.2.3.1 Klonanalyse

Zur Analyse des Transformationserfolgs wurden die erhaltenen Klone mittels steriler Pipettenspitzen von der LB-Agar-Platte gepickt und in 3 ml LB-Medium (mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) angeimpft. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator. Von den Bakteriensuspensionen wurden 1,5 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 15300 \times g für 1 min zentrifugiert (die restliche Kultur wurde bei 4 °C gelagert). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zur Plasmid-DNA-Präparation im Mini-Maßstab verwendet (mit dem Plasmid Midi Kit). Dazu wurde das Pellet zunächst in 100 μl Resuspensionpuffer aufgenommen. Anschließend wurden 100 μl Lysispuffer und nach Lyse der Proben durch 2-3maliges Invertieren 100 μl Neutralisationpuffer zugegeben. Die dabei ausfallenden unlöslichen Komponenten wurden durch Zentrifugation mit 23100 \times g für 10 min bei 4 °C abgetrennt. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die Plasmid-DNA mit je 200 μl Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation (23100 \times g, 5 min, 4 °C) wurden die Überstände verworfen, die Pellets in 500 μl Ethanol (70 % [v/v]) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 50 μl H₂O aufgenommen. Zur Klonanalyse wurden anschließend 5 μl

der Plasmid-DNA mit, für zum spezifischen Nachweis der jeweiligen hADH, geeigneten Restriktionsenzymen verdaut (z.B. für ADH1B mit *Hin* cII). Die Auswertung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.2.2) (Abb. 10).

Von den übrigen 1,5 ml der Übernachtskultur positiver Klone wurde mit je 50 μ l (die übrige Kultur wurde vorerst weiter bei 4 °C gelagert) eine 50 ml-Kultur (LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin) angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C angezogen. Die Kulturreste negativer Klone wurden entsorgt. Die 50 ml-Kulturen wurden am nächsten Tag mit $4500 \times g$ für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und aus den Pellets mit dem Plasmid Midi Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert (im Midi-Maßstab). Die erhaltenen DNA-Pellets wurden in 100 μ l H₂O aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Gene Quant II bestimmt und eine ausreichende Menge der Plasmid-DNA zunächst eines positiven Klons zum Sequenzieren geschickt (Agowa, Berlin, Deutschland). Dies diente dem Ausschluss von PCR-Artefakten. Die Sequenzierung erfolgte mit den Primern pKK S2 und pKK R2 (Tabelle 7). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Vector NTI Advanced™ 9 (Infor Max, Oxford, UK) und dem BLAST Tool (Basic Local Alignment Search) von NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) ausgewertet. Von positiven Klonen mit korrekter Sequenz wurden DMSO-Stocks angelegt (Abschnitt 2.2.6).

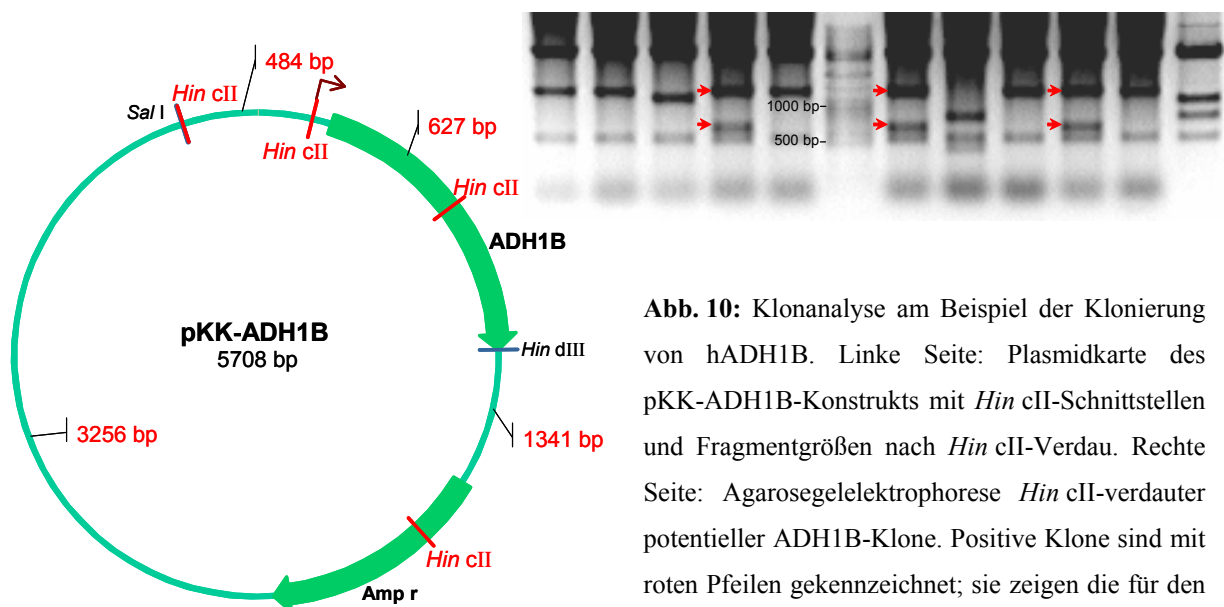


Abb. 10: Klonanalyse am Beispiel der Klonierung von hADH1B. Linke Seite: Plasmidkarte des pKK-ADH1B-Konstrukts mit *Hin* cII-Schnittstellen und Fragmentgrößen nach *Hin* cII-Verdau. Rechte Seite: Agarosegelelektrophorese *Hin* cII-verdauter potentieller ADH1B-Klone. Positive Klone sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet; sie zeigen die für den Einbau von ADH1B spezifischen Fragmente von 627 und 1341 bp Größe.

Die Plasmid-DNA dieser Klone diente zudem als Ausgangsmaterial für die Transformation von *S. typhimurium* TA1538 (Abschnitt 2.2.8) sowie TA100 (nach Umklonierung in pKN, Abschnitt 2.2.9). Des Weiteren diente sie als Ausgangsmaterial für die Umklonierung in den pET-28b(+)-Vektor (Abschnitt 2.3.1).

Eine erfolgreiche Klonierung von ADH5b- und 5c-cDNA gelang trotz wiederholter Versuche nicht. Daher wurden diese Spleißvarianten durch ortsspezifische Mutagenese aus einem pKK-ADH5a-Konstrukt erzeugt (Abschnitt 2.2.4). Mit dieser Methode wurde zuvor außerdem eine Abweichung zur Referenzsequenz mit Auswirkung auf die Aminosäure-Sequenz in der ADH5a-Sequenz selbst korrigiert (Abschnitt 2.2.4).

2.2.4 Korrektur der hADH5a-Sequenz und Erzeugung der hADH5b- und 5c-Sequenzen

Die Sequenz des einzigen erhaltenen positiven pKK-ADH5a-Klons enthielt an Position 1006 den Basenaustausch T → C, der den Aminosäureaustausch Tyr → His bewirken würde. Dieses PCR-Artefakt wurde unter Verwendung der Primer 5a-Kor.SNP1006-F und -R (Tabelle 7) durch ortsspezifische Mutagenese (mit dem Quick Change[®]Site-Directed Mutagenesis Kit) korrigiert. Die Plasmid-DNA wurde dabei in einer PCR mit den genannten Primern im Thermocycler amplifiziert.

Mutageneseansatz: 50 ng pKK-ADH5a
 5 µl 10× Mutagenese-Puffer
 je 125 ng Vorwärts- und Rückwärtsprimer
 1 µl dNTP-Mix (optimierte Zusammensetzung für Mutagenese)
 2,5 U *Pfu* Turbo[®] DNA Polymerase
 ad 50 µl H₂O

Thermocyclerprogramm:

Initiale Denaturierung:	30 s	95 °C	
Denaturierung:	30 s	95 °C	
Primeranlagerung:	1 min	55 °C	
Extension:	6 min	68 °C	× 12

Nach Beendigung der Mutagenese wurden 10 U *Dpn* I zu dem Ansatz gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. *Dpn* I schneidet nur die methylierte Matrizen-DNA, somit sorgt dieser Verdau dafür, dass der Ansatz nahezu ausschließlich das neusynthetisierte Plasmid mit der gewünschten Veränderung enthält. Mit 20 µl des Ansatzes erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, die Transformation kompetenter *E. coli* XL-1 (Abschnitt 2.2.7). Mit den erhaltenen Klonen wurden Vorkulturen (in 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und für 8 h bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen. Mit 100 µl dieser Vorkulturen wurden 50 ml Übernachtskulturen angeimpft. Aus einer dieser Kulturen wurde, wie in Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben, die Plasmid-DNA im Midi-Maßstab isoliert und ein Aliquot zum Sequenzieren versandt. Nach Bestätigung des Erfolgs der Mutagenese diente sie als Matrize zur Erzeugung von pKK-hADH5b und -5c-Konstrukten mittels weiterer ortsspezifischer Mutagenesen. Zudem diente sie als Ausgangsmaterial für den Versuch der Transformation von *S. typhimurium* TA1538 (Abschnitt 2.2.8) sowie TA100 (nach Umklonierung in pKN, Abschnitt 2.2.9). Des weiteren wurde sie für die Umklonierung in den pET-28b(+)-Vektor verwendet (Abschnitt 2.3.1). Von diesem Klon wurden auch DMSO-Stocks angelegt (Abschnitt 2.2.6).

Die Erzeugung des pKK-hADH5b erfolgte mit den Primern 5a→b-F und -R (Tabelle 7) wie oben beschrieben (18 Amplifikationszyklen). Das pKK-hADH5c-Konstrukt wurde mit den Primern 5a→c-F und -R (Tabelle 7) erzeugt (18 Zyklen). Analog zur oben beschriebenen Methode erfolgten *Dpn* I-Verdau und Transformation kompetenter *E. coli* (Abschnitt 2.2.7). Der Erfolg der Mutagenesen wurde durch Sequenzierung der Plasmid-DNA überprüft. Von je einem positiven Klon wurden DMSO-Stocks angelegt (Abschnitt 2.2.6). Darüber hinaus diente die Plasmid-DNA als Ausgangsmaterial für den Versuch der Transformation von *S. typhimurium* TA1538 (Abschnitt 2.2.8) sowie TA100 (nach Umklonierung in pKN, Abschnitt 2.2.9).

2.2.5 Verifizierung der Existenz des hADH5c-RT-PCR-Produkts

Eine direkte Klonierung von hADH5b- und 5c-cDNA war nicht erfolgreich, die entsprechenden pKK-Konstrukte waren durch ortsspezifische Mutagenese aus dem pKK-hADH5a-Konstrukt erzeugt wurden (Abschnitt 2.2.4). Zur Absicherung, ob das kleinere der beiden RT-PCR-Produkte, die mit den Primern ADH5 cds-F und ADH5b/c Hind-R amplifiziert wurden (Abschnitt 2.2.1.3) (Abb. 11), tatsächlich der, im Gegensatz zur

hADH5b, nur durch eine Referenz (Strausberg *et al.*, 2002) belegten hADH5c entspricht, wurde dieses Produkt sequenziert.

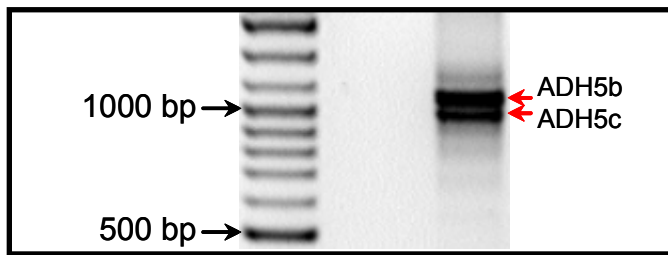


Abb. 11: Amplifikation von hADH5b- und 5c-cDNA. Die Amplifikation erfolgte wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben. Mit 5 μ l des PCR-Ansatzes wurde anschließend eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (Abschnitt 2.2.2).

Dazu war es notwendig das mutmaßliche ADH5c-Produkt, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, aus dem Gel zu extrahieren. Diese Extraktion wurde zweimal hintereinander durchgeführt, um Kontaminationen mit dem ADH5b-Produkt auszuschließen. Um eine ausreichende DNA-Menge zur Sequenzierung zu erhalten, wurde mit 1 μ l des Gelextrakts als Matrize noch einmal eine PCR entsprechend den Angaben in den Abschnitten 2.2.1 und 2.2.1.3 durchgeführt. Das Produkt wurde zum Sequenzieren versandt. Die Sequenzierung erfolgte mit den PCR-Primern und konnte bestätigen, dass die Sequenz des PCR-Produktes der ADH5c-Sequenz entspricht.

2.2.6 Anlegen von DMSO-Stocks

Für das Anlegen von DMSO-Stocks wurden 30 μ l einer Bakteriensuspension (Übernachtskultur) in 3 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion) und 3-4 h ($OD_{600} \approx 0,5$) bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen. Anschließend wurden 10 % (v/v) DMSO zugegeben und gut gemischt. Die Suspension wurde aliquotiert (à 1 ml) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.7 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung zur Aufnahme von Fremd-DNA fähiger (kompetenter) Bakterien erfolgte chemisch mit der Calciumchloridmethode. Eine 3 ml Übernachtskultur (in LB-Medium ohne Antibiotikum) wurde bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen und mit dieser eine 300 ml Kultur angeimpft (LB-Medium ohne Antibiotikum). Diese wurde 3-4 h ($OD_{600} \approx 0,5$) bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden dann durch Zentrifugation mit 7000 $\times g$ für 5 min bei 4 °C pelletiert. Nach

Verwerfen des Überstands und Resuspension in insgesamt 18 ml 100 mM CaCl₂ (eisgekühlt) wurde für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation mit 4500 × g für 15 min bei 4 °C. Das Pellet wurde, nach Verwerfen des Überstands, in 100 mM CaCl₂ mit 15 % (w/v) Glycerol (eisgekühlt) resuspendiert. Die Suspension wurde in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert (à 200 µl) und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.8 Transformation von *S. typhimurium* TA1538

Zur Transformation von *S. typhimurium* TA1538 war nicht direkt möglich, da Plasmid-DNA aus *E. coli* zerstört werden würde. Daher wurden mit 2 µg pKK-hADH-Konstrukt zunächst kompetente *S. typhimurium* LB5000 (Abschnitt 2.2.7) transformiert, analog zum in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Vorgehen. Dieser Stamm ist Methylierungs-profizient und Restriktions-defizient (Bullas & Ryu, 1983), das heißt, in diesen Bakterien werden die Plasmide aus *E. coli* auf Salmonellenmethylierungsmuster ummethyliert, ohne zerstört zu werden. Mit einem der erhaltenen Klone wurde eine 3 ml Übernachtskultur (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen. Die Plasmid-DNA wurde, wie in Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben, im Mini-Maßstab isoliert und mit dieser (10 µl) anschließend kompetente *S. typhimurium* TA1538 (Abschnitt 2.2.7) transformiert, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Mit den erhaltenen Klonen wurden sechs Übernachtskulturen (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen. Nach Bestimmung der spontanen Mutationsrate (Abschnitt 2.2.11) wurde ein Klon ausgewählt und von diesem DMSO-Stocks angelegt (Abschnitt 2.2.6).

2.2.9 Umklonierung der hADH-cDNA in den Vektor pKN

Die Umklonierung der hADH-cDNA in den Vektor pKN (Abb. 12), ein Derivat von pKK233-2 mit Neomycin-Resistenzgen (Glatt & Meinel, 2005), war für die Transformation von *S. typhimurium* TA100 notwendig. TA100 ist wie TA1538 ein Salmonellenstamm, der im bakteriellen Mutagenitätstest (Ames-Test) Verwendung findet, sich jedoch für die Detektion anderer Mutationen eignet (Substitutions- anstatt Leserastermutationen) (Maron & Ames, 1983).

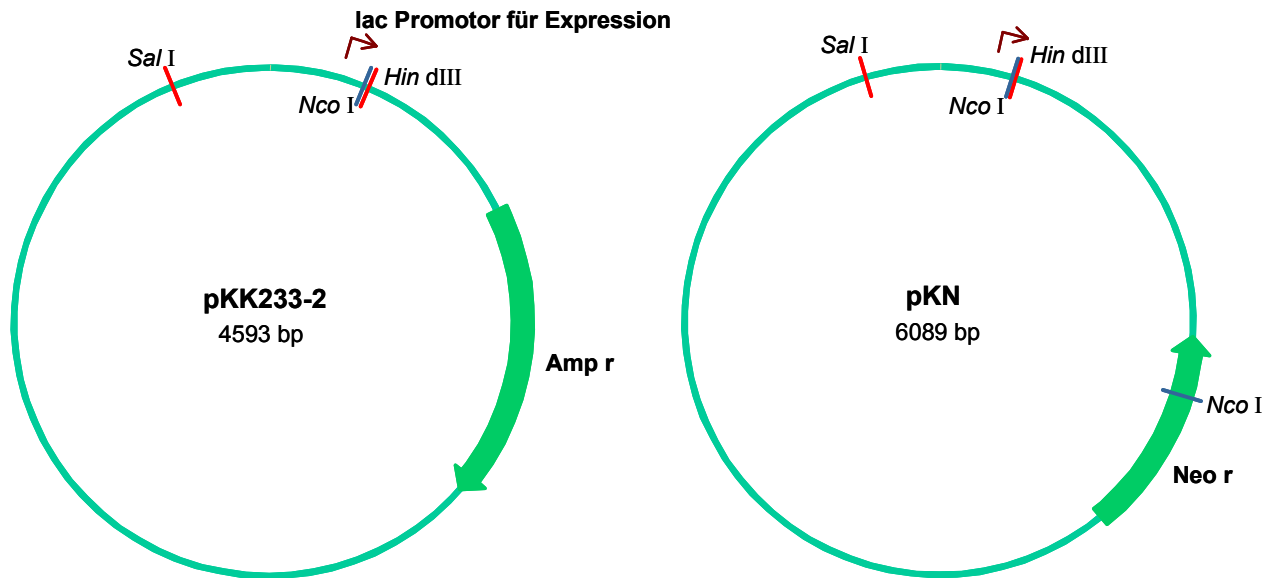


Abb. 12: Plasmidkarten der Vektoren pKK233-2 und pKN. Unter Nutzung der *Nco* I- und *Hin* dIII-Schnittstellen wurden hADH-cDNA in den pKK233-2-Vektor kloniert (Abschnitt 2.2.3). Über die jeweiligen *Sal* I- und *Hin* dIII-Schnittstellen erfolgte die Umklonierung in den pKN-Vektor. Amp^r und Neo^r bezeichnen die jeweiligen Resistenzgene für Ampicillin bzw. Neomycin.

Da TA100 per se resistent gegen Ampicillin sind, ist eine Selektion auf den pKK233-2-Vektor in diesem Stamm nicht möglich. Daher erfolgte eine Umklonierung der hADH-cDNA aus dem pKK-Vektor in den pKN-Vektor über die jeweiligen *Sal* I- und *Hin* dIII-Schnittstellen (vergleiche Abb. 12). Dafür wurden der pKN-Vektor und die jeweiligen pKK-hADH-Konstrukte zunächst separat verdaut. Nach ca. 15 h Inkubation bei 37 °C wurde der pKK-hADH-Verdauansatz einer Hitzeinaktivierung (65 °C, 20 min) unterzogen, während der pKN-Verdau auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und einer Elektrophorese unterzogen wurde (Abschnitt 2.2.2).

Restriktionsansätze: 5 µg pKN	2 µg pKK-hADH
10 µl 10× Y ⁺ /Tango™ Puffer	4 µl 10× Y ⁺ /Tango™ Puffer
25 U <i>Sal</i> I	10 U <i>Sal</i> I
25 U <i>Hin</i> dIII	10 U <i>Hin</i> dIII
ad 50 µl H ₂ O	ad 20 µl H ₂ O

Die Vektorbande wurde anschließend, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, aus dem Gel extrahiert. Danach wurden 5 µl des präparierten pKN-Vektors mit 4 µl des pKK-hADH-Verdauansatzes, wie unter Abschnitt 2.2.3 beschrieben, ligiert und mit diesem

Ligationsansatz kompetente *E. coli* XL-1 (Abschnitt 2.2.7) transformiert (Abschnitt 2.2.3). Der Transformationsansatz wurde auf Kanamycin-haltigen LB-Agar-Platten (40 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Die erhaltenen Klone wurden durch Restriktionsanalyse (siehe Abschnitt 2.2.3.1) überprüft. Von einem positiven Klon wurden DMSO-Stocks angelegt (Abschnitt 2.2.6). Darüber hinaus diente die Plasmid-DNA dieses Klons als Ausgangsmaterial für die Transformation von *S. typhimurium* TA100 (Abschnitt 2.2.10).

2.2.10 Transformation von *S. typhimurium* TA100

Die Transformation von *S. typhimurium* TA100 erfolgte analog zu dem für die Transformation von *S. typhimurium* TA1538 beschriebenen Verfahren (Abschnitt 2.2.8). Zur Selektion auf die pKN-hADH-Konstrukte enthielten die LB-Agarplatten und das LB-Medium Kanamycin (40 µg/ml) anstatt Ampicillin. Nach Bestimmung der spontanen Mutationsrate (Abschnitt 2.2.11) wurde ein Klon ausgewählt und von diesem DMSO-Stocks angelegt (Abschnitt 2.2.6).

2.2.11 Bestimmung der spontanen Mutationsrate

Benötigte Lösungen und Gele:

HBT-Lösung:

250 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,4
je 500 µM L-Histidin, D-Biotin
und L-Tryptophan

Topagar:

0,6 % (w/v) Bacto-Agar
0,1 M NaCl
10 % (v/v) HBT-Lösung

Minimalagar:

1,5 % (w/v) Bacto-Agar
100 mM D-Glucose
16 mM Zitronensäure
100 mM K₂HPO₄
0,8 mM MgSO₄

S. typhimurium TA1538 und TA100, sind Stämme, die nicht mehr zur Histidinsynthese in der Lage sind (Histidin-auxotroph) und können daher in Abwesenheit von Histidin nicht wachsen.

Spontane Reversionen können zu Histidin-prototrophen Bakterien führen. Die spontane Mutationsrate wird durch Reversionstests mit auxotrophen Bakterien auf Histidin-freiem Medium bestimmt.

S. typhimurium TA1538 und TA100 wurden mit hADH transformiert (Abschnitte 2.2.8 und 2.2.10). Jeweils sechs Klone wurden gepickt und in je 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen. Für die Bestimmung der spontanen Mutationsrate wurden zu 1 mM MgSO₄ 100 µl der Übernachtskultur gegeben. Dann wurden 2 ml Topagar dazugegeben und die Suspension auf Minimalagarplatten ausplattiert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Platten wurden für 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend wurden die Kolonien ausgezählt. Die Revertanzahl für die TA1538-Stämme sollte bei ca. 20 liegen und für die TA100-Stämme bei ca. 100. Dementsprechend wurden die Klone ausgewählt, von denen DMSO-Stocks angelegt wurden (Abschnitt 2.2.6).

2.3 Generierung von Antiseren gegen humane ADH

Da geeignete Antikörper gegen humane ADH kommerziell nicht erhältlich sind, wurden Antiseren gegen ein Enzym jeder ADH-Subfamilie (1A, 2, 3, 4, 5a) in Kaninchen generiert. Zur Immunisierung der Kaninchen wurden die ADH-Proteine in Form von „inclusion bodies“ verwendet. Diese wurden mit dem pET-Expressionssystem in *E. coli* BL21 (DE3) produziert.

Das pET-Expressionssystem benutzt den Bakteriophagen T7 Promotor zur Expressionskontrolle von Zielgenen. Nur in Anwesenheit einer T7-RNA-Polymerase, welche unter der Kontrolle des *lac*-Promotors steht, kann die Expression in der Wirtszelle (*E. coli* BL21 (DE3), besitzt chromosomale Kopie des T7-RNA Polymerase-Gens) erfolgen. Durch IPTG wird der *lac*-Repressor vom *lac*-Promotor gelöst und somit die Transkription der T7-RNA-Polymerase induziert, folglich auch die Transkription der Zielgene.

2.3.1 Klonierung der hADH-cDNAs in den Vektor pET-28b(+)

Zur Klonierung der hADH-cDNA in den pET-Vektor wurden diese zunächst durch PCR amplifiziert (die pKK-hADH-Plasmid-DNA als Matrize nutzend). Dies diente der Einführung einer *Nde* I-Schnittstelle am Beginn der kodierenden Sequenz der hADH-cDNA für die Klonierung in den pET-Vektor (Abb. 13). Notwendig war dies deshalb, da bis auf ADH2 und 3 die ADH-cDNA nicht in geeigneter Weise aus dem pKK-Vektor herausgeschnitten werden

können. Lediglich für ADH2 und 3 wäre auch eine Klonierung in den pET-Vektor mit *Nco* I und *Hin* dIII möglich gewesen. Dies wurde jedoch nicht durchgeführt, um den nur bei Klonierung mit *Nde* I und *Hin* dIII vorhandenen N-terminalen His-Tag für eventuelle Aufreinigungen nutzen zu können. Die PCR wurden durchgeführt wie unter Abschnitt 2.2.1 beschrieben mit 10-30 ng pKK-hADH-Plasmid-DNA als Matrize. Als Vorwärtsprimer dienten ADH1 Nde-F (ADH1A), ADH2/4 Nde-F (ADH2 und 4), ADH3 Nde-F (ADH3) und ADH5 Nde-F (ADH5a) (Primersequenzen siehe Tabelle 7). Als Rückwärtsprimer wurden die jeweiligen zur Amplifikation der hADH-cDNA verwendeten Rückwärtsprimer (Abschnitte 2.2.1.1-2.2.1.3) verwendet. Die Primeranlagerungstemperaturen waren 59 °C (ADH1A), 54,4 °C (ADH2), 56 °C (ADH3), 54,5 °C (ADH4), 54,2 °C (ADH5a). Der Erfolg der PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft (Abschnitt 2.2.2). Die PCR-Produkte wurden vor der weiteren Verwendung gereinigt, dabei wurden gegebenenfalls bis zu zwei Ansätze vereinigt (Abschnitt 2.2.1.1). Anschließend wurden pET-Vektor und hADH-cDNA zusammen verdaut (ca. 15 h, 37 °C) mit anschließender Hitzeinaktivierung der Enzyme (20 min, 65 °C).

Restriktionsansatz: ca. 5 µg hADH-cDNA
1 µg pET-28b(+)
6 µl 10× R⁺ Puffer
30 U *Nde* I
30 U *Hin* dIII
ad 60 µl H₂O

Wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben wurde danach die Ligation durchgeführt und mit dem Ligationsansatz kompetente *E. coli* XL-1 (Abschnitt 2.2.7) transformiert. Ausplattiert wurde der Transformationsansatz auf Kanamycin-haltigen (40 µg/ml) LB-Agarplatten. Die erhaltenen Klone wurden durch Restriktionsanalyse (siehe Abschnitt 2.2.3.1) überprüft. Von einem positiven Klon wurden DMSO-Stocks angelegt (Abschnitt 2.2.6). Darüber hinaus diente die Plasmid-DNA dieses Klons als Ausgangsmaterial für die Transformation von *E. coli* BL21 (DE3) (Abschnitt 2.3.2).

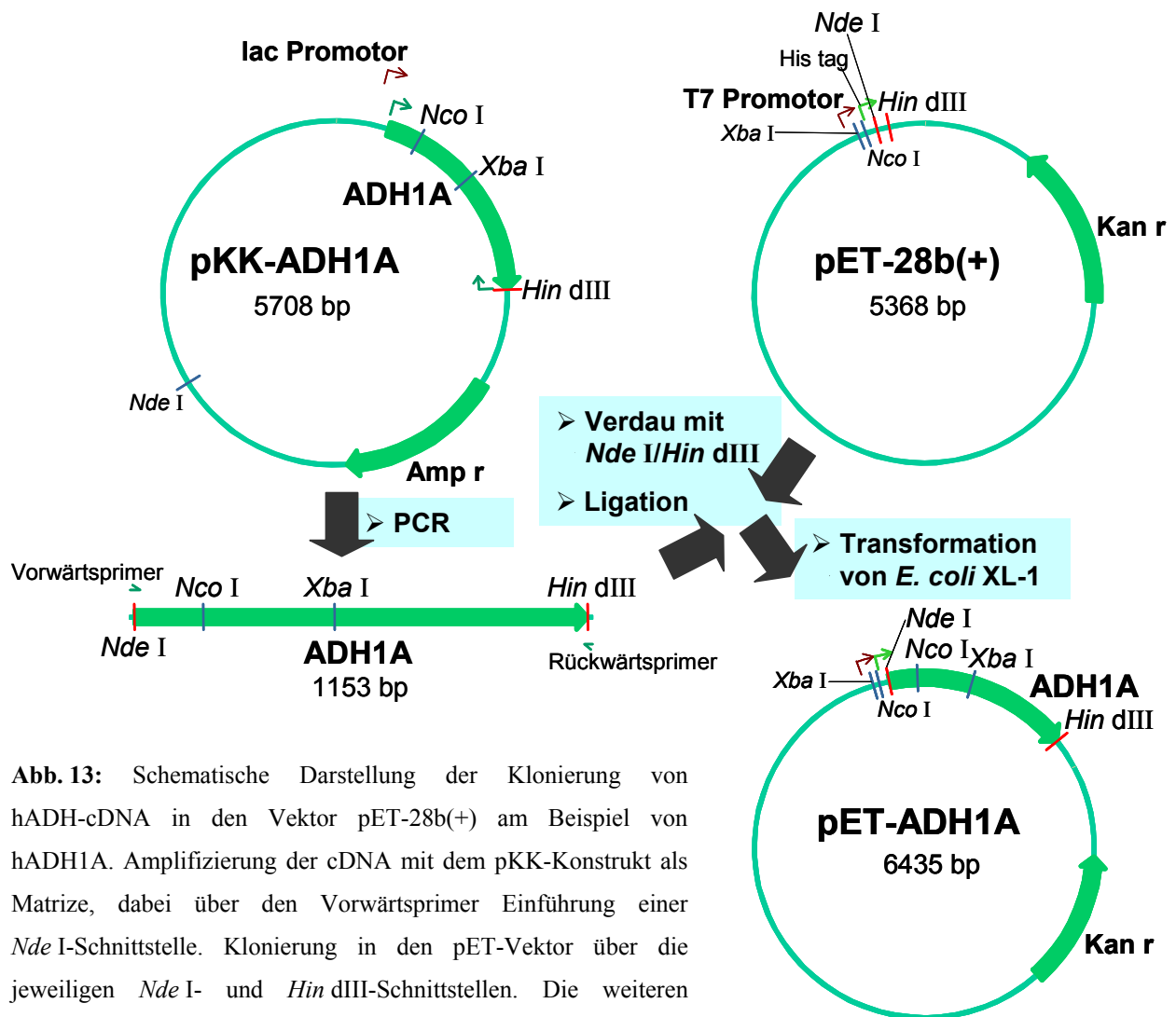


Abb. 13: Schematische Darstellung der Klonierung von hADH-cDNA in den Vektor pET-28b(+) am Beispiel von hADH1A. Amplifizierung der cDNA mit dem pKK-Konstrukt als Matrize, dabei über den Vorwärtsprimer Einführung einer *Nde* I-Schnittstelle. Klonierung in den pET-Vektor über die jeweiligen *Nde* I- und *Hin* dIII-Schnittstellen. Die weiteren eingezeichneten Schnittstellen (*Nco* I und *Xba* I) in der hADH1A-Sequenz waren für die Restriktionsanalyse der Klone von Bedeutung. Amp^r und Kan^r stehen für Ampicillin- bzw. Kanamycinresistenzgenen.

2.3.2 Transformation von *E. coli* BL21 (DE3), Induktion der hADH-Expression und „inclusion body“-Test

Kompetente *E. coli* BL21 (DE3) (Abschnitt 2.2.7) wurden mit Plasmid-DNA (pET-hADH), gewonnen aus transformierten *E. coli* XL-1 (Abschnitt 2.3.1), transformiert. Dies erfolgte analog zu dem in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Vorgehen. Der Transformationsansatz wurde auf Kanamycin-haltigen (40 µg/ml) LB-Agarplatten ausplattiert.

Mit einem der erhaltenen Klone wurde eine 3 ml Übernachtskultur (LB-Medium mit 40 µg/µl Kanamycin) angeimpft. Diese wurde bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen. Mit 1 ml dieser Kultur wurden 100 ml LB-Medium (40 µg/ml Kanamycin) angeimpft und ca. 3-4 h ($OD_{600} \approx 0,6$) bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen. Ein Aliquot (250 µl) wurde

entnommen, die Kultur mit 1 mM IPTG induziert und bei 37 °C für weitere 3 h kultiviert. Aliquots (250 µl) wurden 30 min, 1, 2 und 3 h nach der Induktion entnommen. Alle diese Aliquots wurden mit $15300 \times g$ für 1 min zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets in $1 \times$ SDS-Probenpuffer (Abschnitt 2.3.3) resuspendiert. Diese Proben dienten der Überprüfung von Erfolg und Verlauf der Induktion der hADH-Proteinexpression mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.3.3) und anschließender Coomassie-Färbung (Abschnitt 2.3.4) (Abb. 14). Nach diesen 3 h wurde die Kultur auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen (à 45 ml) und ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (10 ml) aufgeteilt und abzentrifugiert ($4500 \times g$, 15 min, 4 °C). Die aus den 45 ml Kultur resultierenden Pellets wurden, nach Verwerfen des Überstands, zunächst bei -20 °C gelagert.

Mit dem aus den 10 ml Kultur resultierenden Pellet wurde ein „inclusion body“-Test durchgeführt um festzustellen, in welcher subzellulären Fraktion (löslich oder unlöslich) das hADH-Protein vorlag. Dazu wurde das Pellet zunächst in 1 ml TE-Puffer (50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) suspendiert. Ein 10 µl Aliquot wurde entnommen. Der Suspension wurden 0,1 mg/ml Lysozym und 0,1 % (w/v) Triton X-100 zugesetzt, gut gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz (auf Eis stehend) mit dem Ultraschallstab sonifiziert (3×10 s, dazwischen je 30 s Pause). Durch Zentrifugation ($20000 \times g$, 15 min, 4 °C) wurde dann die unlösliche Fraktion sedimentiert. Der Überstand (= lösliche Fraktion) wurde vollständig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein 10 µl Aliquot entnommen. Das Pellet (= unlösliche Fraktion) wurde in 1 ml TE-Puffer aufgenommen und ebenfalls ein 10 µl Aliquot entnommen. Die drei 10 µl Aliquots wurden mit je 5 µl $3 \times$ SDS-Probenpuffer (Abschnitt 2.3.3) versetzt und durch SDS-PAGE (Abschnitt 2.3.3) und anschließende Coomassie-Färbung (Abschnitt 2.3.4) analysiert (Abb. 14).

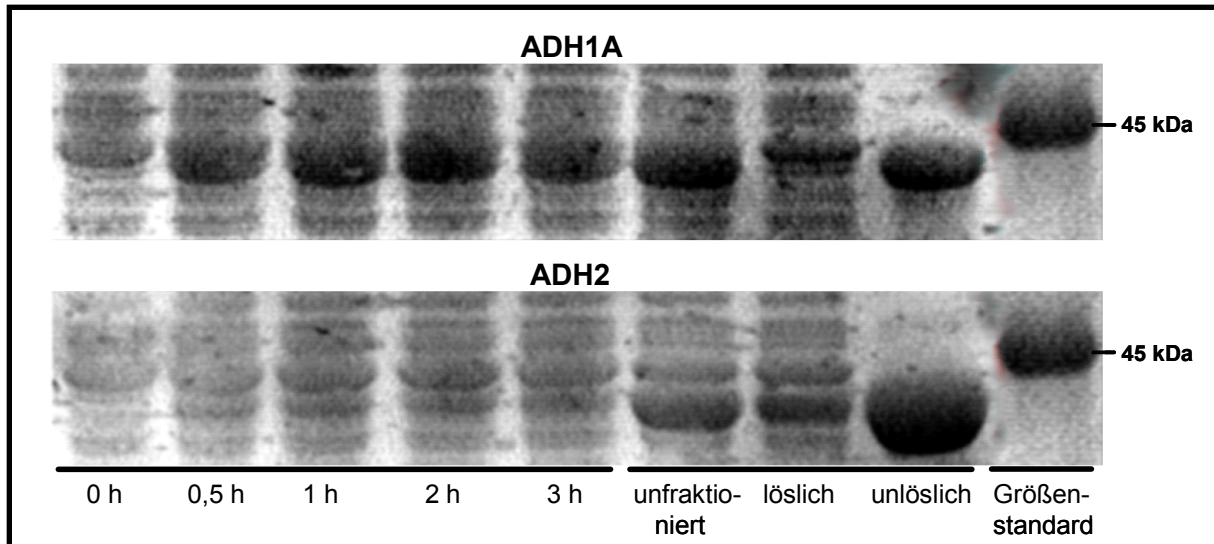


Abb. 14: Induktion der hADH-Expression in *E. coli* BL21 (DE3) und „inclusion body“-Test am Beispiel von hADH1A und 2. Coomassie-gefärbte 10 %ige SDS-PA-Gele. Maximale hADH-Expression offensichtlich bereits 1 h nach IPTG-Induktion, hADH-Protein vollständig (1A) bzw. hauptsächlich (2) in der unlöslichen Fraktion („inclusion bodies“). Analoge Ergebnisse wurden für hADH3, 4 und 5a erhalten.

2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Proteinauftrennung wurde die vertikale SDS-PAGE angewandt (Laemmli, 1970). Sofern nicht anders angegeben wurden Trenngel (11×14 cm, Stärke: 1,5 mm) mit einem Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) –Gehalt von 10 % (w/v) verwendet. Die Trenngelmischungen enthielten zudem 375 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,03 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (Quervernetzer) und 0,03 % (v/v) TEMED (Katalysator). Nach Polymerisation der Trenngels wurden auf dieses noch ein Sammelgel mit der folgenden Zusammensetzung gegossen: 3 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 125 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,03 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat und 0,1 % (v/v) TEMED. Durch das Einstecken eines Probenkamms in das noch nicht polymerisierte Sammelgel entstanden nach der Polymerisation die Probenaschen.

Benötigte Puffer:SDS-Probenpuffer (3×):

8 % (w/v) SDS
20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
12 % (w/v) Saccharose
20 mM Tris/HCl pH 8
0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Laufpuffer:

25 mM Tris
190 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

Vor dem Beladen der Probenflaschen mit den Proben wurde diesen im Verhältnis 2:1 3× SDS-Probenpuffer zugesetzt, Pellets wurden direkt in 1× SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden 5 min im Wasserbad gekocht, anschließend kurz abzentrifugiert und in die Probenflaschen überführt. Zur Elektrophorese wurde Laufpuffer verwendet. In der Regel erfolgte die Elektrophorese über Nacht mit 6 (1 Gel) bzw. 12 mA (2 Gele). Am nächsten Tag wurde die Elektrophorese, nachdem die Lauffront (kenntlich am Bromphenolblau) die untere Trenngelkante erreicht hatte, beendet. Die Gelkuvette wurde auseinandergebaut, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel entweder Coomassie-gefärbt (Abschnitt 2.3.4) oder geblottet (Abschnitt 2.4.2).

2.3.4 Coomassie-Färbung

Benötigte Lösungen:Coomassie-Färbelösung:

42,5 % (v/v) Ethanol
5 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
0,1 % (w/v) Coomassie[®] Brillantblau G250

Entfärber/Fixierer:

10 % (v/v) Methanol
7 % (v/v) Essigsäure

Nach der SDS-PAGE (Abschnitt 2.3.3) wurde das Trenngel für 5-10 min unter Schwenken in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Danach wurde diese abgegossen und das Gel in Entfärber/Fixierer zusammen mit einem Entfärberbeutel (Amnesco, Solon, USA) inkubiert. Nach ca. 4-6 h war das Gel so weit entfärbt, dass das Ergebnis mit dem LAS-1000 aufgenommen werden konnte.

2.3.5 Präparation von „inclusion bodies“

Nach dem Nachweis der exprimierten hADH-Proteine in der unlöslichen Fraktion von *E. coli* BL21 (DE3) (Abschnitt 2.3.2), wurden sie in Form von „inclusion bodies“ aufgereinigt. Dazu wurden die aus den je 45 ml Kultur resultierenden Pellets des Induktionsversuchs (Abschnitt 2.3.2) verwendet.

Benötigte Puffer:

Lysepuffer:

50 mM Tris/HCl pH 8
1 mM EDTA
5 % (w/v) Saccharose

Detergenzpuffer:

20 mM Tris/HCl pH 7,5
200 mM NaCl
2 mM EDTA
1 % (w/v) Nonidet P40
10 mM 2-Mercaptoethanol

Waschpuffer I:

20 mM Tris/HCl pH 7,5
1 mM EDTA
0,5 % (w/v) Triton X-100
10 mM 2-Mercaptoethanol

Waschpuffer II:

50 mM Tris/HCl pH 8
1 mM EDTA
10 mM DTT

Die Pellets wurden aufgetaut und in je 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurde 0,1 mg/ml Lysozym zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 20 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂ und 110 µg DNase I wurde noch einmal für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden je 3 ml Detergenzpuffer zugegeben, gut gemischt und die Suspension auf 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die unlöslichen Proteine wurden durch Zentrifugation mit 15000 x g für 15 min bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets zweimal mit je 1 ml Waschpuffer I und anschließend zweimal mit je 1 ml Waschpuffer II gewaschen. Die „inclusion bodies“ wurden schließlich in je 250 µl Waschpuffer II aufgenommen und sonifiziert (wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben). Anschließend wurden Aliquots zur Proteinbestimmung (Abschnitt 2.3.6) abgenommen und adäquat (mindestens 1:20) verdünnt. Die „inclusion bodies“ wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die Kaninchenimmunisierung (Abschnitt 2.3.7) wurde eine ausreichende

Menge „inclusion bodies“ mit PBS-SDS-Puffer verdünnt (Endkonzentration 1,25 mg/ml), aliquotiert (à 200 µl) und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

PBS-SDS-Puffer pH 7,4:

140 mM NaCl

2,7 mM KCl

5,4 mM Na₂HPO₄

1,8 mM KH₂PO₄

1 % (w/v) SDS

Darüber hinaus wurden die „inclusion bodies“ als Standards zur Bestimmung des Expressionlevels der heterolog exprimierten hADHs benutzt (Abschnitt 2.4.3).

2.3.6 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Proben erfolgte eine Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) (Smith *et al.*, 1985), der eine Kombination der Biuret-Reaktion mit der selektiven Bicinchoninsäure-Komplexierung von Cu⁺ darstellt. Bei der Biuret-Reaktion bildet Cu²⁺ im alkalischen Milieu einen Komplex mit der Peptidbindung und wird dabei zu Cu⁺ reduziert. Bei der BCA-Methode werden die entstandenen Cu⁺-Ionen von der Bicinchoninsäure cheliiert. Dabei entsteht ein violetter Farbkomplex, der colorimetrisch bestimmbar ist. Die Menge des entstandenen Farbkomplexes ist proportional zum Proteingehalt der Probe.

Die Proteinproben wurden adäquat verdünnt und in Dreifachbestimmung (je 10 µl) auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Zu jeder Probe wurden 200 µl der Reagenzienmischung (A:B, 50:1) gegeben und die Platte anschließend für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 562 nm im Mikrotiterplattenreader gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer mit vermessenen Eichreihe von BSA-Standards berechnet (Easy Fit Version 5.21, SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland).

2.3.7 Immunisierung von Kaninchen und Serumgewinnung

Für die Gewinnung von Antiseren gegen hADH wurde je ein Kaninchen immunisiert. Vor der Primärimmunisierung wurden dem Kaninchen ca. 2 ml Blut aus der Ohrvene entnommen.

Dies diente dem Ausschluss unspezifischer Störreaktionen kanincheneigener Antikörper mit humanen Proteinen. Das Blut wurde mit $2500 \times g$ für 30 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und das Serum abgenommen. Die Seren wurden bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und später auf einem Test-Blot (siehe Abschnitt 2.4.2) als Primärantikörper (Verdünnung 1:500) verwendet.

Für die Primärimmunisierung wurden zu $200 \text{ } \mu\text{l}$ Freund's Adjuvant complete $200 \text{ } \mu\text{l}$ der „inclusion body“-Suspension (Abschnitt 2.3.5) tropfenweise und unter Schütteln zugegeben. Die Applikation der erhaltenen Emulsion erfolgte subkutan an 3-4 Stellen des Rückens. Im Abstand von jeweils vier Wochen wurden die insgesamt 3-6 Folgeimmunisierungen durchgeführt. Die Herstellung der Impfemulsionen wurde analog zur Primärimmunisierung, jedoch mit Freund's Adjuvant incomplete durchgeführt. Zehn Tage nach jeder Folgeimmunisierung wurden ca. 2 ml Blut aus der Ohrvene abgenommen. Zehn Tage nach der letzten Folgeimmunisierung wurden die Kaninchen narkotisiert und ausgeblutet. Das gewonnene Blut wurde wie beschrieben aufgearbeitet und die Seren bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Die Seren wurden im Western Blot (Abschnitt 2.4.2) auf ihre Fähigkeit zur Immundetektion der hADH getestet. Sie dienten dann vor allem zur Charakterisierung der hADH-Expression in den transformierten Bakterien (Abschnitt 2.4.3). Das anti-hADH5a-Serum wurde darüber hinaus zur Detektion hADH5a-exprimierender V79-Zellklone eingesetzt (Abschnitt 2.5.2) sowie zur weiteren Charakterisierung der positiven Zellklone (Abschnitt 2.5.4).

2.4 Charakterisierung der hADH-exprimierenden Bakterienstämme

Die Charakterisierung der erzeugten Bakterienstämme erfolgte durch Bestimmung des hADH-Expressionslevels (Abschnitt 2.4.3) sowie durch funktionelle Untersuchungen (ADH-Aktivitätsmessungen, Abschnitt 2.4.4).

2.4.1 Herstellung von Bakterienzytosol

Zur Herstellung von Zytosol wurden 50-500 ml LB-Medium (mit dem jeweils benötigtem Antibiotikum bzw. ohne Antibiotikum bei nicht transformierten Bakterien) mit Bakterienstock (Abschnitt 2.2.6) angeimpft ($1 \text{ } \mu\text{l}$ Stock auf 1 ml Medium). Die Anzucht erfolgte über Nacht im Schüttelinkubator mit definiertem Programm (Kühlen: 3 h, $10 \text{ }^\circ\text{C}$, Anzucht: 9 h, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 200 rpm, anschließend Kühlen: $10 \text{ }^\circ\text{C}$). Die weiteren Schritte erfolgten auf Eis und mit gekühlten Puffern. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation mit $4500 \times g$

für 15 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 ml Tris/HCl (10 mM, pH 8) suspendiert und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in Tris/HCl (10 mM, 1 mM DTT, pH 8) suspendiert (200-800 µl je 50 ml Ausgangskultur) und in 1,5 ml Ultrazentrifugationsgefäße (Beckman, Krefeld, Deutschland) überführt. Durch Sonifizieren (wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben) erfolgte der Zellaufschluss. Danach wurden die unlöslichen Komponenten durch Zentrifugation mit 100000 × g für 1 h bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand (Zytosol) wurde abgenommen, nach Entnahme von Aliquots zur Proteinbestimmung (Abschnitt 2.3.6) in geeignete Portionen (je nach Verwendungszweck 100-2000 µl) aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Western-Blot

Zum Nachweis der exprimierten hADH in den Bakterien sowie zum ADH-Nachweis in humanen Organen mit den generierten Antiseren (Abschnitt 2.3) wurde die Methode des Western-Blot nach dem „Semi-Dry“-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) angewandt. Die zuvor durch SDS-PAGE (Abschnitt 2.3.3) aufgetrennten Proteine wurden dabei auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) transferiert (Abschnitt 2.4.2.1). Anschließend wurden die ADH mit den Antiseren spezifisch detektiert (Abschnitt 2.4.2.2). Auf diese Weise wurde die Qualität der erzeugten Antiseren getestet (Sensitivität und Spezifität). Darüber hinaus diente die Methode auch zur Quantifizierung des hADH-Anteils am zytosolischen Gesamtprotein in den transformierten Bakterien (siehe dazu Abschnitt 2.4.3).

2.4.2.1 Proteintransfer

Benötigte Puffer:

Anode I-Puffer:

300 mM Tris

20 % (v/v) Methanol

Anode II-Puffer:

25 mM Tris

20 % (v/v) Methanol

Kathodenpuffer:

40 mM ε-Aminocapronsäure

20 % (v/v) Methanol

0,01 % (w/v) SDS

Auf die Anode der Blotapparatur wurden zunächst sechs in Gelgröße (11×14 cm) zugeschnittene, in Anode I-Puffer getränkte Filterpapiere (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) gelegt. Auf diese wurden passgenau drei weitere in Anode II-Puffer getränkte Filterpapiere aufgelegt. Als nächstes folgte die zuvor ebenfalls in Anode II-Puffer eingeweichte Nitrocellulosemembran (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland), auf welche anschließend das Trenngel (Abschnitt 2.3.3) gelegt wurde. Zuletzt wurden noch neun in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere aufgelegt. Die Luftblasenfreiheit sämtlicher Schichten wurde durch Bearbeitung mit einem Walzenroller nach Hinzufügen jeder neuen Schicht gewährleistet. Zuletzt wurde die Kathodenplatte der Blotapparatur aufgelegt, die Apparatur verschlossen und Strom angelegt. Ein Gel wurde 1 h mit $1,6 \text{ mA/cm}^2$ geblottet, zwei Gele 2 h mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$.

2.4.2.2 Immundetektion

Benötigte Puffer:

TBST:

20 mM Tris/HCl pH 9

140 mM NaCl

0,1 % (w/v) Tween[®]20

Blockierungspuffer:

2 % (w/v) Magermilchpulver

in TBST

Nach Beendigung des Proteintransfers (Abschnitt 2.4.2.1) wurde die Nitrocellulosemembran zunächst für 1 h in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Danach wurde die Membran für 1 h mit dem Primärantikörper (verdünnt in Blockierungspuffer) inkubiert, der spezifisch an die zu untersuchenden ADH binden sollte. Anschließend wurde fünfmal für je 6 min mit TBST gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation (1 h) mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:2500 in Blockierungspuffer). Nach Beendigung dieser Inkubation wurde nochmals fünfmal für je 6 min mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran für ca. 1 min mit dem Western Lightning[™] Chemiluminescence Reagent Plus behandelt (Reagenzienmischung 1:1, für eine Membran: 1 ml Enhanced Luminol Reagent + 1 ml Oxydizing Reagent). Nach kurzem Abtrocknen mit Tissue-Tüchern wurde die Membran auf den Tisch des LAS-1000 gelegt. Die ausgelöste Chemolumineszenz wurde von der hochempfindlichen Videokamera des LAS-1000

festgehalten. Die dabei entstandenen Bandenmuster gaben die vom Primärantikörper spezifisch erkannten Proteinbanden wieder.

2.4.2.2.1 Reduktion von Kreuzreaktivitäten bei der Immundetektion

Um Kreuzreaktivitäten der erzeugten anti-hADH-Seren mit hADH anderer Subfamilien (Abschnitt 3.1) zu reduzieren, wurden die Antiseren mit Protein eben jener hADH präinkubiert, die nicht detektiert werden sollten. Als Proteinquelle dienten dabei 10 mg zytosolisches Protein transformierter Bakterien (Abschnitt 2.4.1) oder 0,1 mg „inclusion body“-Protein (Abschnitt 2.3.5) jeweils pro 50 ml Antiserum (1:20000 verdünnt). Das entsprechende Volumen Zytosol bzw. „inclusion bodies“ wurde dem in Blockierungspuffer verdünnten Antiserum zugesetzt und 1 h mit diesem unter Schütteln inkubiert (während die Nitrozellulosemembran in Blockierungspuffer inkubierte). Danach wurde mit dem so behandelten Antiserum die Immundetektion wie oben beschrieben durchgeführt.

2.4.2.3 Entfernen gebundener Antikörper („Stripping“)

„Stripping“-Puffer:

62,5 mM Tris/HCl pH 6,7

100 mM 2-Mercaptoethanol

2 % (w/v) SDS

Um einen Blot mit verschiedenen Primärantikörpern zu testen, mussten die gebundenen Antikörper zunächst wieder von der Nitrozellulosemembran entfernt werden. Dazu wurde die Membran eingerollt und in eine Hybridisierungsröhre (Biometra, Göttingen, Deutschland) transferiert, welche mit ca. 50 ml „Stripping“-Puffer befüllt wurde. Die Röhre wurde verschlossen und für 1 h bei 70 °C im Hybridisierungssofen inkubiert. Danach wurde der „Stripping“-Puffer verworfen und die Membran zweimal 10 min mit TBST (Abschnitt 2.4.2.2) gewaschen. Anschließend konnte die Immundetektion wie unter Abschnitt 2.4.2.2 beschrieben mit einem weiteren Primärantikörper durchgeführt werden.

2.4.3 Bestimmung des hADH-Anteils am zytosolischen Gesamtprotein in den transformierten Bakterien

Um den prozentualen Anteil des exprimierten hADH-Proteins am zytosolischen Gesamtprotein der transformierten Bakterien zu bestimmen bedurfte es nahezu reinen ADH-Proteins als Standard. Die „inclusion bodies“ (Abschnitt 2.3.5) waren dafür geeignet, da sie zu ca. 95 % aus hADH-Protein bestehen. Von einem Zytosol hADH-transformierter Bakterien wurden zwei verschiedene Proteinmengen, jeweils in Doppelbestimmung, zusammen mit einer Eichreihe der entsprechenden „inclusion bodies“ (mindestens vier unterschiedliche Proteinmengen) in einer SDS-PAGE (Abschnitt 2.3.3) aufgetrennt und anschließend geblottet (Abschnitt 2.4.2). Das Ergebnis der Immundetektion (Abschnitt 2.4.2.2) wurde mit der Software AIDA V2.31 (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) ausgewertet. Dabei wurde die Menge an hADH-Protein in den Zytosolproben über die „inclusion body“-Eichreihe berechnet und aus dieser mittels der eingesetzten Gesamtproteinmenge der Anteil des hADH-Proteins am zytosolischen Gesamtprotein in %.

2.4.4 Bestimmung der ADH-Aktivität

Bei der Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden durch ADH wird das Kosubstrat NAD zu NADH reduziert. Umgekehrt wird bei der Reduktion von Aldehyden zu Alkoholen NADH zu NAD oxidiert.

Die oxidierte und reduzierte Form des Kosubstrates besitzen charakteristische Absorptionsspektren mit verschiedenen Absorptionsmaxima (Abb. 15). Die Absorptionzunahme bzw. -abnahme bei 340 nm durch die Reduktion von NAD zu NADH bzw. Oxidation von NADH zu NAD kann spektrophotometrisch bestimmt werden. Mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von NADH bei 340 nm ($\epsilon_{340} \text{ NADH} = 6200 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) ist dann die Enzymaktivität berechenbar.

Die Oxidation von Ethanol (33 mM) und 1-Octanol (1 mM) sowie auch von HMF und HMFA wurde in 0,1 M Glycin/NaOH pH 10 mit 2,5 mM NAD spektrophotometrisch bei 340 nm untersucht. Zytosolisches Protein (200 μg , Abschnitt 2.4.1) diente dabei als Enzymquelle. Die ADH-Aktivität wurde berechnet in nmol gebildetes NADH pro min und mg eingesetztes Protein.

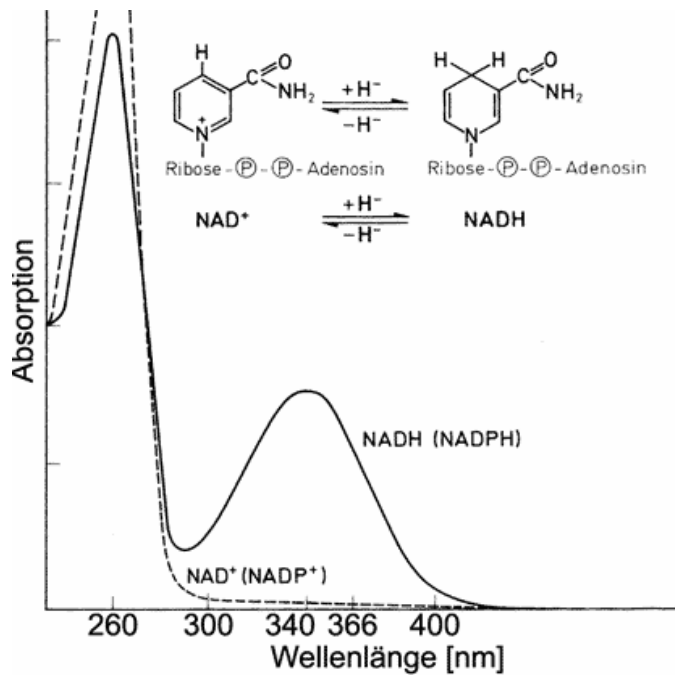


Abb. 15: Absorptionsspektren von NAD und NADH.

2.4.4.1 Bestimmung der ADH-Aktivität gegenüber benzylichen Alkoholen alkylierter PAK

Bei der Verwendung benzylicher Alkohole alkylierter PAK (Abb. 16) als Substrate war die spektrophotometrische Methode nicht ohne weiteres anwendbar. Die meisten dieser Verbindungen weisen selbst nennenswerte Absorption im relevanten Bereich auf (näheres dazu unter Abschnitt 2.6.1). Daher wurde zum Aufspüren potentieller Substrate sowie zur Identifikation der potentiell involvierten hADH eine HPLC-Methode angewandt.

Zytosolisches Protein (200 μ g), 1,25 mM NAD und 100 bzw. 200 μ M Substrat (gelöst in DMSO) wurden in 0,1 M Glycin/NaOH pH 10 für 20 min bei 37°C unter Schütteln incubiert. Danach erfolgte eine Hitzeinaktivierung der ADH-Aktivität (95 °C, 5 min). Unlösliche Komponenten wurden durch Zentrifugation (23000 \times g, 10 min, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde in HPLC-Probengefäße überführt und das während der Inkubation potentiell gebildete NADH wurde mittels HPLC bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer externen NADH-Eichreihe.

Fließmittel A:

20 mM KH_2PO_4

2 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat

pH 3,9

Fließmittel B:

Methanol

Die HPLC erfolgte unter isokratischen Bedingungen (80 % A, 20 % B) mit einer Flußrate von 0,7 ml/min und einer Fließmitteltemperatur von 40 °C. Die Detektion von NADH erfolgte im UV-Detektor bei 340 nm. Die ADH-Aktivität wurde berechnet in nmol gebildetes NADH pro min und mg eingesetztes Protein.

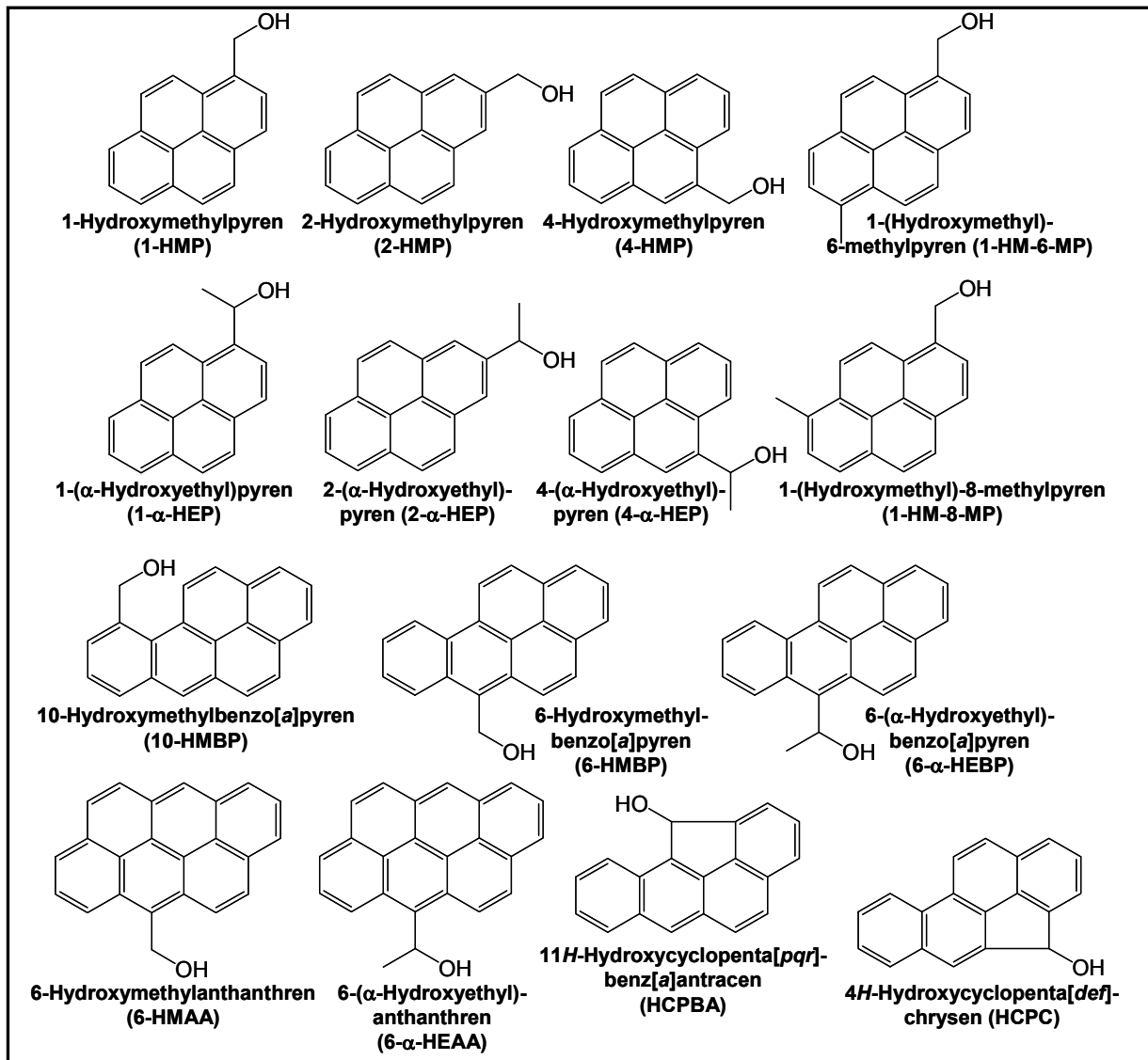


Abb. 16: Strukturformeln der als Substrate humaner Alkoholdehydrogenasen getesteten benzylichen Alkohole alkylierter polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe.

2.5 Expression von humaner ADH5a in Säugerzellen

Die Expression der hADH5-Spleißvarianten in Bakterien führte nicht zu enzymatisch aktivem Protein (Abschnitt 3.2.1). Daher wurde hADH5a in V79-Zellen des Chinesischen Hamsters exprimiert, in der Hoffnung, dass die Expression in einem Säugerzellensystem eher zu enzymatisch aktivem Protein führen würde.

2.5.1 Klonierung der hADH5a-cDNA in den Vektor pSI

Für die Expression in V79-Zellen wurde die ADH5a-cDNA in den pSI-Vektor kloniert. Dies erfolgte über die *Xho* I- und *Sma* I-Schnittstellen des Vektors (Abb. 17). Dazu wurde zunächst die ADH5a-cDNA mittels PCR unter Verwendung der Primer ADH5 *Xho*-F und ADH5a *Hind*-R (Anlagerungstemperatur 56,8 °C, Sequenzen siehe Tabelle 7) amplifiziert. Als Matrize dienten 2,5 µg des ADH5a-pKK-Konstrukts (Abschnitt 2.2.4). Der PCR-Ansatz setzte sich wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben zusammen, abgesehen davon, dass *Pfu* DNA Polymerase (besitzt Korrekturlesefunktion) verwendet wurde, sowie je 1,5 µl der Primer eingesetzt wurden. Die Amplifikation wurde analog zu dem in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Programm durchgeführt, jedoch mit einer Extensionszeit von 3 min. Durch den Vorwärtsprimer wurde bei dieser PCR eine *Xho* I-Schnittstelle vor der kodierenden Sequenz eingefügt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit *Hin* dIII verdaut und danach einer Behandlung mit dem Klenow-Fragment unterzogen, um den durch Verdau erzeugten 5'-Überhang aufzufüllen, so dass ein glattes Ende entsteht.

Restriktionsansatz: ca. 5 µg ADH5a-cDNA
5 µl 10× R⁺ Puffer
25 U *Hin* dIII
ad 50 µl H₂O
4 h, 37 °C, Inaktivierung durch PCR-Reinigung (Abschnitt 2.2.1.1)

„blunting“-Ansatz: Hin dIII-Verdau (30 μ l)
 5 μ l 10 \times Puffer für Klenow Fragment
 2,5 μ l dNTP-Mix (2 mM)
 20 U Klenow-Fragment
 ad 50 μ l H₂O
 20 min auf Eis, Inaktivierung durch PCR-Reinigung (Abschnitt 2.2.1.1)

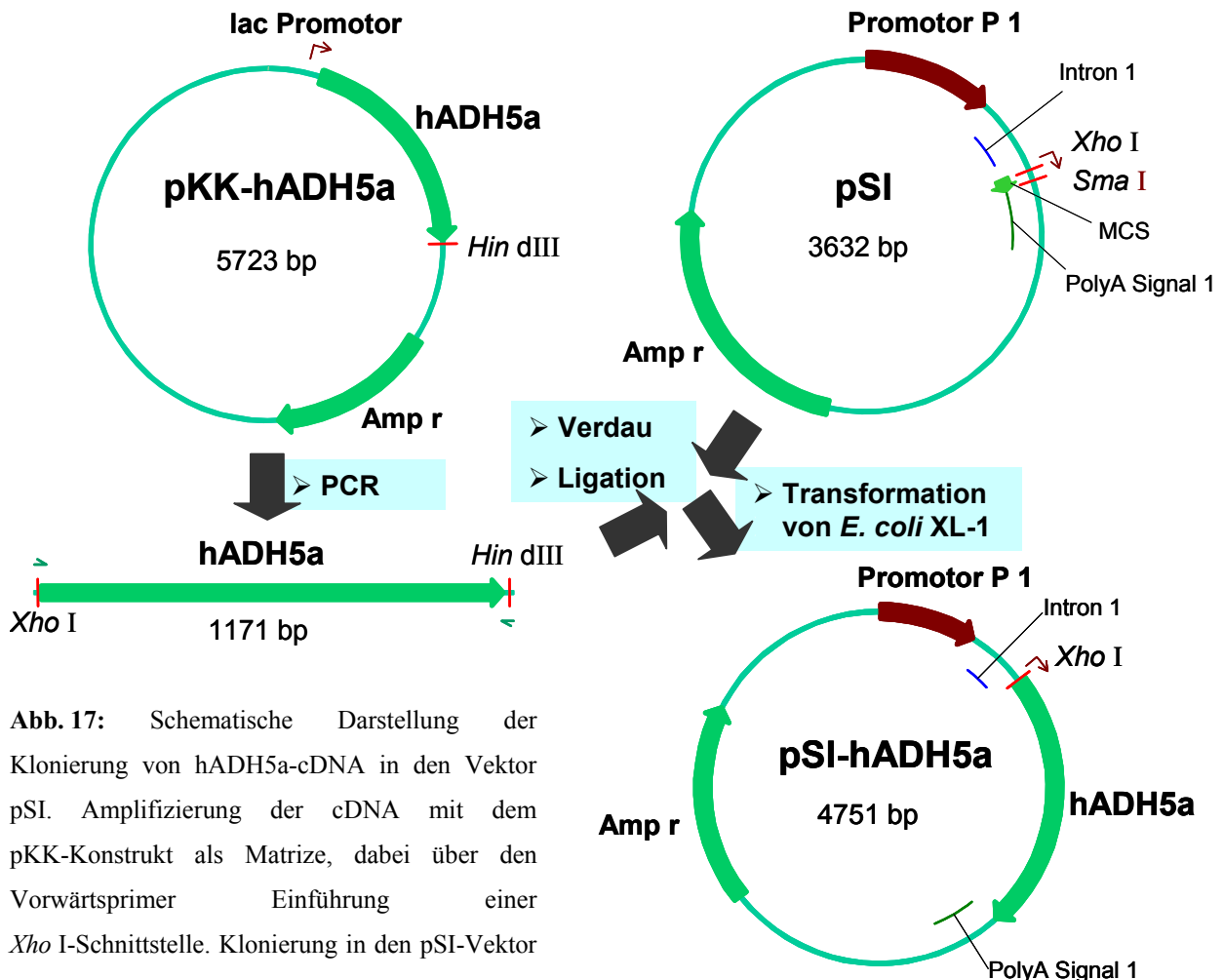


Abb. 17: Schematische Darstellung der Klonierung von hADH5a-cDNA in den Vektor pSI. Amplifizierung der cDNA mit dem pKK-Konstrukt als Matrize, dabei über den Vorwärtsprimer Einführung einer Xho I-Schnittstelle. Klonierung in den pSI-Vektor über die Xho I- und Sma I-Schnittstellen. Dazu vorher Hin dIII-Verdau der amplifizierten ADH5a-cDNA und Erzeugung eines glattes Endes durch Behandlung mit dem Klenow-Fragment. Amp^r, Ampicillinresistenzgen; MCS, „multiple cloning site“.

Der pSI-Vektor wurde mit Xho I und Sma I (erzeugt glatte DNA-Enden) verdaut und anschließend nach Agarosegelelektrophorese aus der Agarose extrahiert (Abschnitt 2.2.2).

Restriktionsansatz: 5 µg pSI
5 µl 10× Y⁺/Tango™ Puffer
25 U *Sma* I
ad 50 µl H₂O
4 h, 30 °C → + 9 µl 10× Y⁺/Tango™ Puffer
35 U *Xho* I
ad 70 µl H₂O
4 h, 37 °C

Anschließend wurden der so präparierte Vektor und die *Hin* dIII-verdaute, Klenow-behandelte ADH5a-cDNA nochmals mit *Xho* I verdaut.

Restriktionsansatz: ca. 5 µg ADH5a-cDNA
ca. 1 µg pSI
6 µl 10× R⁺ Puffer
30 U *Xho* I
ad 60 µl H₂O

Nach Inkubation von ca. 15 h bei 37 °C erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms (20 min, 80 °C). Wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben wurde danach die Ligation durchgeführt und mit dem Ligationsansatz kompetente *E. coli* XL-1 (Abschnitt 2.2.7) transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) LB-Agarplatten ausplattiert. Die erhaltenen Klone wurden durch Restriktionsanalyse (siehe Abschnitt 2.2.3.1) überprüft. Zusätzlich wurde die Plasmid-DNA zunächst eines positiven Klones zum Sequenzieren versandt. Die Sequenzierung erfolgte mit dem T7 EEV Promoter Primer sowie mit pSI seqR (Tabelle 7). Nach Verifizierung der Sequenz wurden von diesem Klon DMSO-Stocks angelegt (Abschnitt 2.2.6). Die Plasmid-DNA dieses Klons wurde für die Transfektion in V79-Zellen verwendet (Abschnitt 2.5.2). Da die Plasmid-DNA für die Transfektion Endotoxin-frei sein muß, wurde die Isolierung mit dem PhoenIX™ Filter Maxiprep Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.5.2 Transfektion von pSI-hADH5a in V79-Zellen und Klonanalyse

Benötigte Medien und Puffer:

Zellkulturmedium:

DMEM
5 % (v/v) FKS
1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

Selektionsmedium:

Zellkulturmedium
5 µg/ml Puromycin

PBS pH 7,4:

140 mM NaCl
2,7 mM KCl
5,4 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄

Kryolösung:

FKS
9 % (v/v) DMSO

Für die stabile Transfektion in V79-Zellen wurden zunächst je 4×10^5 Zellen in 5 ml Zellkulturmedium auf 6 cm Ø Kulturschalen eingesät und 24 h im Brutschrank kultiviert. Alle Zellkultivierungen liefen bei 37 °C, 97 % Luftfeuchte und 7 % CO₂ ab. Anschließend erfolgte die Kotransfektion der Plasmide pSI-hADH5a und pBSpacΔp in die V79-Zellen.

Die Transfektion wurde mit dem jetPEI™ Cationic Polymer Transfection Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (Abb. 18).

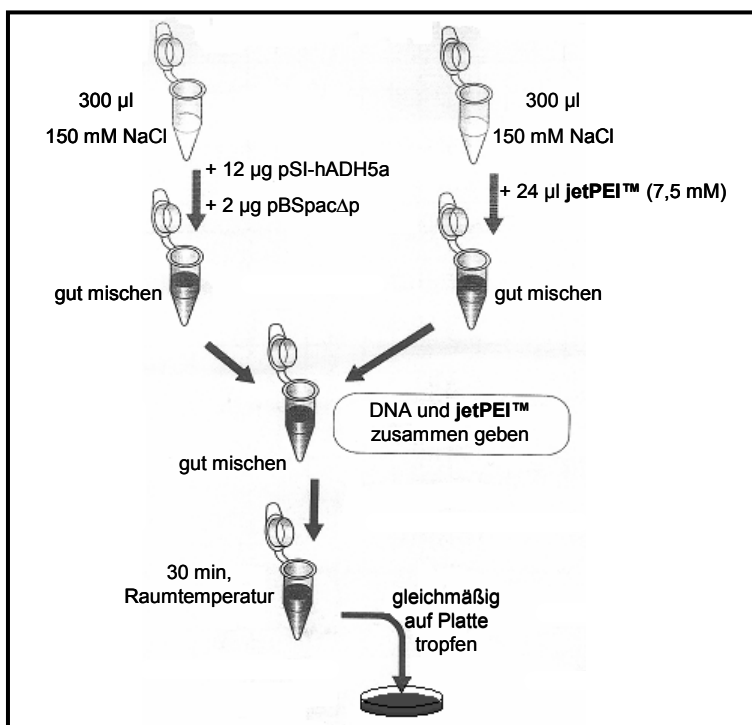


Abb. 18: Schematische Darstellung der Transfektion von pSI-hADH5a in V79-Zellen.

Die transfizierten Zellen wurden dann weitere 24 h im Brutschrank kultiviert. Danach wurde eine Aufteilung der Kultur nach folgendem Protokoll vorgenommen:

- Abgießen des Mediums
- Waschen mit 5 ml PBS
- Ablösen der Zellen durch Zugabe von 1 ml Trypsin und Inkubation von 5 min bei 37 °C
- Suspendieren in 10 ml Zellkulturmedium
- Aufteilen auf zehn 15 cm Ø Kulturplatten, Mediumvolumen 30 ml

Die Kulturen wurden erneut 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde von normalem Zellkulturmedium auf Selektionsmedium gewechselt.

Nach zwölf Tagen waren auf den Platten Klone mit einem Durchmesser von ca. 2 mm herangewachsen. Von diesen Klonen wurden insgesamt 54 geerntet. Dazu wurden die zu erntenden Klone zunächst auf der Plattenunterseite mit einem Stift eingekreist. Das Medium wurde abgegossen und die Platte mit 10 ml PBS gewaschen. Auf die markierten Klone wurden Klonierungsringe aus Stahl aufgesetzt. Diese wurden zuvor abgeflammt und anschließend, noch warm, auf steriles Silikonfett gesetzt. Überschüssiges Fett wurde durch Aufsetzen auf den Deckel der Kulturschale entfernt, bevor die Ringe auf die Klone aufgesetzt wurden. Anschließend wurden je 50 µl Trypsin in die Ringe gegeben und die Klone durch Inkubation für 5 min bei 37 °C abgelöst. Die abgelösten Zellklone wurden dann in je 100 µl Selektionsmedium suspendiert und in die Kultivierungsräume („wells“) einer Sechswellplatte überführt. Jedes „well“ wurde auf insgesamt 3 ml Selektionsmedium aufgefüllt.

Die Kultivierung der Klone erfolgte im Brutschrank bis zu einer Zelldichte von ca. 80-90 % (2-3 d). Danach wurden sie zum Anlegen von Kryokonserven und zur Analyse auf hADH5a-Expression geerntet. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 500 µl Trypsin abgelöst (5 min, 37 °C). Die Zellen wurden in 1 ml Kryolösung aufgenommen. Mit je 500 µl wurden Kryokonserven angelegt. Dazu wurden die 500 µl in Schraubdeckelgefäße (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) überführt, 2 h bei 4 °C, anschließend 3 d in einem dickwandigen Styroporbehälter (zwecks langsamer Temperaturabnahme) bei -80 °C inkubiert und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert. Die zweiten 500 µl der Zellsuspension wurden für 5 min mit 100 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 µl PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstands in 50 µl 1× SDS-Probenpuffer (Abschnitt 2.3.3) aufgenommen. Die so

behandelten Zellpellets wurden einer SDS-PAGE unterzogen (Abschnitt 2.3.3) und anschließend durch Western-Blotanalyse (Abschnitt 2.4.2) mit dem gegen hADH5a generierten Antiserum (Abschnitt 2.3.7) auf Expression von hADH5a untersucht. Positive Klone wurden durch Langzeitpassagieren auf die Stabilität der hADH5a-Expression untersucht (Abschnitt 2.5.4). Die Kryokonserven negativer Klone wurden dagegen direkt entsorgt.

2.5.3 Anlegen einer Stammkultur und Herstellung von V79-Zellzytosol

Zunächst wurden Stammkulturen aus den Kryokonserven (siehe Abschnitt 2.5.2) angelegt. Dazu wurden die Kryokonserven aus dem Stickstoffbehälter entnommen, im Brutschrank aufgetaut und schnell in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Zellkulturmedium (Abschnitt 2.5.2) überführt. Die Zellen wurden mit $100 \times g$ für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert und in eine 25 cm² Kulturflasche überführt. Nach 4 h Kultivierung im Brutschrank wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und anschließend bis zu einer Kulturdichte von ca. 80-90 % (2 d) weiter kultiviert. Die Ernte erfolgte analog der in Abschnitt 2.5.2 beschriebenen Methodik (Abgießen des Mediums, Waschen mit PBS, abtrypsinieren, Aufnahme in Medium). Das in diesem Fall verwendete Zellkulturmediumvolumen zum Suspendieren waren 10 ml. Mit dem Zellzählgerät wurde die Zellzahl bestimmt, dazu wurde eine 1:100-Verdünnung der Zellsuspension in Zellzähllösung (Casyton, Schärfe, Reutlingen, Deutschland) verwendet. Von jeder Kultur wurden zwei neue Kryokonserven angelegt. Dazu wurde ein Volumen der Zellsuspension entsprechend 1×10^6 Zellen abzentrifugiert ($100 \times g$, 5 min), das Pellet nach Verwerfen des Überstands in 1 ml Kryolösung (Abschnitt 2.5.2) aufgenommen und in ein Schraubdeckelgefäß überführt. Das weitere Vorgehen war analog dem in Abschnitt 2.5.2 beschriebenen Verfahren.

Darüber hinaus wurden von jeder Kultur 1×10^5 Zellen in eine 25 cm² Kulturflasche (5 ml Zellkulturmedium) für den Expressionstabilitätsversuch (Abschnitt 2.5.4) eingesät. Diese Kulturen wurden nach 3 d (Zelldichte 80-90 %) wie beschrieben geerntet und die Zellzahl bestimmt. Von jeder Zelllinie wurden nun je zweimal $1,5 \times 10^6$ Zellen in 15 cm Ø Kulturplatten (30 ml Zellkulturmedium) zur Herstellung von Zytosolen sowie erneut 1×10^5 Zellen in eine 25 cm² Kulturflasche (5 ml Zellkulturmedium) für die Fortführung des Expressionstabilitätsversuch (Abschnitt 2.5.4) eingesät. Die Kulturen zur Zytosolherstellung wurden 48 h im Brutschrank inkubiert und dann aufgearbeitet. Das Medium wurde verworfen,

die Platten mit je 10 ml PBS (Abschnitt 2.5.2) gewaschen und dann die Zellen abtrypsiniert. Nachfolgend wurden die Zellen in 10 ml PBS mit 10 % (v/v) FKS suspendiert und in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dabei wurden die Zellen einer Linie vereinigt. Durch Zentrifugation ($100 \times g$, 5 min) wurden die Zellen sedimentiert, der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis und mit gekühlten Puffern. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet nun in 200 μ l Tris/HCl (10 mM, 1 mM DTT, pH 8) aufgenommen und in 1,5 ml Ultrazentrifugationsgefäße (Beckman, Krefeld, Deutschland) überführt. Durch Sonifizieren (wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben) wurden die Zellen aufgeschlossen. Danach erfolgte durch Zentrifugation mit $100000 \times g$ für 1 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ die Sedimentation der mikrosomalen Fraktion. Der Überstand (Zytosol) wurde abgenommen und nach Entnahme von Aliquots zur Proteinbestimmung (Abschnitt 2.3.6) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.5.4 Stabilitätsüberprüfung einer Zelllinie durch Langzeitpassagieren

Durch Langzeitpassagieren über mehrere Wochen wurde untersucht, ob die Expression der hADH5a in den V79-hADH5a-Zelllinien stabil blieb (Abb. 19).

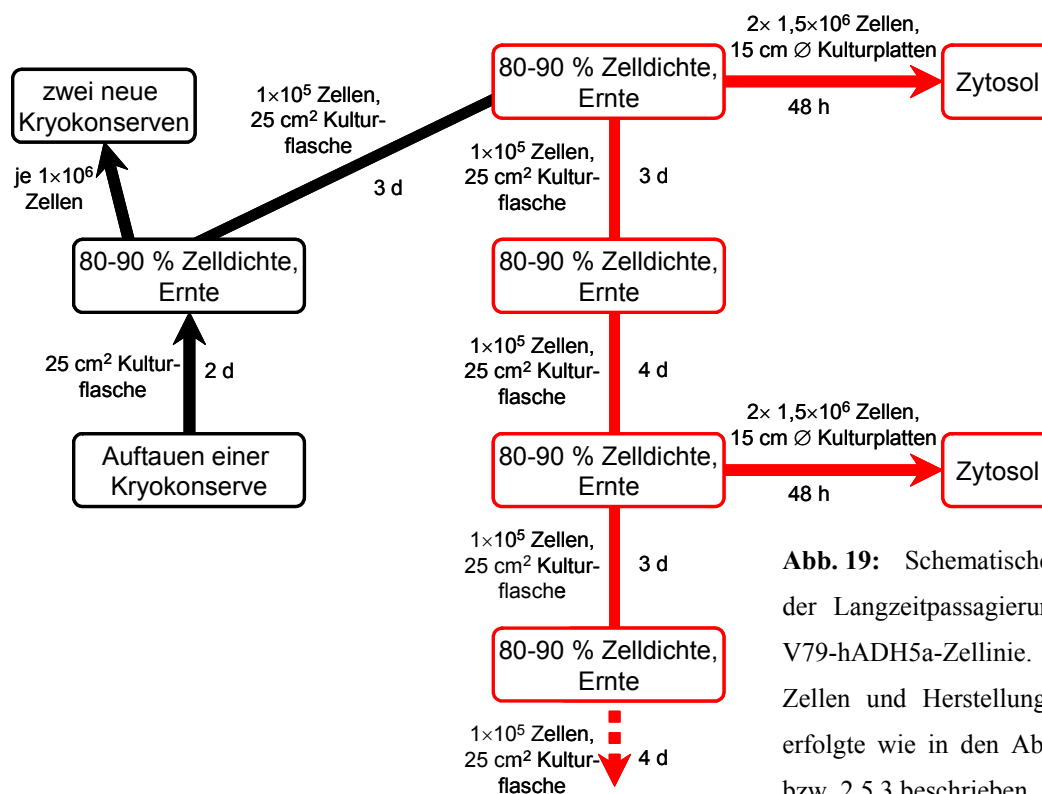


Abb. 19: Schematische Darstellung der Langzeitpassagierung (rot) einer V79-hADH5a-Zelllinie. Ernte der Zellen und Herstellung von Zytosol erfolgte wie in den Abschnitten 2.5.2 bzw. 2.5.3 beschrieben.

Die gewonnenen Zytosole der einzelnen Passagen wurden einer SDS-PAGE unterzogen (Abschnitt 2.3.3) und anschließend durch Western-Blotanalyse (Abschnitt 2.4.2) mit dem gegen hADH5a generierten Antiserum (Abschnitt 2.3.7) auf hADH5a-Expression untersucht. Die Kryokonserven von Zelllinien, die sich als nicht stabil erwiesen, wurden entsorgt.

Analog zur in Abschnitt 2.4.3 beschriebenen Methodik wurde der prozentuale Anteil des exprimierten hADH5a-Proteins am zytosolischen Gesamtprotein der transformierten Zelllinie bestimmt. Zudem wurde das Zytosol als Enzymquelle für ADH-Aktivitätsmessungen mit Standardsubstraten (Abschnitt 2.4.4) verwendet.

2.6 Partielle Reinigung von hADH1C, 2, 3 und 4

Wie sich zeigte, besitzen die Bakterien eine nennenswerte endogene ADH-Aktivität (Abschnitt 3.2.1). Für detaillierte kinetische Untersuchungen war daher eine Trennung des exprimierten hADH-Proteins von der Bakterien-ADH notwendig. Aufgrund der Ergebnisse von Aktivitätsmessungen mit alk-PAK-Alkoholen (Abschnitt 3.5) sowie HMF und HMFA (Abschnitt 3.6) als Substrate unter Verwendung von *Salmonella*-Zytosolen als Enzymquelle wurden die hADH1C, 2, 3 und 4 als zu reinigende Enzyme ausgewählt.

Es wurde sich für die Anionenaustauschchromatographie als Methode der Wahl entschieden. Unter den gewählten Bedingungen binden alle zu reinigenden hADH nicht oder nur zu einem geringen Teil an das entsprechende Säulenmaterial und eluieren somit bereits im Durchfluss (Marschall *et al.*, 2000; Moreno & Parés, 1991; Sanghani *et al.*, 2000; Strömberg *et al.*, 2002). Die bakterielle ADH hingegen bindet vollständig an das Säulenmaterial und eluiert erst bei hohen Salzkonzentrationen, so dass eine vollständige Separierung gut möglich ist (Höög *et al.*, 1987). Zudem ist der Reinheitsgrad auf dieser Weise gereinigter in Bakterien exprimierter Säugetier-ADH bereits sehr hoch (z.T. > 90 %) (Höög *et al.*, 1987; Strömberg *et al.*, 2002; Svensson *et al.*, 1998), so dass weitere Reinigungsschritte nicht zwingend erforderlich sind.

Fließmittel A:

10 mM Tris/HCl, pH 8

Fließmittel B:

10 mM Tris/HCl, pH 8

0,5 bzw. 1 M NaCl

Für die Reinigung wurde eine adäquate Menge Zytosol hADH-transformierter Bakterien (*S. typhimurium* TA100) hergestellt (Abschnitt 2.4.1). Dieses Zytosol wurde durch

Anionenaustauschchromatographie unter Nutzung der FPLC-Anlage fraktioniert. Als Säulenmaterial diente entweder High Q (10 ml, Proteinbeladung bis ca. 20 mg) oder Macro-Prep[®] Ion Exchange Media DEAE (50 ml, Proteinbeladung bis ca. 50 mg). Die Trennung wurde mit 4 °C kalten Puffern durchgeführt, die Temperatur der Säule war ebenfalls 4 °C und die gesammelten Fraktionen standen auf Eis. Die Chromatographie erfolgte zunächst mit Fließmittel A und einer Flußrate von 1 ml/min. Die Trennung wurde auf dem Monitor des an die Anlage angeschlossenen Computers verfolgt (Anzeige der Absorption bei 280 nm). Entsprechend wurde nach Durchfluss des Totvolumens mit dem Sammeln der Fraktionen begonnen (siehe dazu Abschnitt 3.4, Abb. 32). Nach Elution des nicht an die Säule gebundenen Proteins wurde auf Fließmittel B umgestellt und die Chromatographie fortgesetzt bis das gesamte Protein eluiert war.

Mittels Amicon[®] Ultra-15 Zentrifugeneinheiten, 30 kDA MWCO (Millipore, Schwalbach, Deutschland) wurden die Fraktion auf ca. 200-500 µl konzentriert (die Salz-eluierte Fraktion jeweils auf das eingesetzte Zytosolvolumen). Aliquots zur Proteinbestimmung (Abschnitt 2.3.6) wurden entnommen, sowie je 2× 5 µl für die Aktivitätsbestimmung und die SDS-PAGE-Analyse. Die Fraktionen, von denen erwartet wurde, dass sie die hADH enthielten wurden à 100 µl aliquotiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie unter Abschnitt 2.4.4 beschrieben mit 33 mM Ethanol bzw. 1 mM 1-Octanol (ADH3) als Substrat mit 5 µl je Fraktion als Enzymquelle. Die anderen 5 µl je Fraktion wurden mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.3.3) und anschließender Coomassie-Färbung (Abschnitt 2.3.4) analysiert.

Zur Kontrolle wurde zudem Zytosol nichttransformierter *S. typhimurium* TA100 analog fraktioniert und auf die gleiche Art und Weise analysiert.

Von hADH-haltigen Fraktionen wurde schließlich noch der prozentuale Anteil von hADH-Protein am Gesamtprotein der Fraktion bestimmt (analog zu Abschnitt 2.4.3). Die entsprechenden Fraktionen wurden für enzymkinetische Analysen insbesondere mit Pyrenylmethanolen, Pyrenaldehyden, HMF und HMFA als Substrate verwendet (Abschnitt 2.7).

2.7 Enzymkinetische Analysen mit den partiell gereinigten hADH

Die partiell gereinigten hADH1C, 2, 3 und 4 (Abschnitt 2.6) wurden für enzymkinetische Analysen verwendet. Als Substrate wurden die Pyrenylmethanole 1-, 2-, 4-HMP, 1-HM-6-MP und 1-HM-8-MP (siehe Abb. 16, Abschnitt 2.4.4.1) sowie ihre korrespondierenden Aldehyde 1-, 2-, 4-Formylpyren, 1-Formyl-6-methylpyren und 1-Formyl-8-methylpyren (1-, 2-, 4-FP, 1-F-6-MP und 1-F-8-MP) verwendet. Außerdem wurden HMF und HMFA als ADH-Substrate analysiert. Zu Vergleichszwecken wurden darüber hinaus noch kinetische Analysen mit den Standardsubstraten Ethanol und Acetaldehyd bzw. 1-Octanol und Octanal (hADH3) durchgeführt.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter (K_m und V_{max}) wurden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (Michaelis & Menten, 1913). Die erhaltenen Datenpaare wurden zur Berechnung der kinetischen Parameter mittels nichtlinearer Regression (SigmaPlot 8.0, Systat Software, Erkrath, Deutschland) an die Michaelis-Menten-Gleichung $v = V_{max}/(K_m + [S])$ angepasst.

Die Oxidationsreaktionen erfolgten in 0,1 M Glycin/NaOH pH 10 mit 2,5 bzw. 1,25 mM NAD als Kosubstrat, die Reduktionsreaktionen in 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,5 mit 0,5 bzw. 0,25 mM NADH als Kosubstrat. Alle Reaktionen wurden bei Raumtemperatur (ca. 25 °C) durchgeführt. Die Pyrenderivate sowie Octanal waren in DMSO gelöst, die anderen Substrate im jeweiligen Reaktionspuffer. Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde spektrophotometrisch durchgeführt. Für die Standardsubstrate, HMF und HMFA geschah dies analog zu Abschnitt 2.4.4 unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von NADH bei 340 nm ($\epsilon_{340} \text{ NADH} = 6200 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

Die Pyrenderivate jedoch zeigen Absorption im relevanten Messbereich, insbesondere besitzen die Pyrenylmethanole eine starke Absorption bei 340 nm, die eine Dokumentation der Reaktion bei dieser Wellenlänge erschwert bzw. unmöglich macht (Abb. 20). Eine Dokumentation des Reaktionsablaufes war für 1-, und 4-HMP (sowie die korrespondierenden Aldehyde) jedoch bei 360 nm und für 1-HM-6-MP und 1-HM-8-MP (und die entsprechenden Aldehyde) bei 370 nm möglich. Messungen mit 2-HMP als Substrat konnten bei 340 nm durchgeführt werden. Messungen mit 2-FP als Substrat dagegen erfolgten bei 360 nm, da 2-FP im Reaktionspuffer für die Reduktion eine geringere Absorption bei 340 nm aufwies als im Reaktionspuffer für die Oxidation. Die beobachtete Absorptionsänderung bei den jeweiligen Wellenlängen setzt sich jeweils zusammen aus der Bildung bzw. Verbrauch von NADH, der Bildung bzw. Abbau des Aldehyds und dem Abbau bzw. Bildung des Alkohols zusammen.

Eine Verwendung der entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten von NADH zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit war somit nicht möglich, vielmehr musste für jede Reaktion der entsprechende Extinktionskoeffizient bestimmt werden.

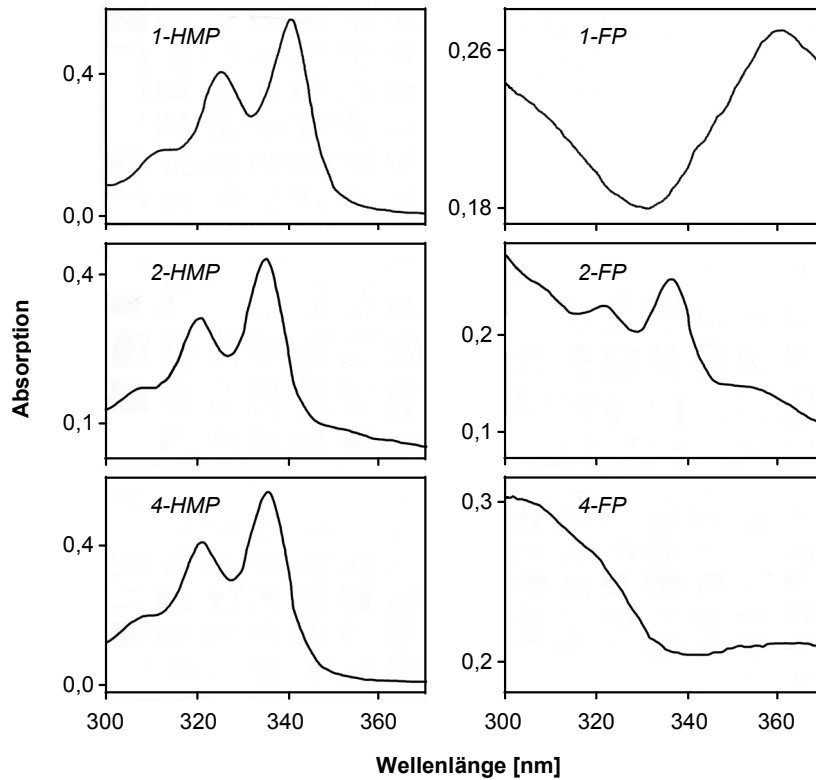


Abb. 20: Absorptionsspektren der Pyrenylmethanole 1-, 2- und 4-HMP sowie ihrer korrespondierenden Aldehyde (je 20 μM) in 0,1 M Glycin/NaOH pH 10.

Dazu wurden die molaren Extinktionskoeffizienten der Pyrenylmethanole und Pyrenaldehyde bestimmt. Für die zu analysierenden Reaktionen wurden die resultierenden Extinktionskoeffizienten dann wie folgt berechnet: $\epsilon = \epsilon \text{ NADH} + \epsilon \text{ Pyrenaldehyd} - \epsilon \text{ Pyrenylmethanol}$ (Tabelle 8). Dies geschah in der selben Weise auch für die Analysen mit ADH2 unter Zusatz von BSA.

Tabelle 8: Bestimmung der ADH-Aktivität mit Pyrenderivaten als Substrate. Die Absorptionsänderung wurde bei der angegebenen Wellenlänge gemessen und die Reaktionsgeschwindigkeit wurde mit den ϵ -Werten, resultierend aus der Summe ϵ NADH + ϵ Pyrenaldehyd – ϵ Pyrenylmethanol, berechnet.

Substrat	Wellenlänge [nm]	ohne BSA				mit 0,33 % (w/v) BSA			
		ϵ NADH [M ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ Aldehyd [M ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ Alkohol [M ⁻¹ cm ⁻¹]	resultierendes ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ NADH [M ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ Aldehyd [M ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ Alkohol [M ⁻¹ cm ⁻¹]	resultierender ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
1-HMP/1-FP	360	3.700	13.500	1.100	16.100	3.700	28.500	1.100	31.100
2-HMP	340	6.200	11.300	12.000	5.500	6.200	34.870	29.420	11.650
^a 2-FP	360	3.700	5.900	400	9.200	3.700	230	130	3.800
4-HMP/4-FP	360	3.700	9.800	1.000	12.500	3.700	12.600	100	16.200
1-HM-6-MP/ 1-F-6-MP	370	2.300	12.600	4.800	10.100	2.300	28.800	900	30.200
1-HM-8-MP/ 1-F-8-MP	370	2.300	9.200	1.300	10.200	2.300	24.000	1.200	25.100

^a 2-FP zeigte in Natriumphosphatpuffer eine deutlich geringere Absorption bei 340 nm als in Glycin/NaOH, deshalb mussten andere Bedingungen gewählt werden.

2.7.1 Untersuchung des Einflusses von Modulatoren (Lösungsmittel [DMSO], BSA und ADH-Inhibitoren)

Die starke Hydrophobie der als Substrat zu testenden Pyrenderivate stellte insofern ein Problem dar, als dass DMSO als Lösungsvermittler verwendet werden musste. DMSO ist jedoch ein bekannter ADH-Inhibitor (Cho & Plapp, 1998; Sharkawi, 1979). Potenz und Art der Inhibition von DMSO wurden daher für jedes zu untersuchende Enzym für die Katalyse der Oxidation sowie der Reduktion untersucht. Dazu wurde die Aktivität der hADH gegenüber drei fixen Standardsubstratkonzentrationen (Ethanol und Acetaldehyd, bzw. 1-Octanol und Octanal) in Gegenwart von mindestens vier verschiedenen DMSO-Konzentrationen bestimmt. Die Bedingungen waren ansonsten analog zu den in Abschnitt 2.7 beschriebenen und die Bestimmung der Aktivität geschah wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben. Zur Feststellung der Art des inhibitorischen Effekts wurden die Daten durch doppelt reziproke Auftragung ($1/v$ gegen $1/[S]$) (Lineweaver & Burk, 1934) analysiert (Abb. 21a).

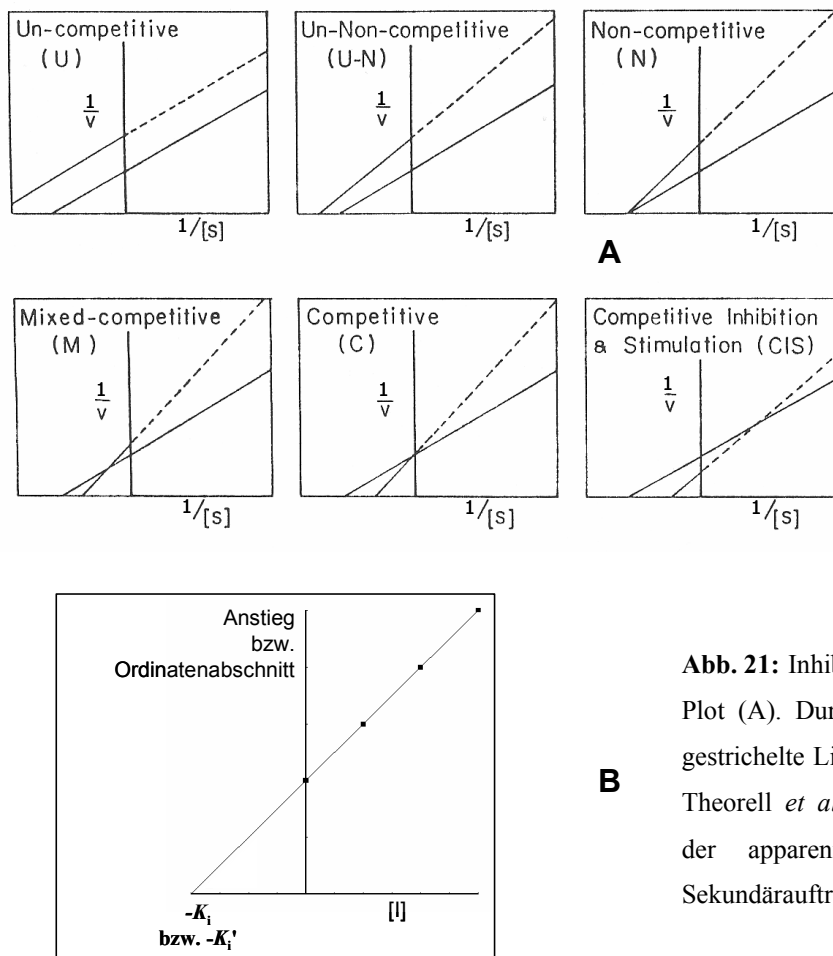


Abb. 21: Inhibitionsarten im Lineweaver-Burk-Plot (A). Durchgehende Linie ohne Inhibitor, gestrichelte Linie mit Inhibitor. Darstellung aus Theorell *et al.* (1969). Graphische Ermittlung der apparenten Inhibitorkonstanten durch Sekundärauftragung (B).

Die apparenten Inhibitorkonstanten (K_i und/oder K_i') als Maß für die inhibitorische Potenz wurden aus den Sekundärauftragungen Steigung gegen DMSO-Konzentration (K_i) und Ordinatenabschnitt gegen DMSO-Konzentration (K_i') ermittelt (Abb. 21b).

Eine Möglichkeit, die Löslichkeit der Testsubstanzen zu erhöhen (und die DMSO-Konzentration zu senken), war der Zusatz von BSA. Mit hADH2 wurden daher die kinetischen Analysen (Abschnitt 2.7) zusätzlich mit einem BSA-Zusatz von 0,33 % (w/v) (49,25 μ M) durchgeführt. Die DMSO-Konzentration konnte in diesem Fall auf 0,33 % (v/v) gesenkt werden. Unerwartete Ergebnisse hinsichtlich der hADH2-katalysierten Reduktion der Pyrenaldehyd machten eine genauere Untersuchung des BSA-Einflusses auf die Reduktion durch hADH2 nötig. Dies geschah mit dem Standardsubstrat Acetaldehyd analog zu der oben beschriebenen Analyse des DMSO-Einflusses.

Desweiteren wurde die Inhibition der hADH-katalysierten Oxidation der Pyrenylmethanole durch die als ADH-Inhibitoren bekannten Verbindungen 4-Methylpyrazol (Li & Theorell, 1969; Theorell *et al.*, 1969), Daidzein (Keung, 1993) und Cimetidin (Stone *et al.*, 1995) untersucht. 4-Methylpyrazol und Cimetidin wurden im Reaktionspuffer für die Oxidation (Abschnitt 2.7) und Daidzein in DMSO gelöst. Zur Ermittlung der apparenten K_i -Werte wurden die Daten mit der graphischen Methode nach Dixon (1953) analysiert (Abb. 22).

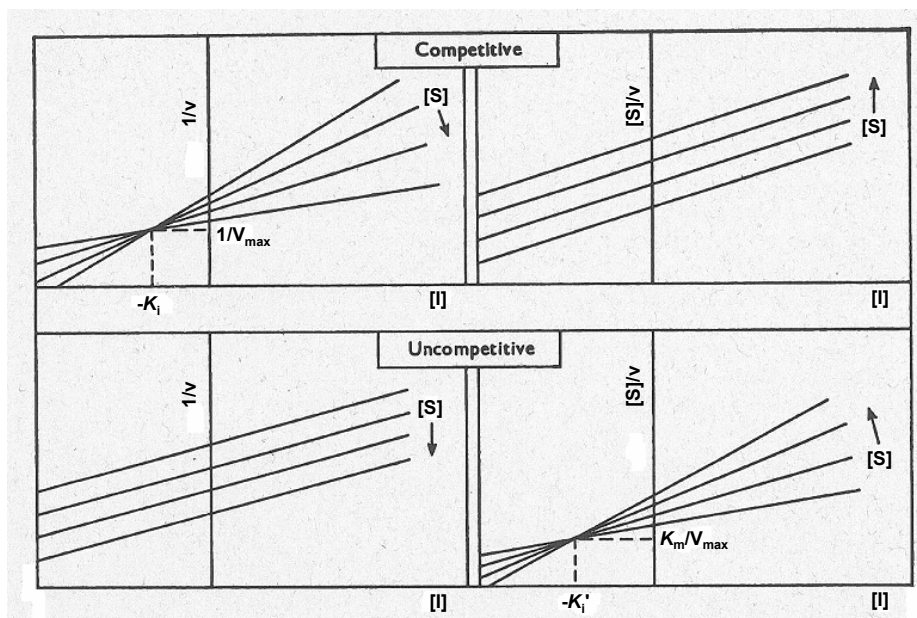


Abb. 22: Kompetitive und unkompetitive Inhibition in den graphischen Darstellungen nach Dixon (links) und

Cornish-Bowden (rechts). Die apparenten Inhibitorkonstanten K_i und K_i' können aus der jeweils geeigneten Darstellung, wie zu sehen, leicht ermittelt werden. Abbildung entnommen aus Cornish-Bowden (1974).

Darüber hinaus wurde die als SULT-Inhibitor bekannte Verbindung Pentachlorphenol (Meerman *et al.*, 1983) auf ihr Potential als ADH-Inhibitor untersucht. Unerwartete Ergebnisse eines Tiersuchs mit Ratten zum Metabolismus von 1-HMP (Batke,

unveröffentlichte Daten) legten nahe, dass Pentachlorphenol ein potenter ADH-Inhibitor sein könnte. Pentachlorphenol wurde im Reaktionspuffer für die Oxidation gelöst und sein Einfluss auf die hADH-Aktivität gegenüber den Standardsubstraten Ethanol bzw. 1-Octanol wurde analysiert. Die apparenten K_i - bzw. K_i' -Werte wurden mit den graphischen Methoden nach Dixon (1953) bzw. Cornish-Bowden (1974) ermittelt (Abb. 22).

2.7.1.1 Untersuchung des Einflusses von Ethanol auf die hADH2-katalysierte Oxidation von Pyrenylmethanolen

Die zu erwartene inhibitorische Wirkung von Ethanol auf Oxidation von Pyrenylalkoholen durch hADH wurde für die hADH2 mit den Substraten 1-HMP und 1-HM-8-MP untersucht und charakterisiert.

Dazu wurde die hADH2-Aktivität bei drei festen Substratkonzentrationen in Abwesenheit und in Gegenwart von vier verschiedenen Ethanolkonzentrationen (10, 30, 60 und 100 μ M) bestimmt. Dazu wurden Substrat, Enzym, mit und ohne Ethanol und mit 1,25 mM NAD in 0,1 M Glycin/NaOH pH 10 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Reaktionsansätze mit 1-HMP als Substrat enthielten 6 % (v/v) und die Ansätze mit 1-HM-8-MP als Substrat 10 % (v/v) DMSO. Die Inkubationszeit war 5 min für 1-HMP und 10 min für 1-HM-8-MP als Substrat. Alle Inkubationen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Inaktivierung der ADH erfolgte eine Inkubation von 5 min bei 95 °C. Unlösliche Komponenten wurden durch Zentrifugation ($23000 \times g$, 10 min, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde in HPLC-Probengefäße überführt und der während der Inkubation gebildete Pyrenaldehyd (1-FP bzw. 1-F-8-MP) mittels HPLC bestimmt.

Fließmittel A:

phosphorsaures H₂O,
pH 2,3

Fließmittel B:

Acetonitril

Fließmittel C:

Methanol

Die HPLC wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min, einer Säulentemperatur von 25 °C und dem in Abb. 23 dargestellten Gradienten der Fließmittel B und C in Fließmittel A durchgeführt. Die Pyrenaldehyde wurden im Fluoreszenzdetektor bestimmt mit einer Anregungswellenlänge von 396 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Die Quantifizierung geschah mit Hilfe einer Eichreihe externer Standards und die

hADH2-Aktivität wurde in nmol gebildeter Pyrenaldehyd pro min und mg eingesetztes hADH2-Protein berechnet.

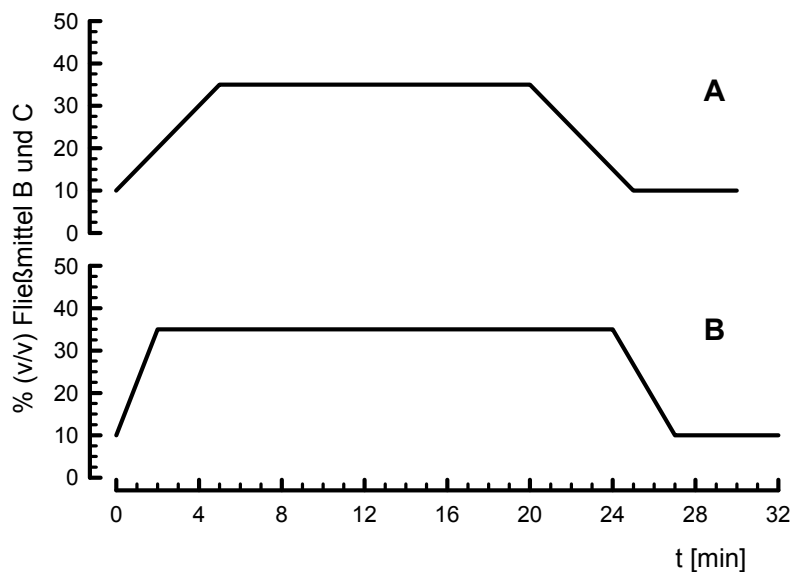


Abb. 23: Gradientenprofil der zur Detektion von 1-FP (A) und 1-F-8-MP (B) verwendeten HPLC-Methoden. Zu den Fließmitteln und weiteren HPLC-Bedingungen siehe obiger Text.

Die Analyse der inhibitorischen Wirkung von Ethanol auf die Oxidation der Pyrenylmethanole erfolgte mit den graphischen Methode nach Dixon (1953) und nach Cornish-Bowden (1974).

2.8 Expression der humanen ALDH2 und 3A1 in Bakterien für enzymkinetische Analysen mit Pyrenderivaten und HMF als Substrate

Die humanen ALDH2 und 3A1 wurden in *E. coli* und *S. typhimurium* exprimiert und die erzeugten Stämme charakterisiert (Rost, 2007). Die Methodik ist in der zitierten Diplomarbeit detailliert beschrieben.

2.8.1 Enzymkinetische Analysen

Mit den Pyrenaldehyden (1-, 2-, 4-FP, 1-F-6-MP und 1-F-8-MP) und HMF als Substrate für hALDH2 und 3A1 wurden enzymkinetische Analysen durchgeführt. Zu Vergleichszwecken geschahen diese Analysen auch mit einigen ausgewählten Standard-ALDH-Substraten (Acetaldehyd, Formaldehyd, Propionaldehyd und Benzaldehyd). Als Enzymquelle dienten zytosolische Präparationen hALDH-transformierter *S. typhimurium* TA100 bzw. partiell aufgereinigte hALDH2 (Rost, 2007). Zur Berechnung der Aktivität bezogen auf

hALDH-Protein war der prozentuale Anteil von ALDH-Protein am zytosolischen Gesamtprotein bzw. dem Gesamtprotein der hALDH2-haltigen Fraktion aus der Aufreinigung bestimmt wurden (analog zu Abschnitt 2.4.3).

Die kinetischen Analysen erfolgten vom Prinzip analog zu Abschnitt 2.7. Die Reaktionen wurden mit Enzym, Substrat und 0,6 mM NAD in 0,1 M Natriumpyrophosphatpuffer (pH 9,5 für ALDH2, pH 8,5 für ALDH3A1) durchgeführt. Die Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten geschah spektrophotometrisch bei 340 nm analog zu Abschnitt 2.4.4. Zur Berechnung der Aktivität wurde für die Standardsubstrate und HMF der molare Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm ($\epsilon_{340} \text{ NADH} = 6200 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) verwendet. Bei der Verwendung der Pyrenaldehyde als Substrate musste der molare Extinktionskoeffizient für die jeweilige Reaktion korrigiert werden, da sich in diesem Fall die Absorptionsänderung bei 340 nm zusammensetzt aus der Bildung von NADH, der Bildung der Pyrenylcarbonsäure sowie dem Abbau des Pyrenaldehyds (Rost, 2007) (Tabelle 9).

Tabelle 9: Bestimmung der ALDH-Aktivität mit Pyrenaldehyden als Substrate. Die Absorptionsänderung bei 340 nm wurde gemessen und die Reaktionsgeschwindigkeit wurde mit den ϵ -Werten, resultierend aus der Summe $\epsilon \text{ NADH} + \epsilon \text{ Pyrenylcarbonsäure} - \epsilon \text{ Pyrenaldehyd}$, berechnet.

Substrat	$\epsilon_{340} \text{ NADH} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$	$\epsilon_{340} \text{ Carbonsäure} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$	$\epsilon_{340} \text{ Aldehyd} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$	resultierender $\epsilon_{340} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$
1-FP	6.200	33.200	10.200	29.200
2-FP	6.200	21.600	11.300	16.500
4-FP	6.200	23.700	8.900	21.000
1-F-6-MP	6.200	13.500	6.300	13.400
1-F-8-MP	6.200	6.900	6.400	6.700

entnommen aus (Rost, 2007).

3. Ergebnisse

3.1 Generierung von Antiseren gegen humane ADH

Zur Bestimmung des Expressionsniveaus der exprimierten ADH (Abschnitt 2.4.3) wurden Antiseren gegen ein Enzym jeder ADH-Subfamilie (1A, 2, 3, 4 und 5a) generiert (Abschnitt 2.3.7). Aufgrund der hohen Aminosäuresequenzidentität (60-70 %) auch zwischen den Enzymen der Subfamilien (Edenberg & Bosron, 1997) war mit Kreuzreaktivität der erzeugten Antiseren zu rechnen. In der Tat weisen alle Antiseren mehr oder weniger starke Kreuzreaktivitäten auf (Abb. 24).

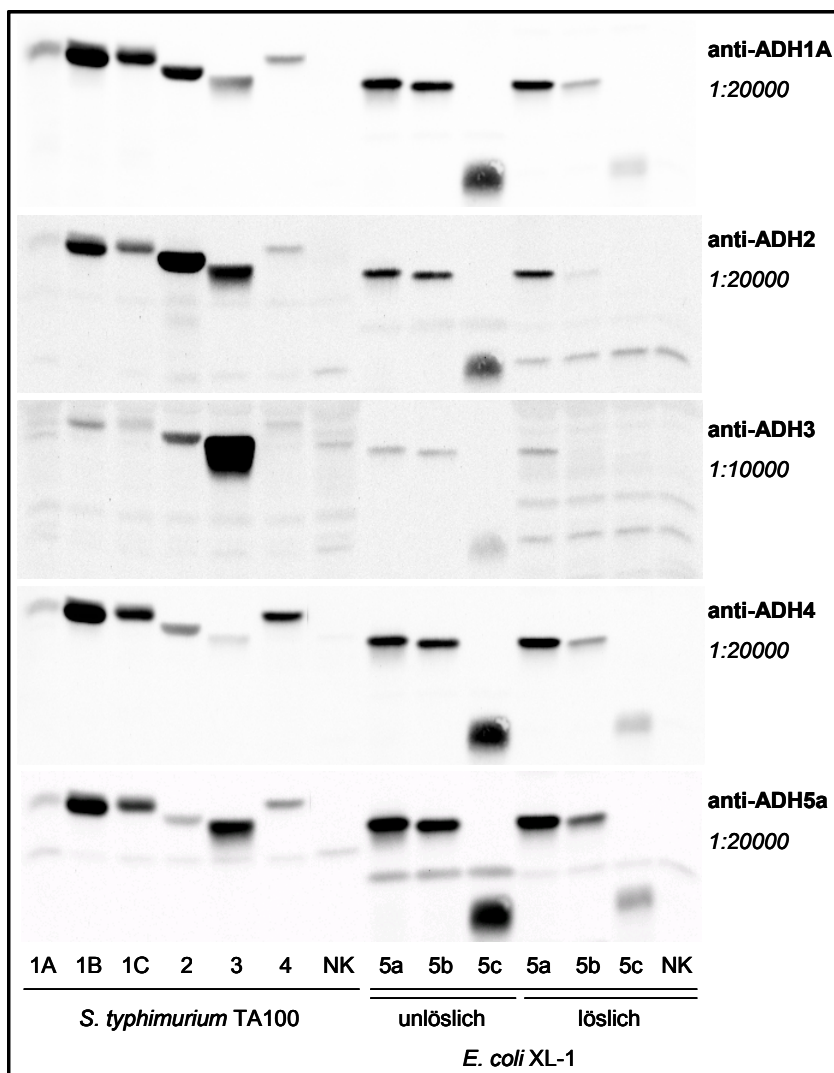


Abb. 24: Western-Blot eines 10 %igen SDS-PA-Gels zum Nachweis der exprimierten humanen ADH. Aufgetragen wurden *S. typhimurium*-Zytoplasten (40 µg bzw. NK 100 µg Protein), *E. coli*-Zytoplasten (100 µg Protein) sowie die unlöslichen Fraktionen ADH5-exprimierender *E. coli* (3 µg Protein). NK steht für Negativkontrolle.

Am wenigsten Kreuzreaktivität mit den anderen ADH weist das gegen die ADH3 generierte Antiserum auf. Auch das gegen die ADH2 generierte Antiserum besitzt relativ geringe Kreuzreaktivität mit den anderen ADH. Die relativen Kreuzreaktivitäten der einzelnen Antiseren mit den verschiedenen ADH-Proteinen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Immunreaktivität (Kreuzreaktivität) der gegen die humanen ADH generierten Antiseren.

Antiserum	Immunreaktivität ^a						
	ADH1A	ADH1B	ADH1C	ADH2	ADH3	ADH4	ADH5a-c
anti-ADH1A	++++	++++	++++	+++	+	+	+++
anti-ADH2	+	+	+	++++	++	(+)	+
anti-ADH3	(+)	(+)	(+)	+	++++	0	(+)
anti-ADH4	+++	++++	+++	+	0	++++	+++
anti-ADH5a	++	+++	++	(+)	++	+	++++

^a 0 (vernachlässigbar) bis ++++ (sehr stark). Ungefähr 30 ng ADH-Protein (siehe dazu Abschnitt 3.2) erzeugen ein starkes Signal mit dem entsprechenden ADH-Antiserum. Diese Immunreaktivität entspricht der Angabe „++++“. Die Differenz von einem „+“ entspricht in etwa einem 2-3 fachen Unterschied in der Immunreaktivität. Die Zellen mit den Antigen-Antikörper-Kombinationen, bei denen eine sehr starke Immunreaktivität erwartet wurde, sind grau hinterlegt.

Die unerwünschten Kreuzreaktivitäten der Antiseren können durch eine Präinkubation des Antiserums mit Protein der ADH, die nicht erkannt werden sollen (Abschnitt 2.4.2.2.1), deutlich reduziert werden (Abb. 25). Allerdings führt diese Prozedur auch zu einer Reduzierung der Sensitivität des Antiserums gegenüber dem Zielprotein.

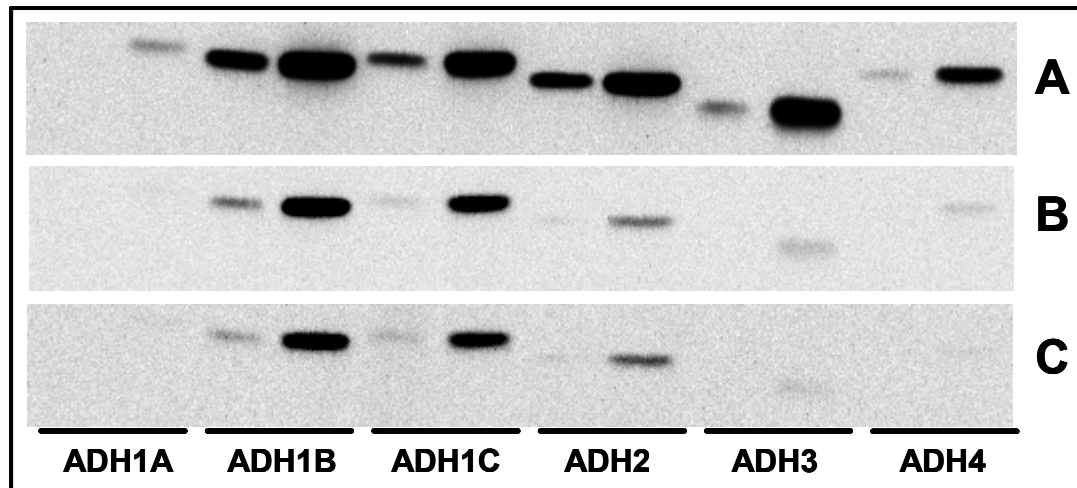


Abb. 25: Reduktion der Kreuzreaktivität des Antiserum gegen ADH1A. Western-Blot eines 10 %igen SDS-PA-Gels behandelt mit anti-ADH1A (1:20000), A: ohne Vorbehandlung, B: präinkubiert mit je 10 mg zytosolischem Protein ADH2, 3 und 4 exprimierender *S. typhimurium*, C: präinkubiert mit je 0,1 mg Protein von ADH2, 3 und 4 „inclusion bodies“ (Abschnitt 2.3.5). Aufgetragen wurden jeweils 2 und 10 µg zytolisches Protein ADH-exprimierender *S. typhimurium*.

3.1.1 Nutzung der Antiseren zur ADH-Detektion in humanen Organproben

Außer durch die mehr oder weniger starke Kreuzreaktivität der einzelnen Antiseren wird die Detektion individueller ADH-Proteine in humanen Organproben auch durch die ähnliche elektrophoretische Mobilität der einzelnen ADH bei der SDS-PAGE erschwert (Abb. 24 und 25). Die ADH1-Enzyme und ADH4 zeigen ein fast identisches Laufverhalten. In der Leber ist die zwar tiefer laufende ADH2 von den ADH1-Enzymen ebenfalls nur schwer zu differenzieren (Abb. 26 und 27), da die Expression dieser Enzyme in der Leber sehr hoch ist. Lediglich ADH3 und ADH5 sind aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität und aufgrund der geringen gegenseitigen Kreuzreaktivität klar zu detektieren (Abb. 26 und 27). Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass ADH5-Protein in der Leber relativ stark exprimiert wird (Abb. 26 und 27). Da sich die Spleiß-Varianten ADH5a und 5b in ihrer elektrophoretischen Mobilität bei der SDS-PAGE nur geringfügig unterscheiden, war eine eindeutige Aussage, ob es sich bei dem exprimierten Protein um ADH5a oder 5b handelt, kaum möglich. Einige Experimente legten jedoch nahe, dass es sich bei der ADH5-Form in der humanen Leber eher um ADH5a handelt als um ADH5b (Abb. 27, rechte Seite).

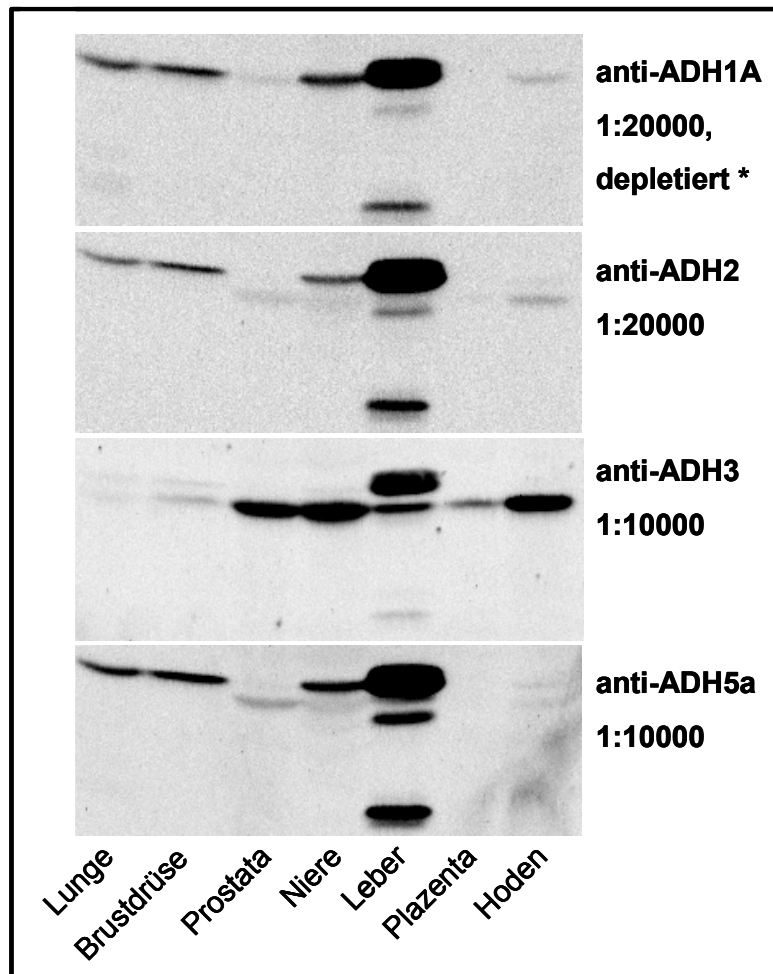


Abb. 26: Expression von ADHs in humanen Geweben. Western Blot eines 11 %igen SDS-PA-Gels inkubiert mit ADH-Antiseren, * anti-ADH1A depletiert gegen Kreuzreaktivität (Abschnitt 2.4.2.2.1). Aufgetragen sind von der Leber 40 μ g, von allen anderen Organen 300 μ g zytosolisches Protein. In allen Proben, außer der Plazenta, ist ein nicht näher zu benennendes ADH1-Enzym detektierbar. Die oberste Bande in der Leber besteht augenscheinlich aus mindestens zwei, wenn nicht drei verschiedenen Banden. Der untere Teil dieses Komplexes ist trotz schlechter Trennung ziemlich sicher der ADH2 zuzuordnen. ADH3-Expression ist in allen Proben nachweisbar, am stärksten in der Niere, dem Hoden, der Leber und der Prostata. Interessant ist die Bande unterhalb der ADH3-Bande in der Leber, die aufgrund der Immunreaktivität offenbar eine ADH5-Form (5a oder 5b) darstellt. Eine Zuordnung der untersten immunreaktiven Bande in der Leber ist mit diesem Blot nicht möglich (fehlende ADH-Standards).

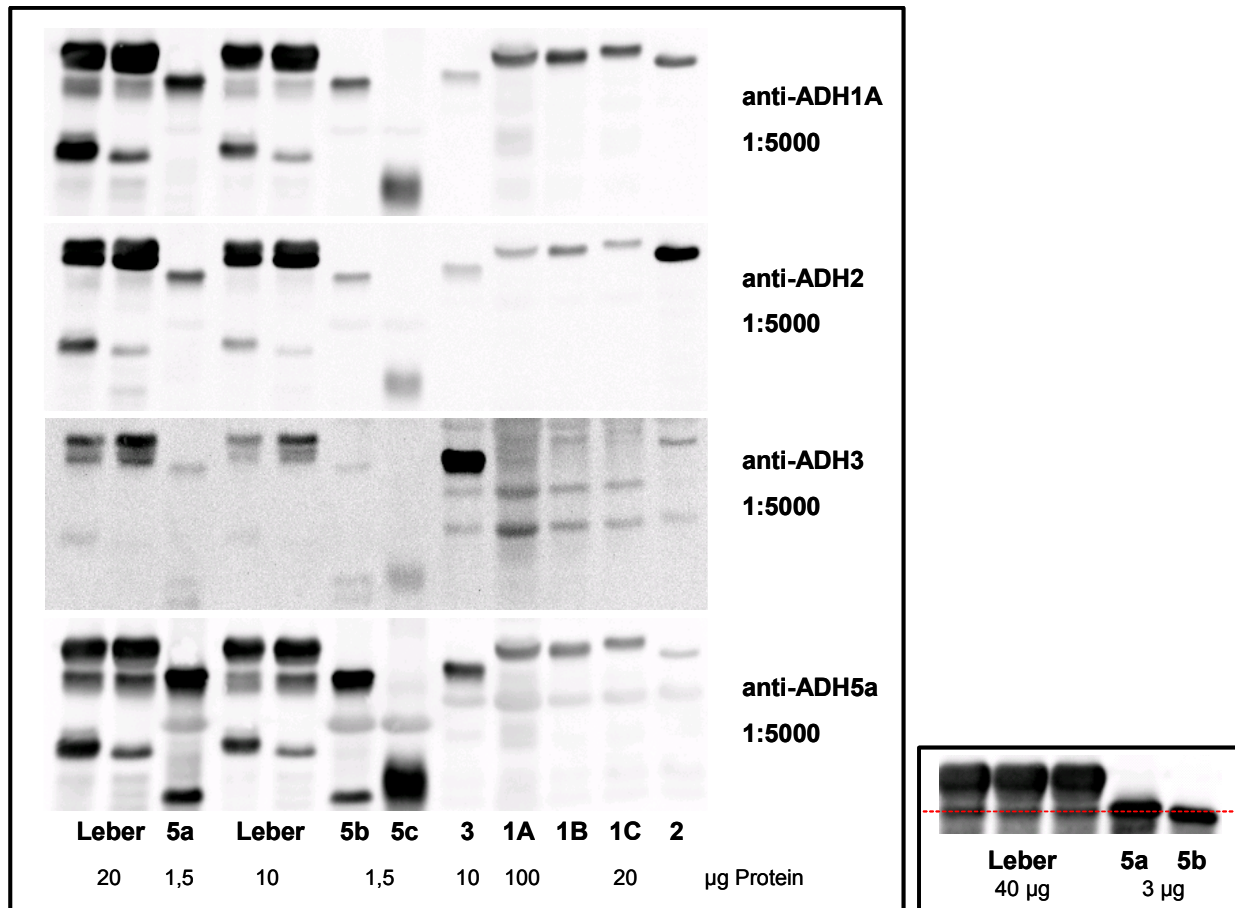


Abb. 27: Verifizierung der Expression von ADH5 in humaner Leber. Linke Seite: Western Blot eines 12 %igen SDS-PA-Gels. Als Standards für die humanen ADH5-Formen diente „inclusion body“-Protein transformierter *E. coli* XL-1, für die übrigen hADH wurde zytosolisches Protein transformierter *S. typhimurium* verwendet. Die aufgrund ihrer Immunreaktivität als ADH5-Form vermutete Proteinbande in der Leber (Abb. 8) komigriert mit der ADH5 im Standard. Eine genaue Zuordnung, ADH5a oder 5b, ist mit diesem Blot jedoch nicht möglich. Die unterste immunreaktive Bande in der Leber komigriert mit keiner humanen ADH-Form. Rechte Seite: Western Blot eines 10 %igen SDS-PA-Gels behandelt mit anti-ADH5a (1:5000 verdünnt). Die ADH5-Form in der Leber komigriert offenbar mit dem ADH5a-Standard, während ADH5b etwas tiefer läuft.

3.2 Expression der humanen ADH in Bakterien

Korrekte cDNA aller sieben humanen ADH inklusive der drei bekannten Spleiß-Varianten von ADH5 wurden kloniert (Tabelle 11). Alle ADH wurden in mehreren verschiedenen bakteriellen Expressionssystemen exprimiert (Tabelle 12). Alle drei Spleiß-Varianten von ADH5 führten in *E. coli* XL-1 primär zur Expression in der unlöslichen Fraktion. Darüber hinaus erwies sich auch die geringe Proteinmenge in der löslichen Fraktion als enzymatisch nicht aktiv (siehe Abschnitt 3.2.1).

Tabelle 11: Allgemeine Daten zu den klonierten humanen ADH-cDNA und den kodierten Proteinen.

ADH	Referenzsequenz ^a	Exonzahl	mRNA-Quelle	Abweichungen zur Referenzsequenz	M (Da) berechnet aus der Aminosäuresequenz	M (kDa) geschätzt aus der elektrophoretischen Mobilität der exprimierten ADH
1A	NM 000667	9	Leber	-	39.857	40,4
1B	BC033009	9	Leber	-	39.852	40,2
1C	NM 000669	9	Leber	G710T (still)	39.866	40,5
2	BC022319	9	Leber	A653G (still)	40.220	40,0
3	BC014665	9	Leber	-	39.722	39,5
4	X76342	9	Mundschleimhaut	-	40.004	40,5
5a	NM 00072 (bis Nukleotid 972) dann AJ278908 (Exon 9)	9	Leber	C1071T, G108A ^d , G714T ^d (alle still)	39.813	39,3
5b	NM 00072	8 ^b	Leber	C1071T, G108A ^d , G714T ^d (alle still)	39.071	39,2
5c	BC039065	7 ^c	Leber	C935T (äquivalent zu C1071T in ADH5a und 5b, still)	31.298	31,5

^a GenBank accession number, Übereinstimmung verifiziert durch Sequenzierung des klonierten Konstrukts (Abschnitte 2.2.3.1 und 2.2.4) sowie, für ADH5c, des PCR-Produkts (Abschnitt 2.2.5).

^b Ohne Exon 9.

^c Ohne Exons 7 und 9, Fehlen von Exon 7 führt zu Leserasterverschiebung und frühen Stoppkodon in Exon 8 (Exonnummerierung von ADH5a).

^d Wahrscheinlich echte stille Varianten, da auch in BC039065 vorhanden.

Die Transformation von Salmonellen mit ADH5 gelang trotz verschiedener methodischer Modifikationen (Anzuchttemperatur) nicht und scheiterte in jedem Fall bereits beim Versuch der Transformation des Stamms LB5000 (Abschnitte 2.2.8 und 2.2.10).

Tabelle 12: Genutzte Expressionssysteme für die humanen ADH.

ADH	Expressionsniveau					
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET-28b ^a		<i>E. coli</i> XL-1/pKK233-2 ^b		<i>S. typhimurium</i> TA100/pKN ^c	
	löslich	unlöslich	löslich	unlöslich	löslich [%] ^d	unlöslich
1A	-	+++	++		0,25 ± 0,03	-
1B	nicht konstruiert		+++		1,6 ± 0,1	-
1C			++++	nicht	1,38 ± 0,05	-
2	++	+++++	+++	untersucht	2,0 ± 0,2	-
3	-	+++++	+++++		3,7 ± 0,4	++
4	-	+++++	+++		1,6 ± 0,2	-
5a	-	+++++	++	+++++	Transformation nicht erfolgreich	
5b	nicht konstruiert		+	+++++		
5c			(+)	+++++		

^a Induzierbarer Vektor, zu sehr hoher Expression führend (Abschnitt 2.3.1). Die gebildeten „inclusion bodies“ (unlösliche Fraktion) wurden zu Generierung von Antiseren genutzt (Abschnitt 2.3.7).

^b Dieses System hatte eine Vorläuferfunktion zur Erzeugung der rekombinanten *Salmonella*-Stämme. In der löslichen Fraktion exprimiertes Protein könnte zusätzlich (sofern aktiv, siehe Abschnitt 3.2.1) als Enzymquelle genutzt werden.

^c Lebende Bakterien können für Mutagenitätstests genutzt werden. Die lösliche Fraktion wurde als Enzymquelle genutzt (Abschnitte 3.2.1, 3.5 und 3.6). Ähnliche Ergebnisse wurden im *S. typhimurium* TA1538/pKK233-2 System erhalten (verwendbar für die Detektion anderer Mutationstypen).

^d Das Expressionsniveau der humanen ADH in diesem System wurde mit Hilfe der „inclusion bodies“ als Standards bestimmt (Abschnitt 2.4.3) und in % vom Gesamtprotein (zytosolisch) angegeben. Das Expressionsniveau der ADH2 ist dabei äquivalent zu „++++“. Ein Unterschied von einem „+“ entspricht in etwa einem 1,5-2fachen Unterschied im Expressionsniveau.

3.2.1 Enzymatische Aktivität der exprimierten Proteine

Zytosolische Fraktionen hADH-exprimierender *E. coli* XL-1, *S. typhimurium* TA1538 und TA100 wurden als Enzymquelle für die Aktivitätsbestimmung (Abschnitt 2.4.4) mit den Substraten Ethanol (33 mM) und 1-Octanol (1 mM) verwendet (Abb. 28).

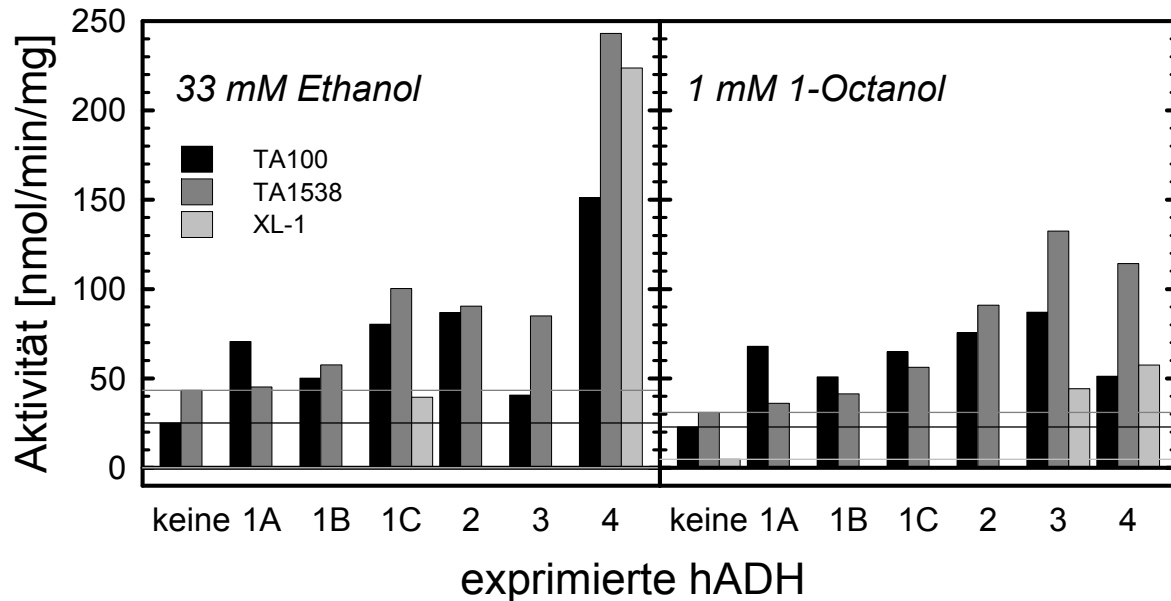


Abb. 28: Enzymatische Aktivität der exprimierten hADH. Bestimmt wurde die Bildung von NADH bei 340 nm. Als Enzymquelle wurden je 200 µg zytosolisches Protein nichttransformierter Bakterien (Kontrolle) bzw. hADH-transformierter Bakterien verwendet.

E. coli zeigte zwar nur eine sehr geringe endogene ADH-Aktivität, doch auch für die humanen Enzyme ADH1A, 1B und 2 war in diesem System keine Aktivität nachweisbar. Auch die ADH5-Varianten waren enzymatisch inaktiv (nicht abgebildet). *S. typhimurium* wies eine nicht unerhebliche endogene ADH-Aktivität auf. Zytosole aus hADH-transformierten TA100 zeigten jedoch für wenigstens ein getestetes Substrat eine mindestens doppelt so hohe Aktivität wie die Kontrolle. Dies war beim TA1538-System für die humanen Enzyme ADH1A und 1B nicht der Fall.

3.3 Expression humaner ADH5a in Säugerzellen

Die Expression der humanen ADH5-Varianten in *E. coli* führte nicht zu enzymatisch aktivem Protein (Abschnitt 3.2.1). Daher wurde ADH5a in den pSI-Expressionsvektor umkloniert (Abschnitt 2.5.1) und dieses Konstrukt in V79-Zellen transfiziert (Abschnitt 2.5.2). Es wurden mehrere Zellklone erhalten, die ADH5a exprimierten (Abb. 29). Von acht analysierten positiven Klonen zeigten zwei (Klone 35 und 46) eine stabile ADH5a-Expression über mehr als zehn Passagen (Abschnitt 2.5.4) (Abb. 30).

Die Expressionshöhe von ADH5a wurde mittels Immunblotanalyse unter Verwendung von ADH5a-„inclusion bodies“ als Standards bestimmt (analog zu Abschnitt 2.4.3). Das

rekombinante Enzym macht etwa 0,2 % des gesamten zytosolischen Proteins aus (Klon 46 Passage 2, für Klon 35 ähnlich).

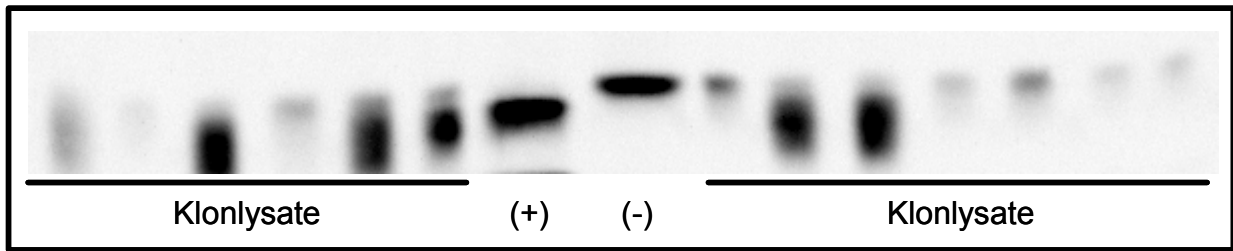


Abb. 29: Test auf Expression humaner ADH5a in V79-Zellklonen. Western Blot eines 10 %igen SDS-PA-Gels, zur Detektion von ADH5a inkubiert mit anti-ADH5a (1:5000). Von nach Transfektion und Selektion geernteten Zellklonen wurde die Hälfte lysiert und auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen. Als Positivkontrolle (+) dienten 1,5 µg Protein der unlöslichen Fraktion ADH5a-transformierter *E. coli*, als Negativkontrolle (-) ein Lysat nichttransformierter V79-Zellen. Die obere immunreaktive Bande bei den Klonlysaten, korrespondierend mit der immunreaktiven Bande der Negativkontrolle, stellt die endogene ADH der V79-Zellen dar.

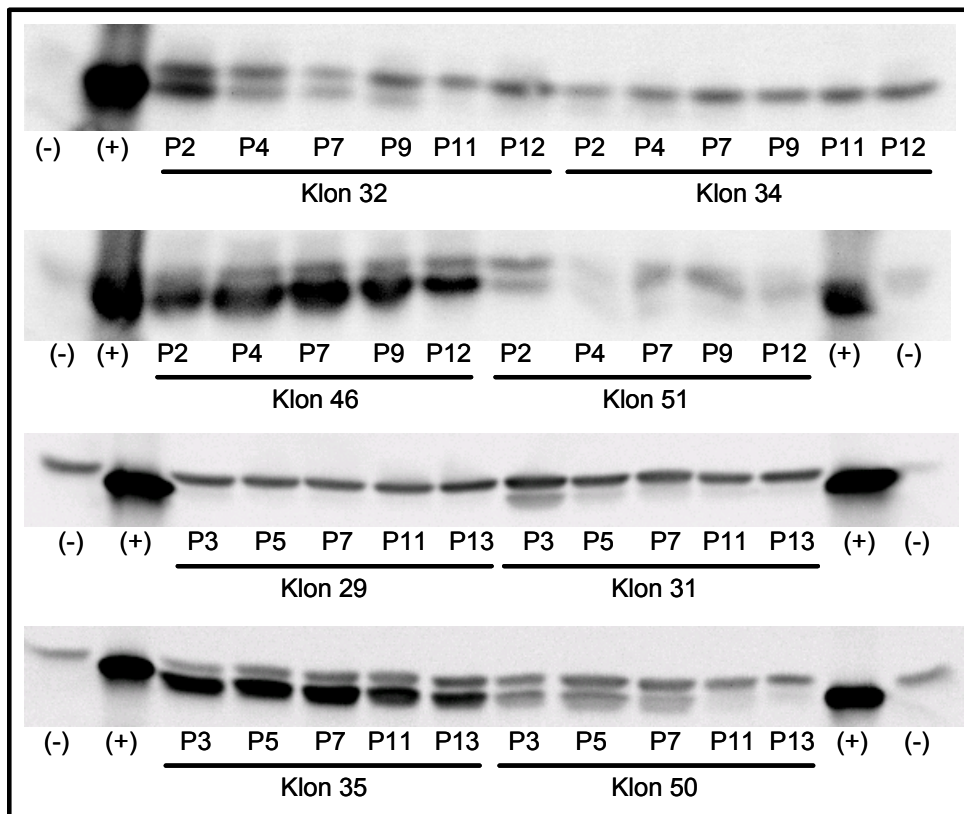


Abb. 30: Expressionsstabilität von hADH5a in V79-Zellklonen. Western Blots 10 %iger SDS-PA-Gele inkubiert mit anti-ADH5a (1:5000). Die zu untersuchenden Zellklone wurden wiederholt passagiert und von einigen Passagen wurden Zytosole hergestellt. Von diesen Zytosolen sowie von einem Zytosol nichttransformierter V79-Zellen (-) wurden 100 µg Protein für die SDS-PAGE verwendet. Als Positivkontrolle (+) dienten 1,5 µg Protein der unlöslichen Fraktion ADH5a-transformierter *E. coli*.

3.3.1 Enzymatische Aktivität der exprimierten hADH5a

Zytosolische Fraktionen hADH5a-exprimierender V79-Zellen, wurden als Enzymquelle für die Aktivitätsbestimmung (analog zu Abschnitt 2.4.4) mit den Substraten Ethanol (33 mM), 1-Octanol (1 mM) und Benzylalkohol (1 mM) verwendet. Nicht trivial erklärable Ergebnisse (scheinbarer Umsatz des ADH-Inhibitors 4-Methylpyrazol, nicht abgebildet), veranlassten uns eine Messung ohne Substratzugabe durchzuführen (Abb. 31). Die festgestellte Aktivität entsprach den mit Substrat bestimmten Aktivitäten (mögliche Erklärung siehe Abschnitt 4.3). Es wurde versucht, die diese Aktivität „ohne Substrat“ verursachenden Störfaktoren durch Ultrafiltration (mit 30000 MWCO Filtereinheiten, Millipore, Schwalbach, Deutschland) zu beseitigen. Lediglich eine Reduktion dieser Störfaktoren konnte erreicht werden, mit 1-Octanol (1 mM) wurde eine etwa doppelt (nichttransformierte V79) bzw. etwa dreifach (hADH5a-transformierte V79) so hohe Aktivität festgestellt wie ohne Substratzugabe (Abb. 31). Die ca. 1,5fach höhere Aktivität mit V79-ADH5a läßt dennoch den Schluss zu, dass die exprimierte hADH5a enzymatisch aktiv ist.

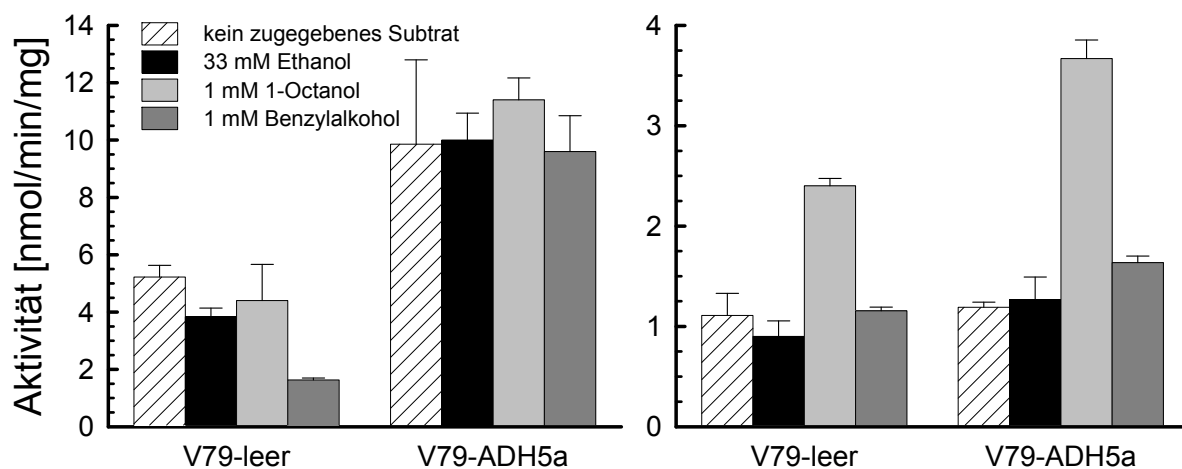


Abb. 31: Enzymatische Aktivität in V79-Zellen exprimierter hADH5a. Bestimmt wurde die Bildung von NADH bei 340 nm. Als Enzymquelle dienten Zellzytosole. Linke Seite: unbehandelte Zytosole, rechte Seite: Zytosole ultrafiltriert mit Filtereinheiten 30000 MWCO.

3.4 Partielle Reinigung der humanen Enzyme ADH1C, 2, 3 und 4

Aufgrund der Ergebnisse von Aktivitätsmessungen mit alk-PAK-Alkoholen (Abschnitt 3.5) sowie HMF und HMFA (Abschnitt 3.6) als Substrate unter Verwendung von *Salmonella*-Zytosolen als Enzymquelle wurde beschlossen, die humanen ADH1C, 2, 3 und 4

für detaillierte Untersuchungen partiell aufzureinigen (Abschnitt 2.6). Die Reinigung von ADH2 ist exemplarisch in Abb. 32 dargestellt. Die Reinigung der anderen Enzyme erfolgte analog. Der Aufreinigungsgrad unterschied sich für die einzelnen ADH-Enzyme, war jedoch bei verschiedenen Präparationen desselben Enzyms reproduzierbar. Der durchschnittliche prozentuale Anteil an humanen ADH-Protein am Gesamtproteingehalt der jeweils „saubersten“ hADH-haltigen Fraktion ist in Tabelle 13 dargestellt.

Zum Beweis der vollständigen Abtrennung der exprimierten hADH von der *Salmonella*-ADH wurde zudem auch ein Zytosol nichttransformierter Salmonellen analog fraktioniert. Die ADH-Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde mit Ethanol (33 mM) bzw. 1-Octanol (1 mM) als Substrat bestimmt (Tabelle 14).

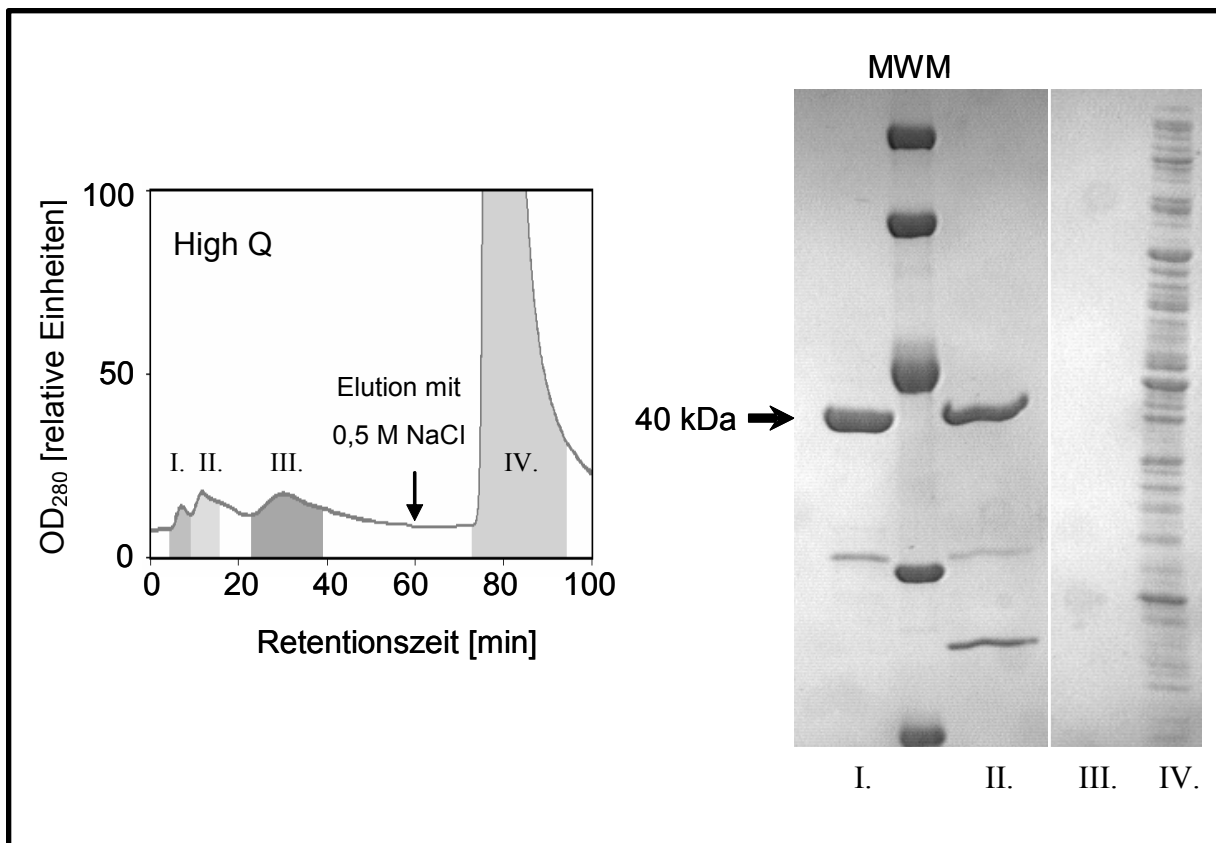


Abb. 32: Partielle Reinigung humaner ADH2. Fraktionierung der zytosolischen Fraktion hADH2-exprimierender *S. typhimurium* TA100 mittels Anionenaustauschchromatographie (linke Seite). Die gekennzeichneten Fraktionen wurden gesammelt und mittels Filtereinheiten (30000 MWCO) aufkonzentriert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (rechte Seite). Die Fraktionen I. und II. weisen eine Hauptproteinbande von etwa 40 kDa (korrespondierend mit dem Molekulargewicht einer ADH2-Untereinheit) auf und nur geringfügige Kontaminanten. MWM bedeutet Molekulargewichtsmarker.

Tabelle 13: Partielle Reinigung humaner ADH: Reinheitsgrad. Zytosole hADH-exprimierender und nichttransformierter (Kontrolle) *S. typhimurium* wurden mittels Anionenaustauschchromatographie fraktioniert und der Anteil von hADH-Protein am Gesamtproteingehalt der jeweils „saubersten“ Fraktion bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Western Blot Analyse mit ADH-„inclusion bodies“ als Standards.

ADH	Anteil [%] am Gesamtproteingehalt
1C	30-50
2	> 90
3	> 80
4	20-30

Tabelle 14: Partielle Reinigung humaner ADH: ADH-Aktivität der FPLC-Fraktionen. Zytosole hADH-exprimierender und nichttransformierter (Kontrolle) *S. typhimurium* wurden mittels Anionenaustauschchromatographie fraktioniert und die ADH-Aktivität (NADH-Bildung bei 340 nm) in 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer, pH 10 mit 33 mM Ethanol bzw. 1 mM 1-Octanol und 2,5 mM NAD bestimmt.

Fraktionsnummer	heterolog exprimierte hADH					
	keine	ADH1C	ADH2	ADH3	ADH4	
	spezifische Aktivität [nmol/min/mg] der Chromatographiefraktionen					
I.	n.d.	n.d. ^a	684	410	1250 ^a	2300
II.	n.d.	- ^b	170	370	- ^b	2924
III.	n.d.	n.d.	- ^c	n.d.	690	- ^c
IV.	40	31	65	40	30	72
Zytosol	33	25	52	60	71	130

^a gemessen mit 1-Octanol (1 mM).

^b Fraktion mit Fraktion I vereinigt.

^c Fraktion nicht gesammelt.

n.d., nicht detektierbar.

3.5 Humane ADH im alk-PAK-Metabolismus

Zytosole hADH-exprimierender *S. typhimurium* als Enzymquelle nutzend wurde die Oxidation von 15 benzyllischen alk-PAK-Alkoholen untersucht (Abschnitt 2.4.4.1) (Abb. 33). Im Vergleich zur Kontrolle (Zytosol nicht transformierter *S. typhimurium*) zeigte vor allem ADH2 einen deutlichen Umsatz von 1-, 2- und 4-HMP sowie von 1-HM-6-MP und

3.5.1 Kinetische Analysen mit den partiell gereinigten Enzymen

Mit den partiell gereinigten humanen Enzymen wurde spektrophotometrisch die Kinetik der ADH-katalysierten Oxidation der benzylischen Pyrenalkohole sowie die Reduktion der korrespondierenden Aldehyde untersucht (Abschnitt 2.7). Die kinetischen Parameter wurden mittels nichtlinearer Regression ermittelt (Abb. 34).

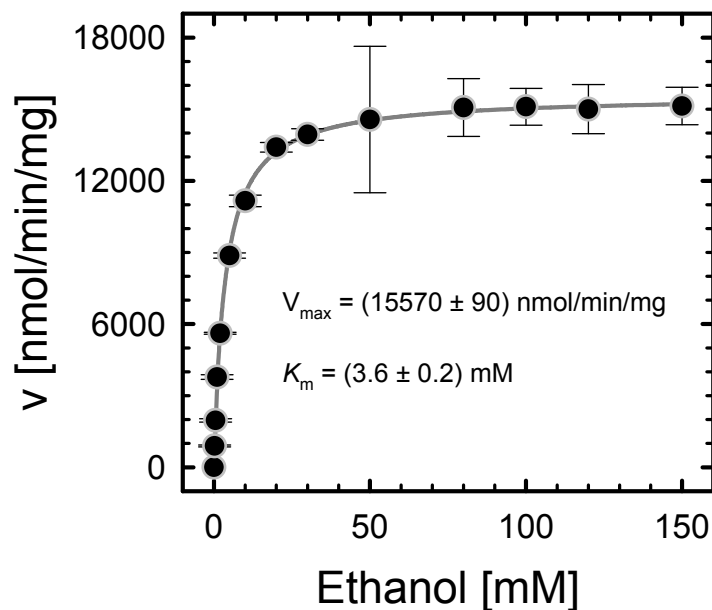


Abb. 34: Ermittlung kinetischer Parameter durch nichtlineare Regression. Oxidation von Ethanol durch hADH4: die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration wurde spektrophotometrisch bei 340 nm (NADH-Bildung) bestimmt.

3.5.1.1 ADH2

3.5.1.1.1 Einfluss von DMSO auf die ADH2-Aktivität

DMSO war nötig, um die als Substrate zu testenden Pyrenderivate in Lösung zu bringen (Abschnitte 2.4.4.1 und 2.7). Der Einfluss von DMSO auf die ADH2-katalysierte Oxidation von Ethanol sowie auf die Reduktion von Acetaldehyd wurde untersucht (Abschnitt 2.7.1). Die Oxidation wurde unkompetitiv inhibiert ($K_i' \approx 2,5 \% [v/v]$). Die Inhibition der Reduktion war dagegen vom Mischtyp ($K_i \approx 1 \%$, $K_i' \approx 11 \% [v/v]$) (Abb. 35).

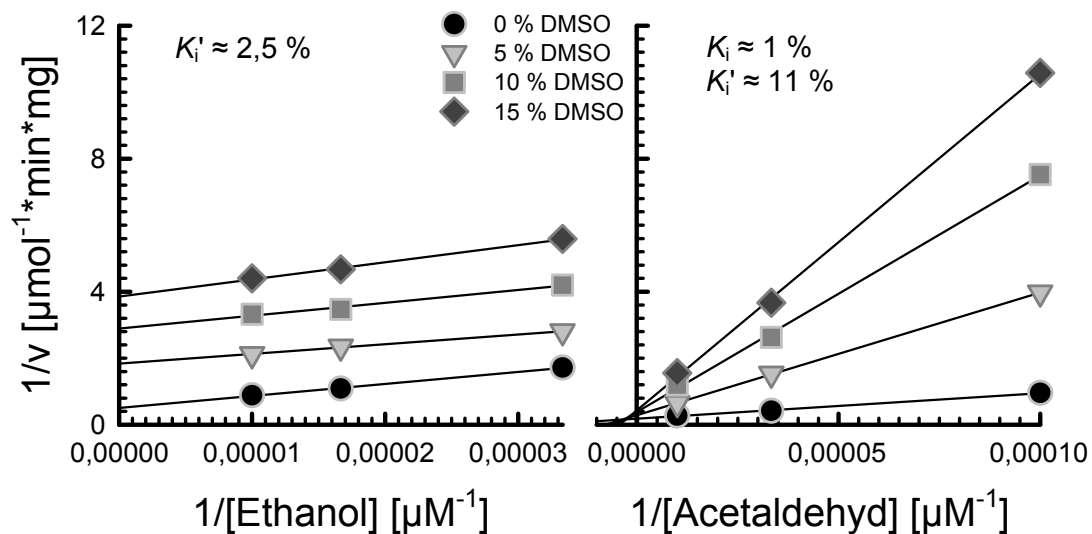


Abb. 35: Einfluss von DMSO auf die katalytische Aktivität humaner ADH2. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation von Ethanol sowie der Reduktion von Acetaldehyd wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in Gegenwart verschiedener DMSO-Konzentrationen spektrophotometrisch bei 340 nm (Bildung bzw. Verbrauch von NADH) bestimmt. Die als Lineweaver-Burk-Plots dargestellten Daten zeigen die unkompetitive Inhibition der Alkoholorxidation und die gemischte Inhibition der Aldehydreduktion. Die Inhibitionskonstanten wurden mit Sekundärplots ermittelt: K_i' aus Ordinatenabschnitt gegen [DMSO], K_i aus Steigung gegen [DMSO].

3.5.1.1.2 Einfluss von BSA auf die ADH2-Aktivität

Der Zusatz von BSA war eine Möglichkeit, die Löslichkeit der Pyrenderivate zu erhöhen (Abschnitt 2.7.1) und die DMSO-Konzentration im Reaktionsansatz stark zu reduzieren (von bis zu 10 % auf 0,33 % [v/v]). Der Zusatz von 0,33 % (w/v) BSA führte zu höheren Werten für V_{\max} und K_m sowohl für die Oxidations- als auch für die Reduktionsreaktion (Abschnitt 3.5.1.1.3). Da dies für die Reduktion so nicht erwartet war, wurde zusätzlich der Einfluss von BSA auf die ADH2-katalysierte Reduktion von Acetaldehyd untersucht (Abschnitt 2.7.1). Diese Untersuchung zeigte ein kompetitives Inhibitionsmuster mit Aktivitätsstimulation (Erhöhung von V_{\max}) (Abb. 36). Auf die ADH2-katalysierte Oxidation von Ethanol hatte BSA keinen signifikanten Einfluss.

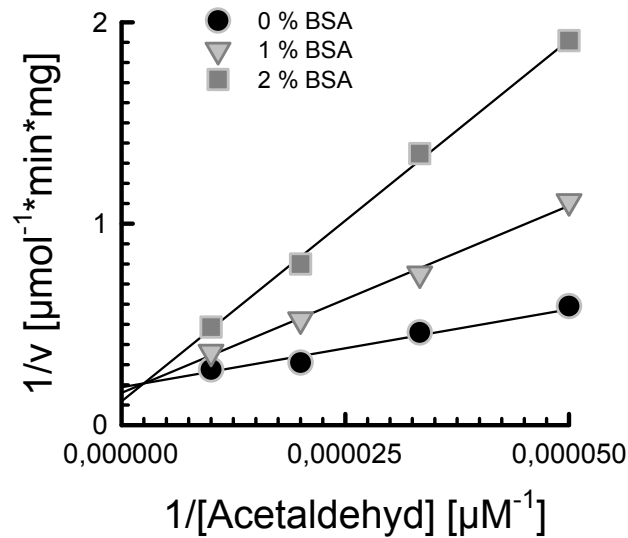


Abb. 36: Einfluss von BSA auf die ADH2-katalysierte Reduktion von Acetaldehyd. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in Gegenwart verschiedener BSA-Konzentrationen spektrophotometrisch bei 340 nm (Verbrauch von NADH) bestimmt. Die Lineweaver-Burk-Auftragung der Daten zeigt ein kompetitives Inhibitionsmuster ($K_i \approx 0,5\%$ [w/v]) mit gleichzeitiger Aktivitätsstimulation (Erhöhung von V_{\max}). K_i wurde mittels der Sekundärauftragung Steigung gegen [BSA] ermittelt.

3.5.1.1.3 ADH2-katalysierte Oxidation von Pyrenylmethanolen und Reduktion von Pyrenaldehyden

Die kinetischen Parameter für die ADH2-katalysierte Oxidation von 1-, 2- und 4-HMP, 1-HM-6-MP und 1-HM-8-MP sowie für die Reduktion von 1-, 2- und 4-FP, 1-F-6-MP und 1-F-8-MP wurden bestimmt (Tabelle 15). Diese Bestimmung erfolgte zusätzlich mit 0,33 % (w/v) (49,25 μM) BSA im Reaktionsansatz. Darüber hinaus wurden zum Vergleich die kinetischen Parameter für die Oxidation von Ethanol und die Reduktion von Acetaldehyd bestimmt.

Tabelle 15: Kinetische Parameter (\pm SE) der hADH2-katalysierten Oxidation bzw. Reduktion von Pyrenylmethanolen und Ethanol bzw. Pyrenaldehyden und Acetaldehyd. Die Oxidationsreaktion erfolgte in 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer (pH 10) mit 1,25 mM NAD und die Reduktionsreaktion in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,5) mit 0,25 mM NADH.

Substrat	^a 6 %, ^b 2% und ^c 10 % (v/v) DMSO im Reaktionsansatz			0,33 % (v/v) DMSO, 0,33 % BSA (w/v) im Reaktionsansatz		
	V_{\max} [nmol/min/mg]	K_m [μ M]	V_{\max}/K_m [ml/min/mg]	V_{\max} [nmol/min/mg]	K_m [μ M]	V_{\max}/K_m [ml/min/mg]
^a 1-Hydroxymethylpyren	600 \pm 40	76 \pm 7	8	680 \pm 140	350 \pm 90	2
^b 2-Hydroxymethylpyren	1800 \pm 100	4,4 \pm 0,7	409	4700 \pm 700	80 \pm 20	59
^a 4-Hydroxymethylpyren	860 \pm 110	40 \pm 10	22	1770 \pm 220	240 \pm 40	7
^c 1-Hydroxymethyl-6-Methylpyren	158 \pm 5	6,4 \pm 0,4	25	250 \pm 50	350 \pm 80	0,7
^c 1-Hydroxymethyl-8-Methylpyren	550 \pm 30	6,4 \pm 0,6	86	1090 \pm 40	59 \pm 4	18
Ethanol	1350 \pm 80	33000 \pm 4000	0,04	-	-	-
^c 1-Formylpyren	140 \pm 8	12 \pm 2	12	460 \pm 30	95 \pm 8	5
^c 2-Formylpyren	1210 \pm 110	2,9 \pm 0,2	417	6400 \pm 40	29 \pm 2	221
^c 4-Formylpyren	189 \pm 4	3,8 \pm 0,3	50	268 \pm 5	10,2 \pm 0,5	26
^c 1-Formyl-6-Methylpyren	24,7 \pm 0,3	0,32 \pm 0,02	77	460 \pm 30	52 \pm 5	9
^c 1-Formyl-8-Methylpyren	250 \pm 20	0,24 \pm 0,04	1042	610 \pm 30	10 \pm 1	61
Acetaldehyd	4400 \pm 300	26000 \pm 4000	0,2	-	-	-

-, nicht bestimmt.

3.5.1.2 ADH4

3.5.1.2.1 Einfluss von DMSO auf die ADH4-Aktivität

Der Einfluss von DMSO auf die ADH4-katalysierte Oxidation von Ethanol sowie auf die Reduktion von Acetaldehyd wurde untersucht (Abschnitt 2.7.1). Die Oxidation wurde unkompetitiv inhibiert ($K_i' \approx 1\%$ [v/v]). Die Inhibition der Reduktion war dagegen nichtkompetitiv ($K_i = K_i' \approx 1\%$ [v/v]) (Abb. 37).

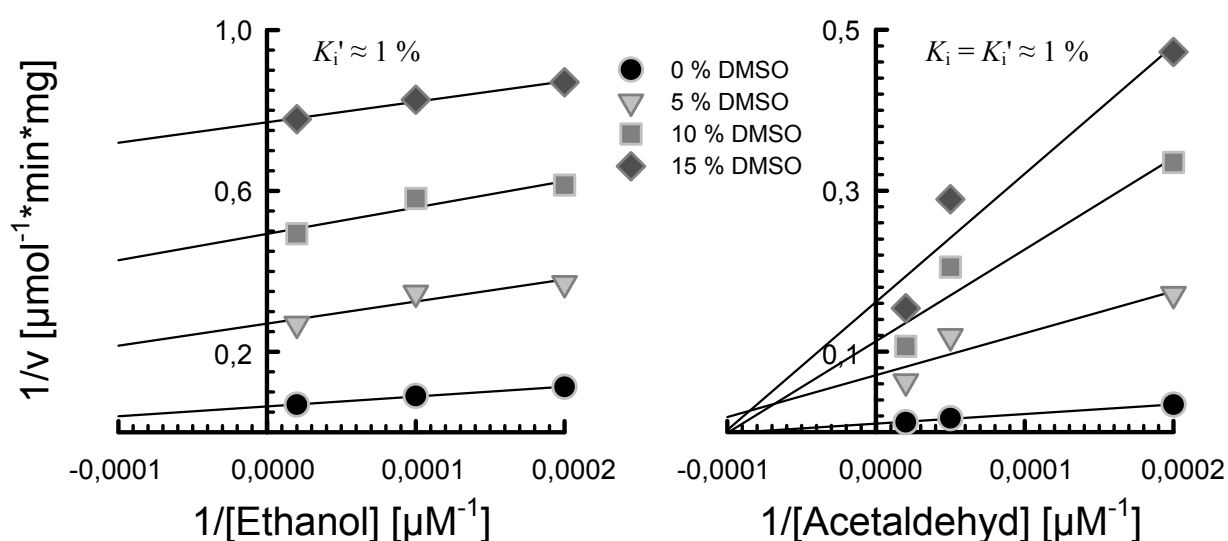


Abb. 37: Einfluss von DMSO auf die katalytische Aktivität humaner ADH4. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation von Ethanol sowie der Reduktion von Acetaldehyd wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in Gegenwart verschiedener DMSO-Konzentrationen spektrophotometrisch bei 340 nm (Bildung bzw. Verbrauch von NADH) bestimmt. Die als Lineweaver-Burk-Plots dargestellten Daten zeigen die unkompetitive Inhibition der Alkoholoxidation und die nichtkompetitive Inhibition der Aldehydreduktion. Die Inhibitionskonstanten wurden mit Sekundärplots ermittelt: K_i' aus Ordinatenabschnitt gegen [DMSO], K_i aus Steigung gegen [DMSO].

3.5.1.2.2 ADH4-katalysierte Oxidation von Pyrenylmethanolen und Reduktion von Pyrenaldehyden

Die kinetischen Parameter für die ADH4-katalysierte Oxidation von 1-, 2- und 4-HMP, 1-HM-6-MP und 1-HM-8-MP sowie für die Reduktion von 1-, 2- und 4-FP, 1-F-6-MP und 1-F-8-MP wurden bestimmt (Tabelle 16). Darüber hinaus wurden zum Vergleich die kinetischen Parameter für die Oxidation von Ethanol und die Reduktion von Acetaldehyd bestimmt.

Tabelle 16: Kinetische Parameter (\pm SE) der hADH4-katalysierten Oxidation bzw. Reduktion von Pyrenylmethanolen und Ethanol bzw. Pyrenaldehyden und Acetaldehyd. Die Oxidationsreaktion erfolgte in 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer (pH 10) mit 2,5 mM NAD und die Reduktionsreaktion in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,5) mit 0,5 mM NADH.

Substrat	V_{\max} [nmol/min/mg]	K_m [μ M]	V_{\max}/K_m [ml/min/mg]
1-Hydroxymethylpyren	51,8 \pm 0,3	28,3 \pm 0,4	2
2-Hydroxymethylpyren	3500 \pm 100	33 \pm 2	106
4-Hydroxymethylpyren	25,7 \pm 0,5	2,9 \pm 0,3	9
1-Hydroxymethyl-6-Methylpyren	9,00 \pm 0,06	0,28 \pm 0,01	32
1-Hydroxymethyl-8-Methylpyren	41,5 \pm 0,6	1,6 \pm 0,1	26
Ethanol	15570 \pm 90	3600 \pm 200	4
1-Formylpyren	40,3 \pm 0,6	0,92 \pm 0,06	44
2-Formylpyren	1270 \pm 40	6,9 \pm 0,6	184
4-Formylpyren	22,3 \pm 0,4	0,48 \pm 0,05	46
1-Formyl-6-Methylpyren	3,88 \pm 0,05	0,036 \pm 0,002	108
1-Formyl-8-Methylpyren	1,48 \pm 0,02	0,035 \pm 0,002	42
Acetaldehyd	100000 \pm 2000	12700 \pm 700	8

Die Reaktionsansätze mit den Pyrenylmethanolen enthielten 6 % (v/v) DMSO und mit den Pyrenaldehyden 10 % (v/v) DMSO.

3.5.1.3 ADH1C

3.5.1.3.1 Einfluss von DMSO auf die ADH1C-Aktivität

Der Einfluss von DMSO auf die ADH1C-katalysierte Oxidation von Ethanol sowie auf die Reduktion von Acetaldehyd wurde untersucht (Abschnitt 2.7.1). Die Oxidation wurde unkompetitiv inhibiert ($K_i' \approx 1$ % [v/v]). Die Inhibition der Reduktion war dagegen vom Mischtyp ($K_i \approx 0,004$ %, $K_i' \approx 0,16$ % [v/v]) (Abb. 38).

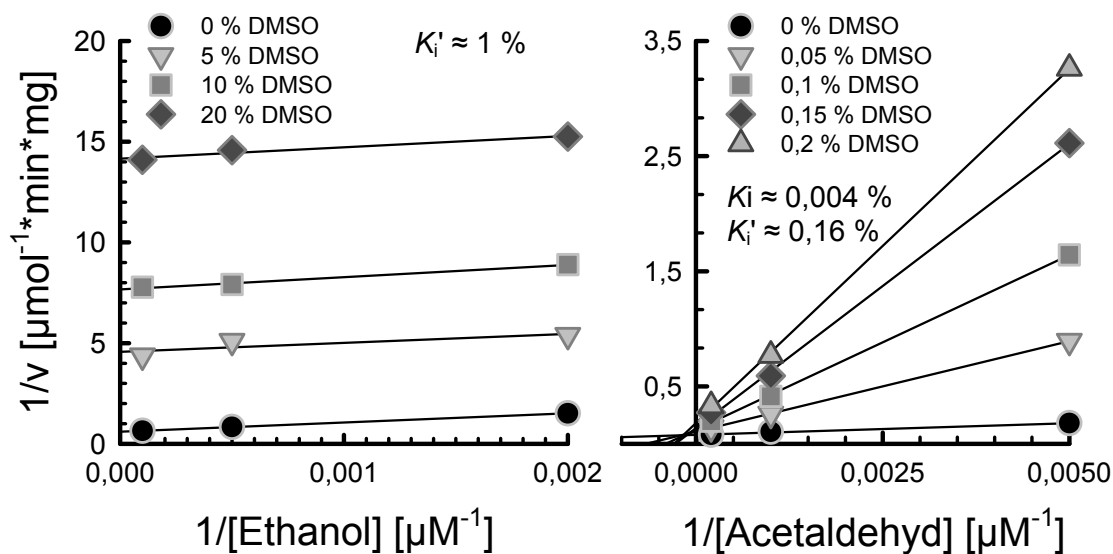


Abb. 38: Einfluss von DMSO auf die katalytische Aktivität humaner ADH1C. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation von Ethanol sowie der Reduktion von Acetaldehyd wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in Gegenwart verschiedener DMSO-Konzentrationen spektrophotometrisch bei 340 nm (Bildung bzw. Verbrauch von NADH) bestimmt. Die als Lineweaver-Burk-Plots dargestellten Daten zeigen die unkompetitive Inhibition der Alkoholorxidation und die gemischte Inhibition der Aldehydreduktion. Die Inhibitionskonstanten wurden mit Sekundärplots ermittelt: K_i' aus Ordinatenabschnitt gegen [DMSO], K_i aus Steigung gegen [DMSO].

3.5.1.3.2 ADH1C-katalysierte Oxidation von Pyrenylmethanolen und Reduktion von Pyrenaldehyden

Die kinetischen Parameter für die ADH1C-katalysierte Oxidation von 1-, 2- und 4-HMP, 1-HM-6-MP und 1-HM-8-MP sowie für die Reduktion von 1-, 2- und 4-FP, 1-F-6-MP und 1-F-8-MP wurden bestimmt (Tabelle 17). Darüber hinaus wurden zum Vergleich die kinetischen Parameter für die Oxidation von Ethanol und die Reduktion von Acetaldehyd bestimmt.

Tabelle 17: Kinetische Parameter (\pm SE) der hADH1C-katalysierten Oxidation bzw. Reduktion von Pyrenylmethanolen und Ethanol bzw. Pyrenaldehyden und Acetaldehyd. Die Oxidationsreaktion erfolgte in 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer (pH 10) mit 2,5 mM NAD und die Reduktionsreaktion in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,5) mit 0,5 mM NADH.

Substrat	V_{\max} [nmol/min/mg]	K_m [μ M]	V_{\max}/K_m [ml/min/mg]
1-Hydroxymethylpyren	15,3 \pm 0,2	0,75 \pm 0,04	20
2-Hydroxymethylpyren	22,0 \pm 0,3	0,48 \pm 0,03	46
4-Hydroxymethylpyren	60 \pm 2	1,0 \pm 0,2	60
1-Hydroxymethyl-6-Methylpyren	21,5 \pm 0,3	1,15 \pm 0,05	19
1-Hydroxymethyl-8-Methylpyren	112 \pm 11	59 \pm 9	2
Ethanol	1650 \pm 20	770 \pm 40	2
1-Formylpyren	28,9 \pm 0,2	0,50 \pm 0,02	58
2-Formylpyren	100 \pm 4	2,1 \pm 0,3	48
4-Formylpyren	112 \pm 2	1,00 \pm 0,04	112
1-Formyl-6-Methylpyren	21,9 \pm 0,2	0,90 \pm 0,04	24
1-Formyl-8-Methylpyren	11,5 \pm 0,2	1,31 \pm 0,06	9
Acetaldehyd	13500 \pm 300	340 \pm 40	40

Die Reaktionsansätze mit den Pyrenylmethanolen enthielten 10 % (v/v) DMSO und mit den Pyrenaldehyden 2 % (v/v) DMSO.

3.5.1.4 ADH3

3.5.1.4.1 Einfluss von DMSO auf die ADH3-Aktivität

Der Einfluss von DMSO auf die ADH3-katalysierte Oxidation von 1-Octanol sowie auf die Reduktion von Octanal wurde untersucht (Abschnitt 2.7.1). Die Oxidation wurde bis zu einer DMSO-Konzentration von 14 % (v/v) faktisch nicht inhibiert. Die Reduktion wurde dagegen schwach nichtkompetitiv gehemmt ($K_i = K_i' \approx 37$ % [v/v]) (Abb. 39).

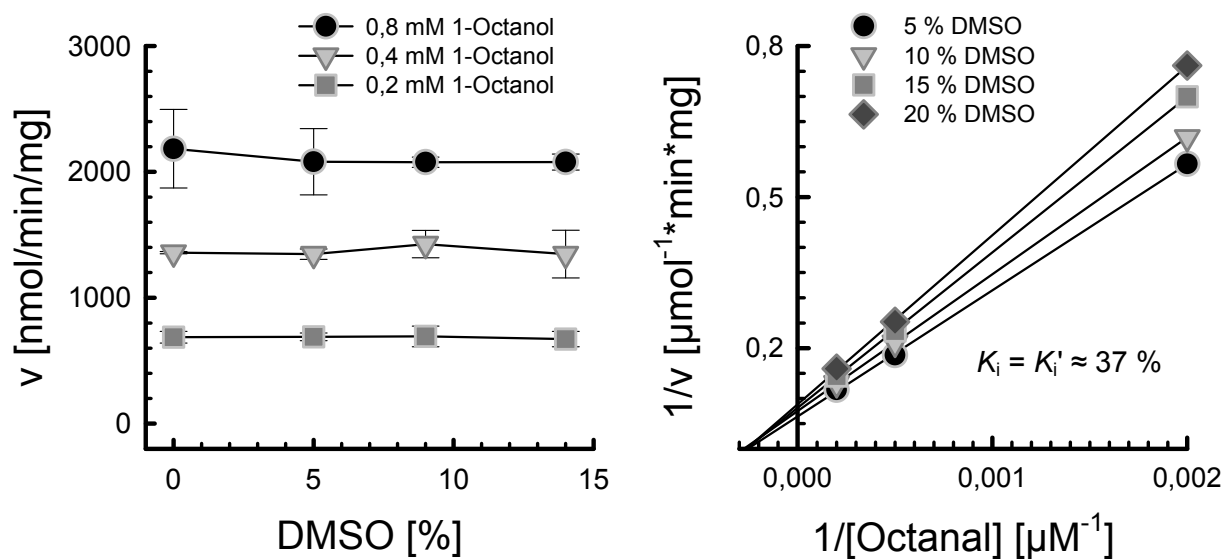


Abb. 39: Einfluss von DMSO auf die katalytische Aktivität humaner ADH3. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation von 1-Octanol sowie der Reduktion von Octanal wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in Gegenwart verschiedener DMSO-Konzentrationen spektrophotometrisch bei 340 nm (Bildung bzw. Verbrauch von NADH) bestimmt. Linke Seite: DMSO zeigt bis zu einer Konzentration von 14 % (v/v) faktisch keinen inhibitorischen Einfluss auf die Oxidation von 1-Octanol. Rechte Seite: Die als Lineweaver-Burk-Plot dargestellten Daten zeigen die schwache nichtkompetitive Inhibition der Aldehydreduktion. Die Inhibitionskonstanten wurden mit Sekundärplots ermittelt: K_i' aus Ordinatenabschnitt gegen [DMSO], K_i aus Steigung gegen [DMSO].

3.5.1.4.2 ADH3-katalysierte Oxidation von Pyrenylmethanolen und Reduktion von Pyrenaldehyden

Die kinetischen Parameter für die ADH3-katalysierte Oxidation von 1-, 2- und 4-HMP, 1-HM-6-MP und 1-HM-8-MP sowie für die Reduktion von 1-, 2- und 4-FP, 1-F-6-MP und 1-F-8-MP wurden bestimmt (Tabelle 18). Darüber hinaus wurden zum Vergleich die kinetischen Parameter für die Oxidation von 1-Octanol und die Reduktion von Octanal bestimmt.

Tabelle 18: Kinetische Parameter (\pm SE) der hADH3-katalysierten Oxidation bzw. Reduktion von Pyrenylmethanolen und 1-Octanol bzw. Pyrenaldehyden und Octanal. Die Oxidationsreaktion erfolgte in 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer (pH 10) mit 2,5 mM NAD und die Reduktionsreaktion in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,5) mit 0,5 mM NADH.

Substrat	V_{\max} [nmol/min/mg]	K_m [μ M]	V_{\max}/K_m [ml/min/mg]
1-Hydroxymethylpyren	$9,2 \pm 0,2$	$0,59 \pm 0,04$	16
2-Hydroxymethylpyren	1350 ± 50	106 ± 7	13
4-Hydroxymethylpyren	$11,5 \pm 0,2$	$0,37 \pm 0,03$	31
1-Hydroxymethyl-6-Methylpyren	$1,81 \pm 0,03$	$0,57 \pm 0,03$	3
1-Hydroxymethyl-8-Methylpyren	$4,17 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,01$	13
^a 1-Octanol	2800 ± 200	390 ± 40	7
1-Formylpyren	$12,3 \pm 0,2$	$0,55 \pm 0,03$	22
2-Formylpyren	108 ± 5	9 ± 1	12
4-Formylpyren	$23,6 \pm 0,5$	$2,1 \pm 0,2$	11
1-Formyl-6-Methylpyren	$5,1 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,3$	1,3
1-Formyl-8-Methylpyren	$6,85 \pm 0,06$	$1,49 \pm 0,05$	5
Octanal	9600 ± 400	1900 ± 200	5

Die Reaktionsansätze mit den Pyrenylmethanolen, den Pyrenaldehyden sowie mit Octanal enthielten 10 % (v/v) DMSO. ^a ADH3 zeigte für 1-Octanol eine deutlich sigmoidale Kinetik ($h = 1,6 \pm 0,2$).

3.5.2 Inhibition der hADH-katalysierten Oxidation, insbesondere von Pyrenylmethanolen

Der Effekt von 4-Methylpyrazol, Daidzein, Cimetidin sowie Pentachlorphenol auf die hADH-katalysierte Alkoholoxidation wurde studiert (Abschnitt 2.7.1). Darüber hinaus wurde der Effekt von Ethanol auf die hADH2-katalysierte Pyrenylmethanoloxidation untersucht (Abschnitt 2.7.1.1). In Tabelle 19 sind Inhibitionstyp und die ermittelten apparenten Inhibitorkonstanten für die einzelnen untersuchten Verbindungen zusammengefasst. Der Effekt von Cimetidin und Daidzein auf hADH1C erwies sich als komplex. Während die Oxidation von Ethanol nichtkompetitiv bzw. gemischt gehemmt wurde, war für die Oxidation von 4-HMP eine Aktivierung durch Erhöhung von V_{\max} zu beobachten (Abb. 40 und 41). Daidzein zeigte dabei noch eine kompetitive Inhibitionskomponente (Erhöhung von K_m).

Ethanol inhibierte die ADH2-katalysierte 1-HMP-Oxidation kompetitiv. Die Inhibition der Oxidation von 1-HM-8-MP durch Ethanol war dagegen interessanterweise vom Mischtyp (Abb. 42).

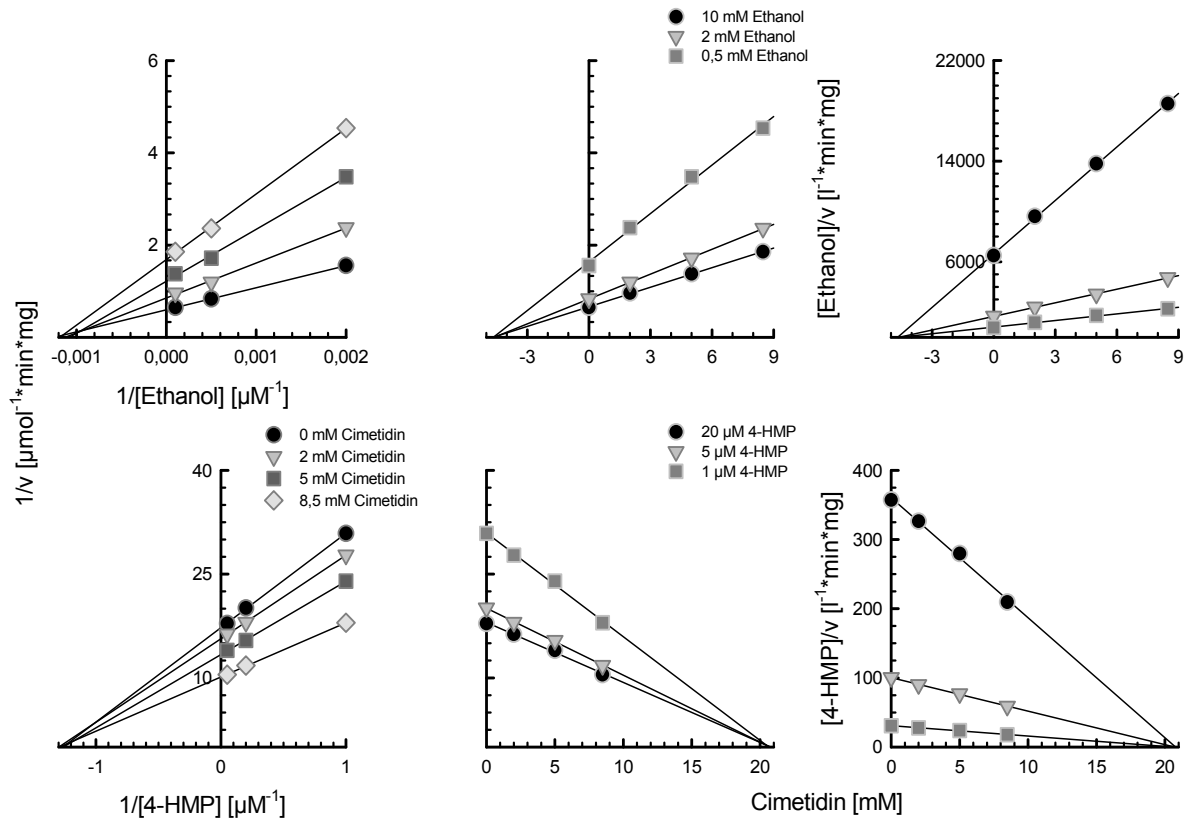


Abb. 40: Effekt von Cimetidin auf die hADH1C-katalysierte Oxidation von Ethanol (oben) und 4-HMP (unten). Die Lineweaver-Burk-Plots (links) zeigen das nichtkompetitive Inhibitionsmuster der Ethanoloxidation und den antiparallelen Effect (Aktivierung) für die Oxidation von 4-HMP. Die Daten sind auch nach den graphischen Methoden von Dixon (1953) (Mitte) und Cornish-Bowden (1974) (rechts) dargestellt. Diese Auftragungen liefern Abschätzungen für die apparenten K_i - bzw. K_i' -Werte, im Falle der Inhibition. Im Falle der Aktivierung, liefern die Schnittpunkte im rechten Quadranten Schätzungen für die apparenten Aktivierungskonstanten K_a bzw. K_a' .

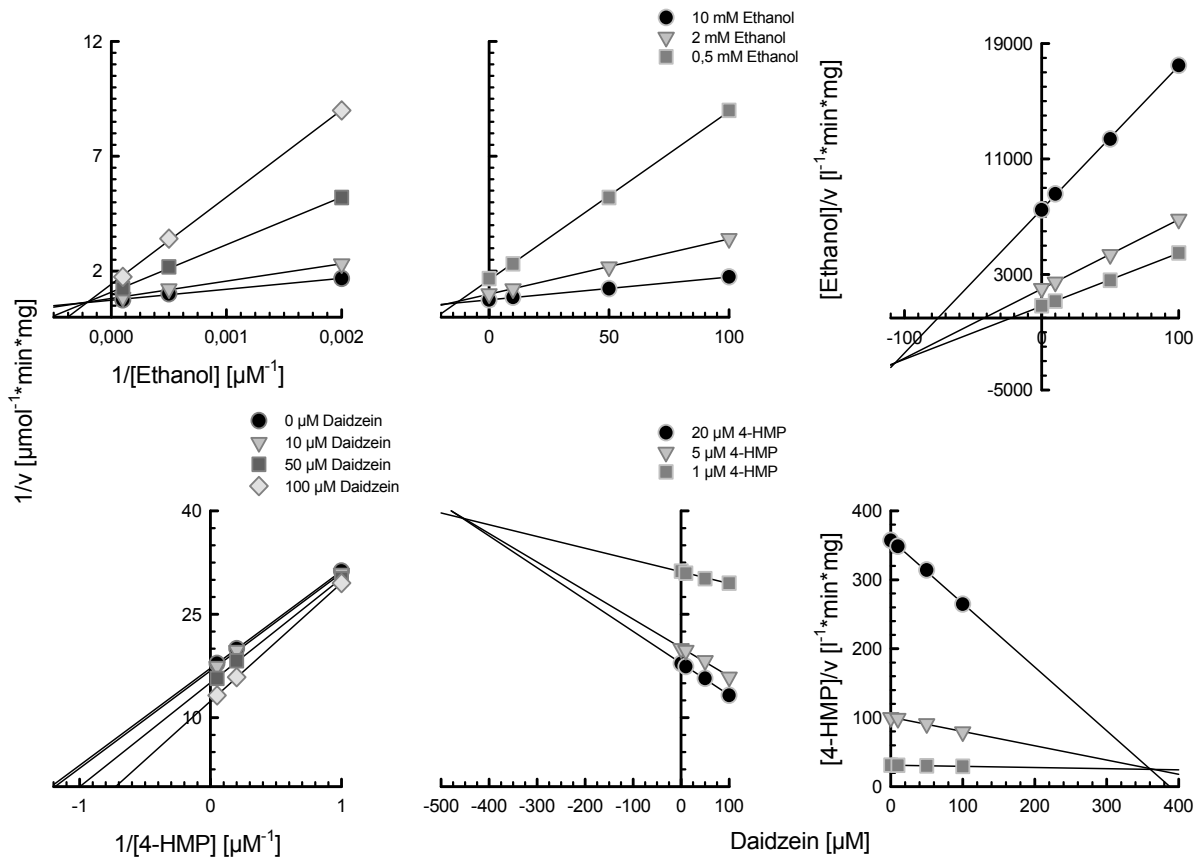


Abb. 41: Effekt von Daidzein auf die hADH1C-katalysierte Oxidation von Ethanol (oben) und 4-HMP (unten). Die Lineweaver-Burk-Plots (links) zeigen das gemischte Inhibitionsmuster der Ethanoloxidation und die Aktivierung mit kompetitiven Inhibitionsanteil für die Oxidation von 4-HMP. Die Daten sind auch nach den graphischen Methoden von Dixon (1953) (Mitte) und Cornish-Bowden (1974) (rechts) dargestellt. Diese Auftragungen liefern Abschätzungen für die apparenten K_i - bzw. K_i' -Werte, im Falle der Inhibition. Im Falle der Aktivierung, liefern die Schnittpunkte im rechten Quadranten Schätzungen für die apparenten Aktivierungskonstanten K_a bzw. K_a' .

Tabelle 19: Inhibition der hADH-katalysierten Alkoholoxidation durch verschiedene Chemikalien. Die apparenten Inhibitiorkonstanten wurden mit den graphischen Methoden nach Dixon (1953) (K_i) bzw. nach Cornish-Bowden (1974) ermittelt (K_i'). Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von drei Bestimmungen. Sofern nicht anders vermerkt waren die Inhibitionen kompetitiv.

Enzym	Substrat	apparenter K_i [μ M] und/oder K_i' [μ M]				
		4-Methylpyrazol	Cimetidin	Daidzein	Pentachlorphenol	Ethanol
ADH2	1-HMP	480 \pm 40	4400 \pm 400	58 \pm 2	-	38000 \pm 2000
	2-HMP	770 \pm 50	-	-	-	-
	4-HMP	460 \pm 30	-	-	-	-
	1-HM-8-MP	240 \pm 20	-	-	-	(K_i) 12200 \pm 700 ^a (K_i') 55000 \pm 11000
	Ethanol	170 \pm 20	900 \pm 200	51 \pm 2	1,84 \pm 0,07	
ADH4	2-HMP	96 \pm 6	13900 \pm 200	44 \pm 1	-	-
	Ethanol	10 \pm 3	1072,0 \pm 0,5	4,1 \pm 0,1	81 \pm 2	
ADH3	2-HMP	22600 \pm 300	4100 \pm 100 ^b	71,6 \pm 0,2	-	-
	4-HMP	-	8600 \pm 400 ^b	-	-	-
	1-Octanol	7600 \pm 300	3500 \pm 100 ^b	41 \pm 2	(K_i) 1,2 \pm 0,2 ^a (K_i') 5,7 \pm 0,1	-
ADH1C	4-HMP	4,6 \pm 1,1	^d	461 \pm 13 ^d	-	-
	Ethanol	0,24 \pm 0,08	4600 \pm 200 ^b	(K_i) 15 \pm 3 ^a (K_i') 106 \pm 1	310 \pm 9 ^c	

^a gemischte, ^b nichtkompetitive, ^c unkompetitive Inhibition, ^d + Aktivierung (Erhöhung von V_{max}); -, nicht bestimmt.

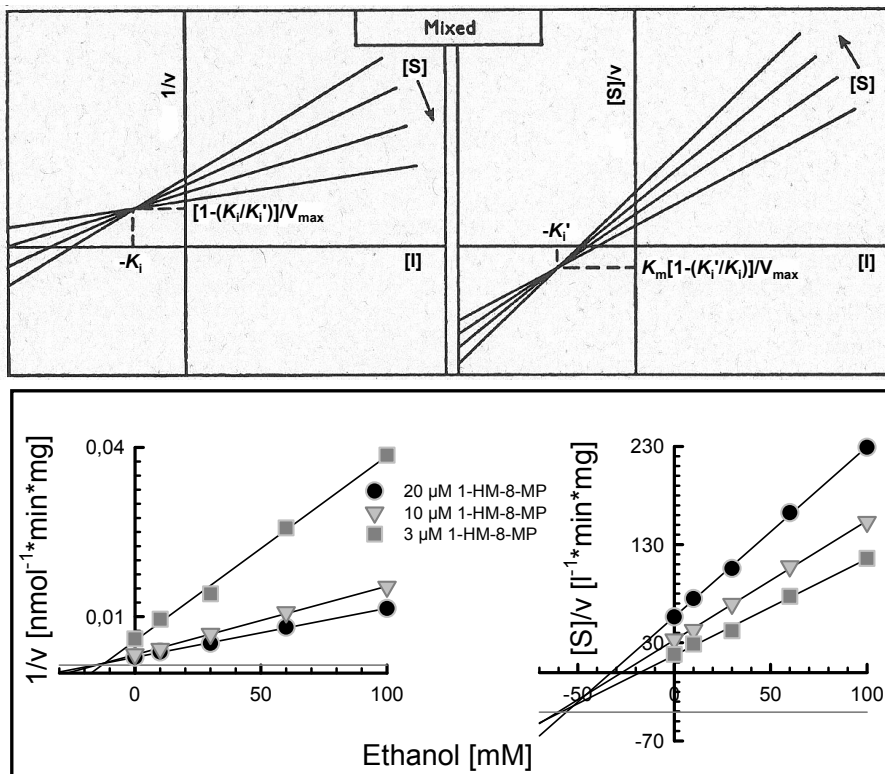


Abb. 42: Inhibition der hADH2-katalysierten Oxidation von 1-HM-8-MP durch Ethanol. Darstellung der Daten nach den graphischen Methoden von Dixon (1953) (links) und Cornish-Bowden (1974) (rechts). Oben ist das theoretische Ergebnis dieser Auftragungen für die gemischte Inhibition, aus

Cornish-Bowden (1974), darstellt. Die grauen Referenzlinien (unten) entsprechen den Ordinatenwerten, die auf der Höhe des Schnittpunkts der Regressionsgeraden liegen sollten. Berechnet wurden diese Werte mit den experimentell bestimmten Parametern (siehe Tabellen 15 und 19).

3.6 Humane ADH im HMF-Metabolismus

Zytosole hADH-exprimierender *S. typhimurium* als Enzymquelle nutzend wurde die Oxidation von HMF und HMFA spektrophotometrisch untersucht (Abschnitt 2.4.4) (Abb. 43). Im Vergleich zur Kontrolle (Zytosol nicht transformierter *S. typhimurium*) zeigten ADH2, 3 und 4 eine deutlich höhere Aktivität gegenüber HMF und ADH1C, 2 und 4 gegenüber HMFA. Diese Ergebnisse zusammen mit den Ergebnissen zur Oxidation von alk-PAK-Alkoholen (Abschnitt 3.5) führten zu dem Entschluss, eben jene hADH für detaillierte kinetische Untersuchungen aufzureinigen (Abschnitte 2.6 und 3.4).

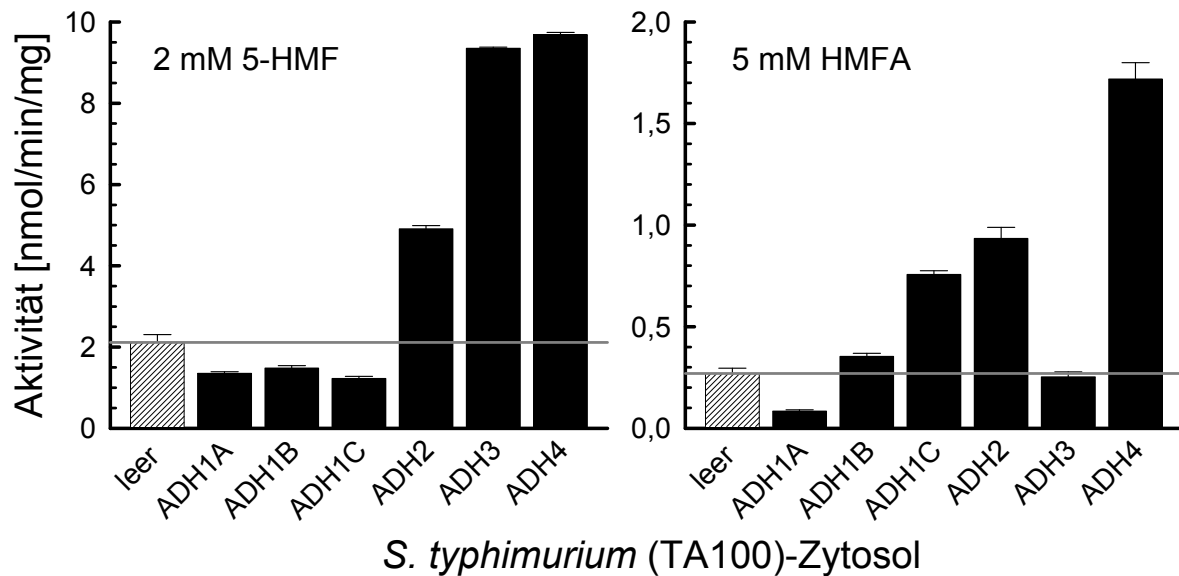


Abb. 43: Oxidation von HMF und HMFA durch humane ADHs exprimiert in *S. typhimurium* TA100. Zytosolisches Protein (200 µg), 2 mM HMF bzw. 5 mM HMFA und NAD (2,5 mM) wurden in Glycin/NaOH-Puffer (0,1 M, pH 10) inkubiert. Die Absorptionsänderung bei 340 nm (NADH-Bildung) wurde dokumentiert. Als Kontrolle (leer) diente ein Zytosol nichttransformierter TA100.

3.6.1 Kinetische Analysen mit den partiell gereinigten Enzymen

Mit den partiell gereinigten humanen Enzymen wurde spektrophotometrisch die Kinetik der ADH-katalysierten Oxidation von HMF und HMFA sowie die Reduktion von HMF (Abschnitt 2.7) untersucht. Die kinetischen Parameter wurden mittels nichtlinearer Regression ermittelt (Tabelle 20). Alle untersuchten ADH oxidierten sowohl HMF als auch HMFA. HMFA wurde jedoch nur mit niedriger Effizienz umgesetzt. ADH4, 2 und 3 erwiesen sich, in dieser Reihenfolge, als die Formen, die HMF am effizientesten oxidierten. ADH4 und 2 katalysierten jedoch ebenfalls sehr effizient die Reduktion von HMF mit katalytischen Effizienzen, die ca. 26 bzw. 50fach höher waren als für die Oxidation.

Tabelle 20: Kinetische Parameter (\pm SE) der hADH-katalysierten Oxidation von HMF und HMFA sowie der Reduktion von HMF. Zum Vergleich sind die entsprechenden Parameter für die Referenzsubstrate Ethanol und Acetaldehyd bzw. 1-Octanol und Octanal angegeben. Die Oxidationsreaktion erfolgte in 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer (pH 10) mit 2,5 mM NAD und die Reduktionsreaktion in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,5) mit 0,5 mM NADH.

Substrat	ADH1C			ADH2			ADH3			ADH4		
	V_{\max}^a	K_m^b	V_{\max}/K_m^c	V_{\max}^a	K_m^b	V_{\max}/K_m^c	V_{\max}^a	K_m^b	V_{\max}/K_m^c	V_{\max}^a	K_m^b	V_{\max}/K_m^c
HMF	2,28 \pm 0,08	45 \pm 4	0,05	0,279 \pm 0,004	0,30 \pm 0,02	0,9	1,10 \pm 0,02	2,1 \pm 0,2	0,5	2,14 \pm 0,05	0,73 \pm 0,4	3
HMFA	0,105 \pm 0,004	5,2 \pm 0,6	0,02	0,0644 \pm 0,0007	2,7 \pm 0,2	0,024	0,051 \pm 0,001	23,0 \pm 0,8	0,002	0,51 \pm 0,03	20 \pm 3	0,026
Ethanol	1,65 \pm 0,02	0,77 \pm 0,04	2	1,35 \pm 0,08	33 \pm 4	0,04	-	-	-	15,57 \pm 0,09	3,6 \pm 0,2	4
^d 1-Octanol	-	-	-	-	-	-	2,8 \pm 0,2	0,39 \pm 0,04	7	-	-	-
HMF	-	-	-	4,09 \pm 0,05	0,095 \pm 0,005	43	10,3 \pm 0,3	33 \pm 2	0,3	61 \pm 2	0,77 \pm 0,03	79
Acetaldehyd	13,5 \pm 0,3	0,34 \pm 0,04	40	4,4 \pm 0,3	26 \pm 4	0,2	-	-	-	100 \pm 2	12,7 \pm 0,7	8
Octanal	-	-	-	-	-	-	9,6 \pm 0,4	1,9 \pm 0,2	5	-	-	-

Einheiten: ^a μ mol/min/mg, ^b mM, ^c ml/min/mg.

^d ADH3 zeigte für 1-Octanol eine deutlich sigmoidale Kinetik ($h = 1,6 \pm 0,2$).

-, nicht bestimmt.

3.7 Humane ALDH im Metabolismus von alk-PAK und von HMF

Mit den in *S. typhimurium* exprimierten hALDH2 und 3A1 (Abschnitt 2.8) wurden enzymkinetische Analysen mit den Substraten 1-, 2-, 4-FP, 1-F-6-MP und 1-F-8-MP sowie HMF durchgeführt. Darüber hinaus erfolgten diese Analysen auch mit ausgewählten Referenzsubstraten (Abschnitt 2.8.2). Die Ermittlung der kinetischen Parameter geschah mit nichtlinearer Regression (Tabelle 21).

Da die Pyrenaldehyde in DMSO gelöst wurden und die entsprechenden Reaktionsansätze 10 % (v/v) DMSO enthielten, wurde der mögliche Effekt von DMSO auf die Aktivität der hALDH2 und 3 untersucht. DMSO zeigte eine nichtkompetitive Inhibition ($K_i \approx 5\%$ [v/v]) der ALDH2 sowie eine sehr schwache kompetitive Inhibition ($K_i \approx 28\%$ [v/v]) der ALDH3A1 (Abb. 44).

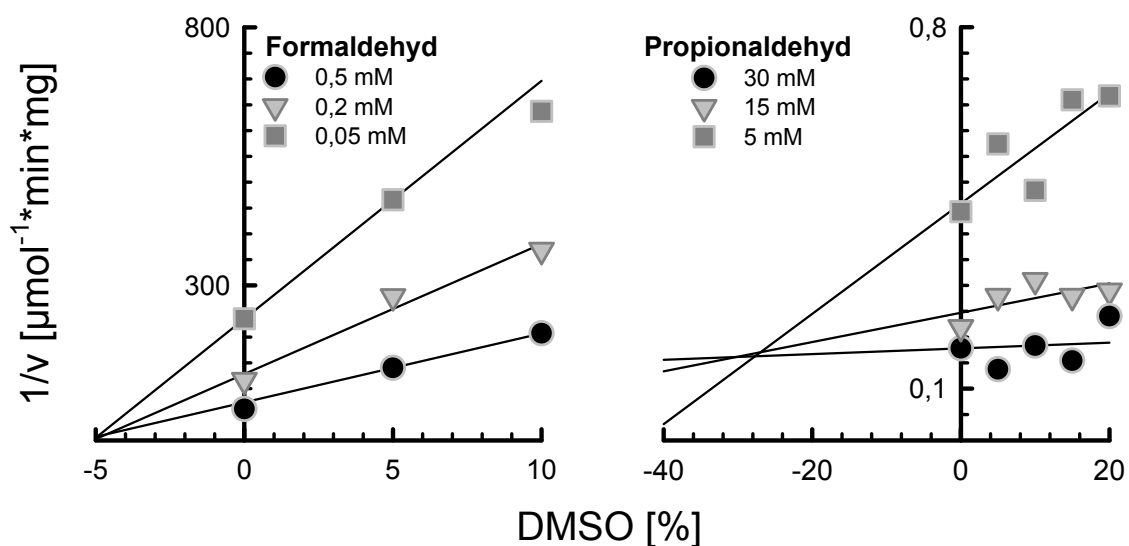


Abb. 44: Einfluss von DMSO auf die katalytische Aktivität von hALDH2 und 3A1. Die als Dixon-Plot dargestellten Daten zeigen die nichtkompetitive Inhibition von hALDH2 (linke Seite) und die kompetitive Inhibition von hALDH3A1 (rechte Seite). Die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation der angegebenen Substrate wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in Gegenwart verschiedener DMSO-Konzentrationen spektrophotometrisch bei 340 nm (Bildung von NADH) bestimmt. Abbildung übernommen aus Rost (2007).

Tabelle 21: Kinetische Parameter (\pm SE) der hALDH-katalysierten Oxidation von Pyrenaldehyden, ausgewählten Referenzsubstraten und HMF für ALDH3A1 ^a und ALDH2 ^b. Die Reaktionen erfolgten in 0,1 M Natriumpyrophosphatpuffer pH 9,5 (ALDH2) oder 8,5 (ALDH3A1) mit 0,6 mM NAD. ^c

Substrat	ALDH2			ALDH3A1		
	V_{\max} [nmol/min/mg]	K_m [μ M]	V_{\max}/K_m [ml/min/mg]	V_{\max} [nmol/min/mg]	K_m [μ M]	V_{\max}/K_m [ml/min/mg]
1-FP	93 \pm 2	0,90 \pm 0,09	103	330 \pm 20	4,0 \pm 0,8	83
2-FP	420 \pm 20	0,38 \pm 0,08	1105	3800 \pm 200	11 \pm 2	345
4-FP	198 \pm 3	0,040 \pm 0,003	4950	11,9 \pm 0,3	0,78 \pm 0,05	15
1-F-6-MP	200 \pm 10	0,15 \pm 0,05	1330	7,4 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	5
1-F-8-MP	246 \pm 5	0,027 \pm 0,005	9100	83 \pm 8	4 \pm 1	21
Acetaldehyd	4000 \pm 50	0,48 \pm 0,03	8300	58000 \pm 4000	80000 \pm 20000	0,7
Propionaldehyd	-	-	-	106000 \pm 7000	12000 \pm 2000	9
Formaldehyd	6000 \pm 500	420 \pm 80	14	-	-	-
HMF	7000 \pm 500	3200 \pm 500	2	19700 \pm 800	1300 \pm 200	15

^a zytosolisches Protein rekombinanter *S. typhimurium* TA100 diente als Enzymquelle (Anteil von ALDH3A1 \approx 5 %). Als Negativkontrolle wurde die Aktivität gegenüber jedem Substrat mit Zytosol nichttransformierter TA100 bestimmt. Aktivität war nicht messbar bzw. deutlich $<$ 10 % der Aktivität mit dem TA100-3A1-Zytosol.

^b partiell gereinigt (DEAE-Anionenaustauschchromatographie) aus rekombinanten TA100. Expression von ALDH2 war niedrig (\approx 0,6 %), mehr Protein musste verwendet werden, und für einige Substrate war die Aktivität mit Zytosol nichttransformierter TA100 $>$ 10 % der Aktivität mit dem TA100-ALDH2-Zytosol. Durch die Reinigung wurde das ALDH2-Protein auf bis zu 2,5 % angereichert und von bakterieller ALDH-Aktivität separiert.

^c Daten zusammengefasst aus Rost (2007).

-, nicht bestimmt.

4. Diskussion

4.1 Humane ADH und ALDH im Metabolismus von alk-PAK

4.1.1 ADH

Untersuchungen zur ADH-katalysierten Oxidation benzyllischer Alkohole alkylierter PAK zeigten, dass primäre Pyrenylmethanole gute Substrate für wenigstens eine humane ADH-Form (ADH2) sind (Abschnitt 3.5). Sekundäre Alkohole und Alkohole von alk-PAK mit größerem Kohlenstoffgrundgerüst wurden durch hADH nicht nennenswert umgesetzt (Aktivität \leq Kontrolle). Sterische Hinderung könnte eine Ursache dafür sein, dass die Alkohole großer alk-PAK schlecht umgesetzt wurden.

Für detaillierte enzymkinetische Studien wurden die hADH2, 3, 4 (hohe Aktivität gegenüber wenigstens einem Pyrenylmethanol) und 1C (repräsentativ für die ADH1-Subfamilie, zudem Aktivität gegenüber 1-HMP und 1-HM-8-MP etwas höher als Kontrolle) aufgereinigt (Abschnitte 2.6 und 3.4). Alle vier untersuchten hADH waren in der Lage, sowohl die als Substrat untersuchten Pyrenylmethanole (1-, 2-, 4-HMP, 1-HM-6-MP und 1-HM-8-MP) zu oxidieren als auch die korrespondierenden Aldehyde zu reduzieren (Abschnitt 3.5.1 einschließlich Unterpunkten). Für nahezu alle Substrate wies ADH2 die höchsten V_{\max} -Werte auf. Lediglich 2-HMP wurde durch ADH3 mit ähnlich hoher und durch ADH4 mit etwa doppelt so hoher Maximalgeschwindigkeit oxidiert. Ansonsten wiesen ADH4 und auch ADH1C eher niedrige bis moderate Maximalgeschwindigkeiten auf. ADH3 zeigte für alle Substrate, ausgenommen 2-HMP und 2-FP, nur niedrige Maximalgeschwindigkeiten. Die K_m -Werte reichten von $\ll 1 \mu\text{M}$ bis ca. $100 \mu\text{M}$. Bemerkenswert ist noch, dass die katalytischen Effizienzen für die Oxidation und Reduktion der Pyrenderivate teilweise deutlich (z.B. ADH2, ca. 10000fach für Oxidation von 2-HMP, ca. 50000fach für Reduktion von 1-F-8-MP) höher sind als für die Referenzsubstrate. Eine Ausnahme ist hier lediglich ADH3.

Zu beachten ist auch der Einfluss von DMSO. In den bei den Messungen verwendeten Konzentrationen ist es ein starker Inhibitor von ADH1C, 2 und 4. Der Einfluss auf ADH3 ist dagegen vernachlässigbar. Da DMSO die Oxidation von Alkoholen unkompetitiv hemmt, sind die entsprechenden Werte für die katalytische Effizienz als real anzusehen. Die

wirklichen V_{\max} -Werte für die durch ADH1C, 2 und 4 katalysierte Pyrenylmethanoloxidation dürften um einiges höher sein als die bestimmten. Entsprechend sind jedoch auch die realen K_m -Werte höher. Die Inhibition der Reduktion war für ADH1C und 2 gemischt und für ADH4 nichtkompetitiv. Das heißt, dass die bestimmten V_{\max} -Werte niedriger als die realen sind, für ADH1C und 2 sind zudem auch die bestimmten K_m -Werte höher als die realen. In jedem Fall sind somit die für die Reduktion der Pyrenaldehyde bestimmten katalytischen Effizienzen klar niedriger als die wirklichen Werte.

Dies ist vor allem beim Vergleich der katalytischen Effizienzen für die Oxidation und die Reduktion zu beachten. Die bestimmten Werte waren bei der ADH2 für die Reduktion etwa gleich bis 3fach höher als für die Oxidation. Eine Ausnahme war die Reduktion von 1-F-8-MP, die ca. 12fach effizienter katalysiert wurde als die Oxidation von 1-HM-8-MP. Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen inhibitorischen Effekts von DMSO auf die ADH2-katalysierte Oxidations- und Reduktionreaktion lässt sich jedoch klar sagen, dass die Reduktion der Pyrenaldehyde in jedem Fall effizienter katalysiert wird als die Oxidation der Pyrenylmethanole. Gleiches gilt für die ADH1C und 4. Dies macht deutlich, dass für eine effiziente Oxidation von Pyrenylmethanolen *in vivo* eine schnelle Eliminierung der Pyrenaldehyde aus dem Gleichgewicht durch Weiteroxidation zur Carbonsäure katalysiert durch ALDH nötig sein dürfte (siehe dazu Abschnitt 4.1.2). Diese These wird auch dadurch untermauert, dass Disulfiram, ein irreversibler ALDH-Inhibitor (Johansson, 1992), in der Ratte zu einer gesteigerten Bioaktivierung von 1-HMP führt. Zudem waren Pyrenyl-1-carbonsäure und Konjugate dieser Carbonsäure die Hauptmetaboliten nach 1-HMP-Gabe (Ma *et al.*, 2002).

Die vorliegenden Daten legen nahe, dass in erster Linie hADH2 von Bedeutung für die Detoxifizierung von Pyrenylmethanolen ist, ein Enzym, das in der Leber hoch exprimiert ist (Edenberg & Bosron, 1997; Li *et al.*, 1977; Nishimura & Naito, 2006). Doch auch hADH1C und 4 sind durchaus in der Lage, Pyrenylmethanole effizient zu oxidieren. ADH1C wird am höchsten ebenfalls in der Leber exprimiert (Edenberg & Bosron, 1997; Nishimura & Naito, 2006), daneben jedoch auch in Magen- und Darmmukosa (Parés & Farrés, 1996). ADH4 kommt nicht in der Leber vor, ist jedoch hoch exprimiert in den Schleimhäuten von Mund (Dong *et al.*, 1996), Ösophagus (Parés & Farrés, 1996; Yin *et al.*, 1993a) und Magen (Moreno & Parés, 1991; Parés & Farrés, 1996), auf mRNA-Ebene ist auch Expression in der Luftröhre beschrieben (Nishimura & Naito, 2006). Dies verdeutlicht, dass die Oxidation (Detoxifizierung) von Pyrenylmethanolen auch extrahepatisch erfolgen kann. Die ubiquitär

exprimierte hADH3 dürfte aufgrund der niedrigen V_{\max} -Werte (Ausnahme 2-HMP) für die Detoxifizierung von Pyrenylmethanolen eher von untergeordneter Bedeutung sein.

Die Oxidation von Pyrenylmethanolen durch hADH2, 3 und 4 wurde durch die als ADH-Inhibitoren bekannten Verbindungen 4-Methylpyrazol (auch ADH1C), Daidzein und Cimetidin gehemmt. Cimetidin und Daidzein zeigten interessanterweise einen aktivierenden Einfluss (Erhöhung von V_{\max}) auf die ADH1C-katalysierte Oxidation von 4-HMP. 4-Methylpyrazol findet klinisch Verwendung zur Behandlung von Methanol- (Brent *et al.*, 2001) und Ethylenglycolvergiftungen (Borron *et al.*, 1999; Brent *et al.*, 1999). Der H_2 -Rezeptorantagonist Cimetidin wird zur Therapie von Magengeschwüren eingesetzt und das Isoflavon Daidzein kommt in hoher Menge z.B. in Soja vor. Ethanol selbst (als konkurrierendes Substrat) hatte ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die hADH2-katalysierte Oxidation von Pyrenylmethanolen. Die Oxidation von 1-HMP wurde erwartungsgemäß kompetitiv gehemmt, die Inhibition der Oxidation von 1-HM-8-MP war jedoch interessanterweise gemischt. Die apparenten K_i -Werte von 38 mM bzw. 12,2 mM ($K_i' = 55$ mM) machen deutlich, dass Ethanol die ADH2-katalysierte Oxidation von Pyrenylmethanolen bei physiologisch erreichbaren Konzentrationen effektiv hemmt (30 mM entsprechen ca. 1,4 ‰). Darüber hinaus ist anzumerken, dass die geschätzte tägliche Aufnahme von PAK für den Menschen bei nur wenigen μg liegt (de Vos *et al.*, 1990; Dennis *et al.*, 1983; Phillips, 1999). Die Schlussfolgerung daraus ist, dass die erreichbaren Konzentrationen von Pyrenylmethanolen im menschlichen Körper klar unterhalb der K_m -Werte ihrer ADH-katalysierten Oxidation liegen. Kompetitive und gemischte Inhibitoren sind gegenüber solch niedrigen Substratkonzentrationen jedoch deutlich effektiver. Das gilt natürlich gerade auch für Ethanol, der bereits gegenüber Pyrenylmethanolkonzentrationen, die optimal sind für die ADH-katalysierte Oxidation, eine effektive Inhibition bei physiologisch erreichbaren Konzentrationen zeigt. Es ist somit naheliegend, die Koexposition von Ethanol mit Methylpyrenen als einen wesentlichen Risikofaktor im Hinblick auf die Bioaktivierung der Methylpyrene und in der Endkonsequenz der Methylpyren-induzierten Kanzerogenese anzusehen.

4.1.2 ALDH

Wie im vorhergehenden Abschnitt dargestellt, ist von einer wesentlichen Bedeutung von ALDH für die effiziente Oxidation von Pyrenylmethanolen auszugehen. In der Tat zeigte sich, dass die untersuchten hALDH2 und 3A1 fähig sind, Pyrenaldehyde effizient zu

oxidieren (Abschnitt 3.7, Tabelle 21) (Rost, 2007). Insbesondere hALDH2 oxidierte alle untersuchten Pyrenaldehyde mit hoher bis sehr hoher katalytischer Effizienz. Die V_{\max}/K_m -Werte für die ALDH2-katalysierte Oxidation der Pyrenaldehyde waren nicht nur deutlich höher als die entsprechenden Werte der ADH-katalysierten Oxidation der Pyrenylmethanole, sondern vor allem auch der ADH-katalysierten Reduktion der Pyrenaldehyde (3-100fach). Dieses Enzym ist somit in der Lage, die Pyrenaldehyde effizient aus dem Gleichgewicht der ADH-Reaktion zu entfernen, was eine wesentliche Bedeutung der hALDH2 für die Detoxifizierung von Methylpyrenen wahrscheinlich macht. Da hALDH2 auch die ALDH mit der größten Bedeutung für den Ethanolabbau ist (Vasiliou *et al.*, 2000), unterstreicht die Involvierung dieses Enzyms in den oxidativen Metabolismus von Methylpyrenen auch die Bedeutung der Koexposition von Ethanol mit Methylpyrenen als Risikofaktor für die Methylpyren-induzierte Kanzerogenese. Nicht nur, dass Ethanol als konkurrierendes Substrat die ADH-katalysierte Pyrenylmethanoxidation hemmt, auch der durch Ethanoloxidation entstehende Acetaldehyd dürfte sicherlich die ALDH2-katalysierte Oxidation der Pyrenaldehyde inhibieren. Den bei Asiaten zu inaktiven ALDH2-Protein führenden, häufigen Polymorphismus der ALDH2 (Glu⁴⁸⁷Lys) (Yoshida *et al.*, 1985) muss man aufgrund dieser Ergebnisse ebenfalls als Risikofaktor für Methylpyren-induzierte Kanzerogenese ansehen.

Die offenbare Bedeutung der ALDH2 für den oxidativen Metabolismus von Methylpyrenen deckt sich auch mit der Beobachtung, dass Disulfiram die Bioaktivierung von 1-HMP in der Ratte steigert (Ma *et al.*, 2002). Der Effekt von Disulfiram war zwar bei weitem nicht so groß wie der der in dieser Studie ebenfalls getesteten Modulatoren 4-Methylpyrazol und Ethanol, doch dies lässt sich gut erklären. Zum einen erfolgten diese Untersuchungen in der Ratte, und die ALDH der Ratte könnten sich durchaus in ihrer Substratspezifität von den humanen deutlich unterscheiden. Zum anderen ist ALDH2 nicht die einzige ALDH, die Pyrenaldehyde effizient oxidieren kann, wie Ergebnisse mit hALDH3A1 zeigen. Gerade für die Oxidation von 1-FP, dem Aldehyd des 1-HMP, hat hALDH3A1 eine der hALDH2 vergleichbare katalytische Effizienz. Im Gegensatz zur ALDH2 ist ALDH3A1 weniger sensitiv gegenüber Disulfiram (Vasiliou & Marselos, 1989; Yin *et al.*, 1993b). Dennoch ist anzunehmen, dass die Bedeutung von hALDH3A1 für die Detoxifizierung von Methylpyrenen deutlich geringer ist als die von hALDH2. Von den analysierten Pyrenaldehyden wurden lediglich 1- und 2-FP effizient oxidiert. Nichtsdestotrotz, ALDH3A1 wird Ah-Rezeptor-vermittelt auch durch PAK induziert, was sowohl für die Ratte (*in vivo* und *in vitro*) (Deitrich *et al.*, 1978; Törrönen *et al.*, 1981) als auch für den Menschen (*in vitro*) (Marselos *et al.*, 1986) gezeigt wurde.

Methylpyrene liegen praktisch immer im Gemisch mit anderen PAK (darunter auch Ah-Rezeptor-Liganden) vor. Dies legt nahe, dass bei Exposition des Menschen gegenüber solchen Substanzen ALDH3A1 induziert wird. Diese Induktion dürfte zumindest für einige alk-PAK (z.B. 1-Methylpyren) das Detoxifizierungspotential erhöhen. Es besteht auch durchaus die Möglichkeit, dass noch weitere hALDH in den Methylpyren-Metabolismus involviert sind. Als Kandidaten kämen vor allem solche Formen in Frage, die im endogenen Stoffwechsel keine wichtigen spezifischen Funktionen besitzen (z.B. 1A1, 1B1 und 9A1) (siehe dazu Abschnitt 1.1.2, Tabelle 6).

Die höchste Expression von hALDH2 ist in der Leber und in der Niere zu finden, aber auch in vielen anderen Geweben, darunter Magen und Darm, ist das Enzym zu finden (Parés & Farrés, 1996; Sládek, 2003). Dagegen wird hALDH3A1 konstitutiv nicht in der Leber exprimiert, findet sich aber im gesamten oberen Verdauungstrakt von der Mundhöhle (Dong *et al.*, 1996) über den Ösophagus bis zum Magen (Parés & Farrés, 1996) sowie in einer Vielzahl weiterer Gewebe (Sládek, 2003). Daraus ist zu folgern, wie bereits im vorhergehenden Abschnitt angesprochen, dass eine Detoxifizierung von Methylpyrenen auch extrahepatisch erfolgen kann.

4.2 Pentachlorphenol, ein neu erkannter potenter ADH-Inhibitor

Pentachlorphenol ist ein bekannter SULT-Inhibitor (Meerman *et al.*, 1983). Für diesen Zweck wurde die Substanz in unserem Labor auch in einem Tierversuch zum Metabolismus von 1-HMP und von 1-HM-8-MP eingesetzt. Erwartet wurde durch die Hemmung der Sulfokonjugation eine Reduktion der Bioaktivierung der Substanzen, was auch der Fall war (Donath, unveröffentlichte Daten). Der ADH- und ALDH-vermittelte oxidative Metabolismus, der ohnehin den Hauptweg darstellt (Ma *et al.*, 2002), sollte somit noch leicht verstärkt sein. Tatsächlich jedoch zeigte sich bei Koexposition der Ratten gegen 1-HMP und Pentachlorphenol eine hochsignifikante Reduktion der Ausscheidung von Pyrenyl-1-carbonsäure und deren Derivate (Batke, unveröffentlichte Daten). Dieses unerwartete Ergebnis legt nahe, dass Pentachlorphenol in der Lage ist, ADH und/oder ALDH effektiv zu inhibieren.

Tatsächlich inhibiert Pentachlorphenol alle in dieser Arbeit näher untersuchten humanen ADH (1C, 2, 3 und 4) (Abschnitt 3.5.2, Tabelle 19). Die unkompetitive Hemmung der hADH1C sowie die kompetitive Hemmung der hADH3 war vergleichsweise moderat. Pentachlorphenol erwies sich jedoch als hochpotenter Inhibitor der hADH2 (kompetitiv) und

3 (gemischt). Ein inhibitorischer Einfluss von Pentachlorphenol auf hALDH2 und 3A1 wurde nicht festgestellt. Beim Menschen ist ADH2 offenbar die ADH-Form mit der größten Bedeutung für die Oxidation von Pyrenylmethanolen. Nun lassen sich die Ergebnisse mit den humanen Enzymen natürlich nicht einfach auf die Situation in Ratten übertragen, dennoch die kompetitive Inhibition der ADH-katalysierten Pyrenylmethanoloxidation durch Pentachlorphenol ist die wahrscheinlichste Erklärung für die Ergebnisse des Tierversuchs. Auch dass die Pentachlorphenol-abhängige Reduktion der Carbonsäureausscheidung beim 1-HM-8-MP nicht festgestellt wurde, lässt sich mit dem Modell der kompetitiven ADH-Inhibition erklären. Die humane ADH2 besitzt einen ca. 12fach niedrigeren K_m -Wert für 1-HM-8-MP als für 1-HMP. Geht man nun davon aus, dass die Verhältnisse in der Ratte ähnlich liegen, bedeutet dies, dass bei den im Tierversuch eingesetzten Pyrenylmethanolkonzentrationen die 1-HM-8-MP-Konzentration im Sättigungsbereich und die 1-HMP-Konzentration noch unterhalb des K_m der ADH gelegen haben. Als kompetitiver ADH-Inhibitor wäre Pentachlorphenol natürlich gegenüber sättigenden Substratkonzentrationen weniger effektiv als gegenüber Substratkonzentrationen unterhalb des K_m .

4.3 Humane ADH und ALDH im Metabolismus von HMF

4.3.1 ADH

Aufgrund der im menschlichen Urin nachgewiesenen HMF-Metaboliten HMFA, HMFG und FDCA (Jellum *et al.*, 1973; Pettersen & Jellum, 1972) kann es als wahrscheinlich angesehen werden, dass ADH und ALDH von wesentlicher Bedeutung im HMF-Metabolismus sind. Die beteiligten Enzyme sind bisher jedoch unbekannt. Es konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass die Oxidation von HMF zum 2,5-Diformylfuran, dem ersten Schritt einer der beiden möglichen Wege zur Bildung von FDCA (siehe dazu Abschnitt 4.5, Abb. 43), relativ effizient durch die hADH4, 2 und 3 katalysiert wird. Die katalytischen Effizienzen waren ca. 2,4fach (ADH3), 4fach (ADH2) und 14fach (ADH4) höher als für die Sulfokonjugation von HMF durch die hSULT1A1, der humanen SULT mit der höchsten Aktivität und Affinität für HMF (siehe Abschnitt 4.3.2, Tabelle 22) (Sommer, 2006). Dabei hat ADH3 einen vergleichbaren K_m für HMF wie die SULT1A1, während die K_m -Werte von ADH2 und 4 ca. 8fach bzw. 3,4fach niedriger sind. Dies macht deutlich, dass die ADH-katalysierte Oxidation von HMF im Vergleich zur Bioaktivierung durch SULT klar bevorzugt sein dürfte. Daraus

lässt sich auch schließen, dass Ethanol bei Koexposition mit HMF als konkurrierendes Substrat zu einer zumindest etwas verstärkten SULT-vermittelten Aktivierung von HMF führen dürfte. Physiologisch erreichbare Ethanolkonzentration dürften auf jeden Fall zu einer Hemmung der HMF-Oxidation durch ADH2 (K_m für Ethanol = 33 mM) und ADH4 (K_m für Ethanol = 3,6 mM) führen. Eine Inhibition der ADH3 ist jedoch nicht zu erwarten ($K_{0,5}$ für Ethanol = 3,4 M) (Lee *et al.*, 2003), so dass immer noch ein nennenswertes Deaktivierungspotential in Konkurrenz zur Sulfokonjugation vorhanden wäre.

Anzumerken ist noch, dass auch die Reduktion von HMF zum 2,5-(Dihydroxymethyl)furan durch hADH2 und hADH4 sehr effizient katalysiert wird. Die katalytischen Effizienzen waren ca. 50fach bzw. 25fach höher als für die Oxidation. Das HMF-Metabolitenspektrum *in vivo* liefert jedoch keinen Anhaltspunkt dafür, dass diese Reaktion im lebenden Menschen tatsächlich stattfindet. Die Folgerung daraus ist, dass das durch die ADH-katalysierte Oxidation entstehende DFF effizient durch ALDH weiter oxidiert wird.

Grundsätzlich ist neben dem bereits angesprochenen Weg zur Bildung von FDCA auch denkbar, dass HMF zunächst durch ALDH zur HMFA oxidiert wird und diese dann durch ADH und nachfolgend ALDH zur FDCA oxidiert wird (siehe dazu Abschnitt 4.5, Abb. 45). Zwar waren alle untersuchten hADH (1C, 2, 3 und 4) in der Lage, HMFA zu oxidieren, doch die katalytischen Effizienzen waren sehr niedrig. Insbesondere die K_m -Werte von ADH3 und 4 waren so hoch, dass eine Beteiligung dieser Enzyme an der Oxidation von HMFA nahezu auszuschließen ist. Sofern die ADH-katalysierte Oxidation von HMFA überhaupt einen Beitrag zur Bildung von FDCA *in vivo* stellt, ist sie wahrscheinlich nur von untergeordneter Bedeutung.

Die im Abschnitt 4.1.1 kurz dargestellte Gewebeverteilung der hADH macht deutlich, dass der oxidative Metabolismus von HMF sowohl in der Leber als auch extrahepatisch effizient erfolgen kann.

4.3.2 ALDH

Wie im vorhergehenden Abschnitt bereits dargelegt, dürften ALDH wesentlich an der Bildung von FDCA aus HMF, nach vorheriger ADH-katalysierter Oxidation des HMF, beteiligt sein. HMFA und ihr Glycinkonjugat HMFG sind weitere Hauptmetaboliten des HMF. Es ist naheliegend, dass ALDH von Bedeutung für die Bildung dieser Metaboliten aus HMF sind (siehe dazu Abschnitt 4.5, Abb. 45). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sowohl hALDH2 als auch hALDH3A1 HMF effizient zu HMFA oxidieren können (Rost,

2007). Insbesondere ALDH3A1 wies eine hohe katalytische Effizienz auf. Die katalytischen Effizienzen der hALDH2- und 3A1-katalysierten HMF-Oxidation waren ca. 10fach bzw. 70fach höher als für die Sulfokonjugation von HMF durch hSULT1A1, wobei die ALDH2 einen leicht höheren K_m für HMF besaß als die SULT1A1, während der K_m der ALDH3A1 für HMF ca. um die Hälfte niedriger war als jener der SULT1A1 (siehe Tabelle 22). Die ALDH-katalysierte Oxidation von HMF ist somit gegenüber der Sulfokonjugation klar bevorteilt. Im Vergleich zur ADH-katalysierten Oxidation von HMF ist die katalytische Effizienz der hALDH2-katalysierten HMF-Oxidation etwa vergleichbar (verglichen mit ADH4) bis 4fach höher (verglichen mit ADH3), jedoch war der K_m für HMF der hALDH2 höher als bei den hADH (bis zu 10fach, verglichen mit ADH2). Die HMF-Oxidation durch hALDH3A1 erfolgte 5fach (verglichen mit ADH4) bis 30fach (verglichen mit ADH3) effizienter als die ADH-katalysierte HMF-Oxidation. Nichtsdestotrotz war der K_m für HMF der ADH2 ca. 4fach niedriger als der von ALDH3A1.

Tabelle 22: HMF als Substrat humaner SULT1A1, ALDH und ADH. Vergleich der kinetischen Parameter der Sulfokonjugation von HMF mit denen der konkurrierenden Oxidation durch ALDH und ADH.

humanes Enzym	V_{\max} [nmol/min/mg]	K_m [mM]	V_{\max}/K_m [ml/min/mg]
¹ SULT1A1	520	2,5	0,21
² ALDH2	7000	3,2	2
² ALDH3A1	19700	1,3	15
ADH2	279	0,3	0,9
ADH3	1100	2,1	0,5
ADH4	2140	0,73	3

¹ übernommen aus Sommer (2006), ² übernommen aus Rost (2007).

Die bereits im Abschnitt 4.1.2 kurz dargestellte Gewebeverteilung von hALDH2 und 3A1, macht deutlich, dass für die ALDH-abhängige Oxidation von HMF zu HMFA gerade auch extrahepatische Gewebe von Bedeutung sein dürften. Es lässt sich auch die Hypothese aufstellen, dass beim hepatischen Metabolismus von HMF die Bildung von FDCA einen höheren Anteil haben dürfte als beim extrahepatischen Metabolismus, wo eher die HMFA- (und HMFG-) Bildung überwiegen sollte.

Im Zusammenhang der Koexposition von Ethanol mit HMF, ist zu sagen, dass die hALDH2-abhängige Oxidation von HMF durch Acetaldehyd inhibiert werden dürfte (K_m für

Acetaldehyd = 0,48 μM), wohingegen die HMF-Oxidation durch hALDH3A1 (K_m für Acetaldehyd = 80 mM) unbeeinflusst bleiben dürfte. Die Schlussfolgerung ist somit (aufgrund der Gewebeverteilung der untersuchten ADH und ALDH), dass Ethanol insbesondere den hepatischen oxidativen Metabolismus von HMF hemmen dürfte, während der Effekt auf den extrahepatischen Metabolismus vergleichsweise gering ausfallen dürfte. Nichtsdestotrotz ist davon auszugehen, dass der hepatische Metabolismus von HMF im Vergleich zum extrahepatischen Metabolismus den wesentlicheren Anteil ausmacht. Eine Inhibition des hepatischen oxidativen HMF-Metabolismus dürfte zu einer gesteigerten SULT1A1-vermittelten Aktivierung von HMF führen, zumal gerade die SULT1A1 in der Leber hoch exprimiert ist (Heroux *et al.*, 1989). Für den Dickdarm als mögliches Zielgewebe von HMF-Gentoxität ist die Situation etwas anders. Von den hADH, die HMF effizient oxidieren können, wird im Darm lediglich ADH3 exprimiert; auch hALDH3A1 ist im Darm nicht konstitutiv exprimiert, dafür aber hALDH2 (Parés & Farrés, 1996), SULT1A1 wird im Dickdarm ebenfalls exprimiert (Sundaram *et al.*, 1989). Es ist somit von einer möglichen Steigerung der Aktivierung von HMF durch Ethanol auszugehen. Insgesamt ist es also naheliegend, die Aufnahme von Ethanol bei Koexposition mit HMF als Risikofaktor für mögliche HMF-induzierte Schäden anzusehen. Die mechanistisch anzunehmende kompetitive Hemmung durch die konkurrierenden Substrate Ethanol (hADH2 und 4) und Acetaldehyd (hALDH2) dürfte zudem auch deshalb recht effizient sein, da die HMF-Konzentrationen im Menschen nach gewöhnlichen Expositionen deutlich unter den K_m -Werten der beteiligten Enzyme liegen. Bei Exposition von 30-150 mg/d (Janowski *et al.*, 2000; Simonyan, 1971) sind unter der Annahme, dass das für die Maus bestimmte HMF-Verteilungsvolumen von 0,45-0,65 l/kg (Abdulmalik *et al.*, 2005) für den Menschen ähnlich ist, HMF-Konzentrationen von 6,2-31 μM in menschlichem Körper erreichbar. Es ist jedoch anzumerken, dass noch weitere hALDH in den HMF-Metabolismus involviert sein könnten. Als Kandidaten kämen vor allem solche Formen in Frage, die im endogenen Stoffwechsel keine wichtigen spezifischen Funktionen besitzen (z.B. 1A1, 1B1 und 9A1) (siehe dazu Abschnitt 1.1.2, Tabelle 6). Darüber hinaus wäre zu klären, ob die Oxidation von HMF zu HMFA durch ALDH tatsächlich als Detoxifizierungsreaktion anzusehen ist. Die HMFA ist weiterhin ein benzyliker Alkohol, der zu einem reaktiven Sulfokonjugat aktiviert werden kann.

4.4 Humane ADH5: Erkenntnisse und offene Fragen

ADH5 ist die bisher am wenigsten untersuchte humane ADH. Die Expression von ADH5 wurde wirklich gesichert bisher nur in der Leber und auch lediglich auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Yasunami *et al.*, 1991; Žgombić-Knight *et al.*, 1995a). Ein ursprünglicher Bericht von hADH5-Expression auch im Magen (Yasunami *et al.*, 1991) konnte in einer späteren Arbeit nicht bestätigt werden (Žgombić-Knight *et al.*, 1995a). Drei Spleißvarianten von hADH5 sind beschrieben (Abschnitt 3.2, Tabelle 11) (Strausberg *et al.*, 2002; Strömberg & Höög, 2000; Yasunami *et al.*, 1991). Für die 8-Exon-Variante hADH5b wurde demonstriert, dass sie prinzipiell ADH-Aktivität besitzt (Chen & Yoshida, 1991). Ansonsten ist über Substratspektrum oder mögliche Funktionen von ADH5 nichts bekannt.

Die Spleißvarianten der hADH5 wurden im Rahmen dieser Arbeit kloniert und heterolog exprimiert. Die Existenz der bislang lediglich durch eine Referenz belegten (Strausberg *et al.*, 2002) 7-Exon-Variante hADH5c wurde zweifelsfrei bestätigt (Abschnitt 2.2.5). Darüber hinaus wurde erstmals die Expression von ADH5 in humaner Leber auf Protein-Ebene gezeigt. Die Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei der exprimierten Form um die 9-Exon-Variante hADH5a handelt (siehe Abschnitt 3.1.1, Abb. 27). Dies wird noch dadurch untermauert, dass eine Amplifikation von hADH5a-cDNA mittels RT-PCR mit guter Ausbeute problemlos war, wohingegen hADH5b-cDNA nur mit der Strategie der „nested“-PCR in ausreichender Menge amplifiziert werden konnte (Abschnitt 2.1.1.3). Die in *E. coli* exprimierten hADH5-Enzyme erwiesen sich jedoch als enzymatisch inaktiv, der überwiegende Anteil (> 90 %) lag in Form von „inclusion bodies“ vor. Eine Transformation von *S. typhimurium* mit hADH5 gelang gar nicht. Eine denkbare Ursache wäre, dass hADH5 eine in den Bakterien vorkommende Verbindung in toxische Metaboliten umwandelt oder eine essentielle Verbindung eliminiert. Für diese These spricht, dass auch die transformierten *E. coli* ein langsames Wachstum zeigten und die Bakterienpellets im Vergleich zu Pellets nichttransformierter bzw. mit anderen hADH transformierter *E. coli* eine „weichere“ Konsistenz aufwiesen. Im Gegensatz zu *S. typhimurium* mag *E. coli* effizienter in der Lage sein, hADH5 zu deaktivieren und somit zu überleben.

In der Hoffnung, im Säugerzellsystem weniger Probleme zu haben, wurde hADH5a in V79-Zellen exprimiert. Zwar ist die heterolog exprimierte hADH5a enzymatisch aktiv, dennoch sind V79-Zellzytosole ohne weitere Behandlung ungeeignet, um als Enzymquelle für Aktivitätsmessungen zu dienen (Abschnitt 3.3.1, Abb. 31). Selbst bei alleiniger Zugabe von Kosubstrat – ohne Substrat – war bei 340 nm eine deutliche Absorptionzunahme messbar.

Das Vorkommen eines endogenen ADH-Substrates als Ursache dieser Beobachtung ist zwar möglich. Als wahrscheinlicher ist jedoch anzusehen, dass unter den gegebenen Assaybedingungen (NAD-Überschuss) eine Umsetzung von im Zytosol vorkommenden Laktat durch Laktatdehydrogenase erfolgt. Laktatdehydrogenasen sind zytosolische Enzyme, die die Oxidation von Laktat zu Pyruvat unter Reduktion von NAD zu NADH katalysieren (Robodoc, 2007). Auch V79-Zellen exprimieren Laktatdehydrogenase (Rodrigues *et al.*, 1995). Will man V79-Zellzytosole als ADH-Enzymquelle nutzen, wäre es somit notwendig, die Zytosole zu dialysieren; ein zumindest partieller Aktivitätsverlust der ADH während dieser Prozedur ist jedoch nicht auszuschließen. Für wirklich aussagekräftige Ergebnisse wäre ohnehin eine Trennung der heterolog exprimierten hADH5a von endogenen V79-ADH notwendig. Ein Reinigungsversuch analog zu der in Abschnitt 2.6 beschriebenen Methode war jedoch nicht erfolgreich; hADH5a band im Gegensatz zu den anderen hADH vollständig an das Säulenmaterial und eluierte erst nach NaCl-Elution zusammen mit einem Teil der V79-ADH, die ebenfalls gebunden hatte. Für eine Trennung ist somit zumindest eine Gradientenelution erforderlich.

Trotz der Probleme, die katalytische Aktivität von hADH5a zu messen, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass dieses Enzym im Metabolismus von Pyrenylmethanolen und/oder HMF von Bedeutung ist. Die gemessenen Absorptionsänderungen mit diesen Substraten überstiegen nicht die störende „Hintergrundaktivität“.

4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Daten der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass Pyrenylmethanole (benzylische Hydroxylderivate von Methyl- und Dimethylpyrenen) im Menschen effektiv durch ADH- und ALDH-katalysierte Oxidation zur Carbonsäure detoxifiziert werden können. Vor allem hADH2, daneben auch hADH1C und 4, dürften von großer Bedeutung für die Oxidation der Pyrenylmethanole zu Pyrenaldehyden sein. Aufgrund der kinitischen Daten ist zu schließen, dass hALDH2 von wesentlicher Bedeutung für die Weiteroxidation zur Pyrenylcarbonsäure ist, während die Bedeutung von hALDH3A1 eher geringer sein dürfte. Aufgrund der Gewebeverteilung der beteiligten Enzyme ist zu schließen, dass die Leber das höchste Detoxifizierungspotential für Pyrenylmethanole besitzt (hADH2 und hALDH2 sind in der Leber hoch exprimiert). Daneben ist jedoch auch ein gewisses Detoxifizierungspotential in extrahepatischen Geweben (z.B. im gesamten Gastrointestinaltrakt) vorhanden. Ethanol ist

aufgrund der hauptsächlich beteiligten Enzyme (hADH2, 1C, 4 und hALDH2) und der Daten zur Ethanolinhibition der hADH2-katalysierten Pyrenylmethanoloxidation nahezu zweifelsfrei als Risikofaktor für Methylpyren-induzierte Schädigungen im Falle einer Koexposition anzusehen. Die Hemmung des oxidativen Metabolismus der Methylpyrene durch die konkurrierenden Substrate Ethanol und Acetaldehyd dürfte eine gesteigerte SULT-vermittelte Bioaktivierung zur Folge haben, was für 1-HMP in der Ratte auch bereits gezeigt werden konnte (Ma *et al.*, 2002). Dieser Mechanismus liefert auch eine gute Erklärung für den bekannten starken synergistischen Effekt von Ethanolaufnahme und Tabakrauchen (Methylpyrenexposition) bei vielen malignen Tumoren, z.B. des Ösophagus (Tuyns, 1983) und des Kehlkopfes (Tuyns *et al.*, 1988). Inwieweit weitere hALDH für den Metabolismus von Methylpyrenen von Bedeutung sein könnten, wäre durch entsprechende Untersuchungen zu klären.

Mit hADH2, 3 und 4 sowie hALDH2 und 3A1 wurden drei humane ADH und zwei ALDH identifiziert, die in den oxidativen Metabolismus von HMF involviert sind (Abb. 45). Die vorliegenden Daten legen nahe, dass zum einen durch ALDH-katalysierte Oxidation von HMF HMFA entsteht, welche zum Teil mit Glycin konjugiert wird. Zum anderen wird HMF durch ADH zum DFF oxidiert, welches nachfolgend ALDH-katalysiert zur FDCA weiteroxidiert wird. Die in diese Reaktionen involvierten hALDH müssen noch identifiziert werden. Auch ob noch weitere hALDH HMF zur HMFA oxidieren können, wäre Untersuchungen wert. Eine nennenswerte Bildung von FDCA durch ADH-katalysierte Oxidation von HMFA zur FFCA und Weiteroxidation durch ALDH ist auszuschließen, da HMFA durch hADH nur mit geringer Effizienz oxidiert wird. Ethanolaufnahme ist bei Koexposition mit HMF, aufgrund der beteiligten hADH und ALDH sowie deren Gewebeverteilung, als wichtiger Risikofaktor für mögliche HMF-induzierte Schädigungen anzusehen (Abschnitt 4.3.2).

Die Ergebnisse zur Substratspezifität humaner ADH und ALDH gegenüber Pyrenderivaten stehen in gutem Einklang zu Tierversuchsdaten mit 1-HMP und 1-HM-8-MP (Batke & Donath, unveröffentlichte Daten; Ma *et al.*, 2002). Dennoch sind Ergebnisse aus Tierversuchen nicht ohne weiteres auf den Menschen extrapolierbar und umgekehrt kann man mit Daten für humane Enzyme nicht einfach Ergebnisse von Tierversuchen erklären. Selbst orthologe Enzyme verschiedener Spezies können sich in ihrer Substratspezifität teilweise erheblich unterscheiden. Darum wäre es ein wesentlicher Punkt, um die Ergebnisse von Tierversuchen (sei es mit Pyrenylmethanolen oder HMF) besser interpretieren zu können und

Aussagen für den Menschen treffen, die Substratspezifität von ADH und ALDH der Ratte und der Maus gegenüber Pyrendervivaten und HMF zu analysieren.

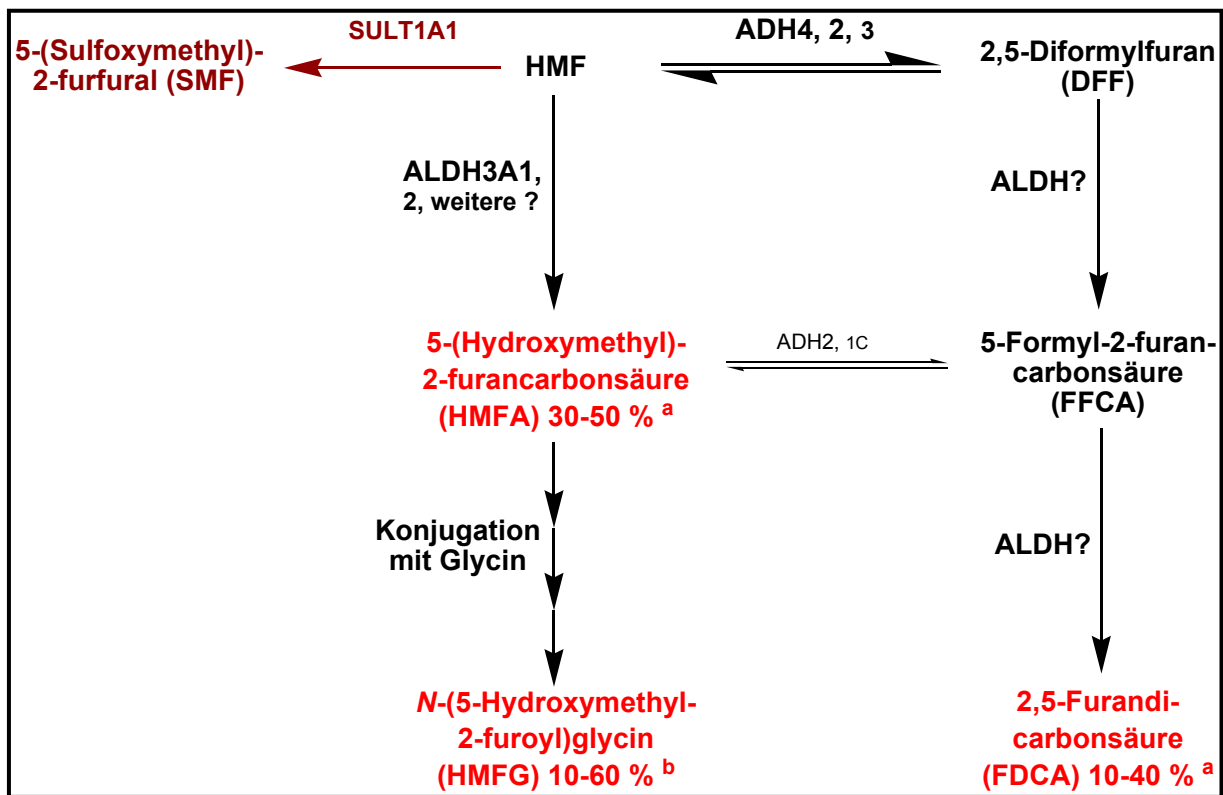


Abb. 45: Postulierter HMF-Metabolismus im Menschen *in vivo*. Die Beteiligung der angegebenen Enzyme wird aufgrund der bestimmten kinetischen Daten für humane SULT (Sommer, 2006), ADH (vorliegende Arbeit, Tabelle 20) und ALDH (Tabelle 21, Daten aus Rost, 2007) postuliert. Eine nennenswerte SULT-katalysierte Bioaktivierung erfolgt wahrscheinlich nur bei Inhibition der konkurrierenden oxidativen Metabolismuswege. Die im Urin gefundenen Metaboliten nach HMF-Exposition des Menschen sind rot dargestellt. Der angegebene prozentuale Anteil der Metaboliten bezogen auf die aufgenommene HMF-Menge beruht a) auf einer Studie von Jellum und Mitarbeitern (Jellum *et al.*, 1973) und b) darauf, dass die Ausscheidung von unveränderten HMF bei unter 1 % liegt (Murkovic & Pichler, 2006) und HMFG (wie auch FDCA) ein Bestandteil des normalen humanen Urins ist (Pettersen & Jellum, 1972).

5. Zusammenfassung / Summary

5.1 Zusammenfassung

Alkylierte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (alk-PAK) kommen zusammen mit rein aromatischen polyzyklischen Kohlenwasserstoffen u.a. im Zigarettenrauch, Dieselabgasen sowie einigen Lebensmitteln (z.B. Freilandgemüse, pflanzliche Öle und Fette) vor. Benzyliche Hydroxylierung und nachfolgende Sulfokonjugation ist ein wichtiger Bioaktivierungsweg für einige alk-PAK. Oxidation der benzylichen Alkohole durch Alkoholdehydrogenasen (ADH) und Aldehyddehydrogenasen (ALDH) zur Carbonsäure könnte einen wichtigen Detoxifizierungsweg in Konkurrenz zur Bioaktivierung durch Sulfotransferasen (SULT) darstellen, was für die Modellsubstanz 1-Hydroxymethylpyren in der Ratte bereits gezeigt wurde (Ma, L., Kuhlow, A. & Glatt, H. (2002). *Polycyclic Aromat Compnds* **22**, 933-946). Durch Hemmung der ADH und/oder ALDH ist eine verstärkte Bioaktivierung zu erwarten, wie in der besagten Studie ebenfalls nachgewiesen wurde. Insbesondere Ethanol kommt in diesem Zusammenhang eine Rolle als möglicher Risikofaktor für alk-PAK-induzierte Kanzerogenese zu. Menschen konsumieren häufig große Mengen Ethanol und oft besteht eine Koexposition mit alk-PAK (z.B. durch gleichzeitiges bzw. zeitnahes Rauchen). Ähnliche Zusammenhänge gelten für 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural (HMF), einem Pyrolyseprodukt reduzierender Zucker, dem gegenüber Menschen in recht hohen Mengen exponiert sind. Auch bei HMF steht der ADH- und ALDH-vermittelte oxidative Metabolismus in Konkurrenz zu einer Bioaktivierung durch Sulfokonjugation. Um die Bedeutung humaner ADH und ALDH im Metabolismus von alk-PAK und von HMF aufzuklären, wurden alle bekannten humanen ADH sowie die humanen ALDH2 und 3A1 (aus theoretischen Überlegungen heraus die vielversprechendsten Formen) für kinetische Analysen in Bakterien exprimiert. Als Enzymquelle dienten zytosolische Präparationen und durch Anionenaustauschchromatographie partiell gereinigte Enzyme.

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass primäre benzyliche Alkohole von Methyl- und Dimethylpyrenen gute Substrate humaner ADH sind. Sekundäre benzyliche Alkohole sowie benzyliche Alkohole von alk-PAK mit größerem Kohlenwasserstoffgrundgerüst erwiesen sich dagegen als schlechte Substrate. Vier Formen (ADH1C, 2, 3 und 4) wurden näher analysiert. Dazu wurden sie partiell gereinigt, primär um

die störende endogene Bakterien-ADH zu eliminieren. Alle untersuchten ADH waren in der Lage Pyrenylmethanole zu oxidieren. Insbesondere ADH2 katalysierte die Oxidation der Pyrenylmethanole effizient, aber auch für ADH1C und 4 waren die Pyrenylmethanole gute Substrate. ADH3 oxidierte die untersuchten Pyrenylmethanole mit geringer katalytischer Effizienz. Die Reduktion der entsprechenden Pyrenaldehyde durch ADH1C, 2 und 4 wurde mit noch höherer Effizienz katalysiert als die Oxidation der Pyrenylmethanole, was die Bedeutung von ALDH für die effiziente Detoxifizierung dieser Verbindungen unterstreicht. In einer an diese Arbeit angelehnten Diplomarbeit (Rost, K. (2007). Universität Potsdam, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät) wurde auch tatsächlich gezeigt, dass humane ALDH2 aber auch ALDH3A1 in der Lage sind, die Pyrenaldehyde zu Pyrenylcarbonsäuren zu oxidieren. Die bestimmten kinetischen Parameter legen nahe, dass insbesondere ALDH2 von Bedeutung für die Detoxifizierung von Methyl- und Dimethylpyrenen ist. Schon allein auf Grund der an der Detoxifizierung beteiligten Enzyme ist Ethanolaufnahme bei Koexposition mit Pyrenderivaten als Risikofaktor anzusehen. Es ist wahrscheinlich, dass Ethanol und, nach dessen Oxidation, Acetaldehyd als konkurrierende Substrate die ADH- und ALDH-katalysierte Oxidation von Pyrenylmethanolen bzw. Pyrenaldehyden inhibieren und somit zu einer verstärkten SULT-vermittelten Bioaktivierung der Pyrenylmethanole führen. In der Tat wurde eine effiziente Inhibition der ADH2-katalysierten Oxidation von 1-Hydroxymethylpyren und von 1-(Hydroxymethyl)-8-methylpyren durch physiologisch relevante Ethanolkonzentrationen nachgewiesen.

Drei humane ADH (4, 2 und 3), die HMF effizient zum 2,5-Diformylfuran oxidieren können, wurden identifiziert. Durch ALDH-katalysierte Weiteroxidation dieser Substanz entsteht schließlich 2,5-Furandicarbonsäure, die nach HMF-Exposition auch tatsächlich im menschlichen Urin gefunden wurde (Jellum, E., Børresen, H. C. & Eldjarn, L. (1973). *Clin Chim Acta* **47**, 191-201). Weiter wurde gezeigt, dass ALDH3A1, aber auch ALDH2 HMF effizient zur 5-(Hydroxymethyl)-2-furancarbonsäure (HMFA) oxidieren können, ein weiterer nachgewiesener HMF-Metabolit *in vivo*. Dass die ADH-katalysierte Oxidation von HMFA und nachfolgende ALDH-katalysierte Oxidation zur Bildung von 2,5-Furandicarbonsäure einen nennenswerten Anteil beträgt, kann aufgrund der kinetischen Daten für HMFA als Substrat humaner ADH ausgeschlossen werden. Die beobachteten Enzymaktivitäten lassen den Schluss zu, dass Ethanolaufnahme zu einer Reduktion des oxidativen HMF-Metabolismus führt und somit eine Bioaktivierung von HMF durch Sulfokonjugation begünstigt.

5.2 Summary

Alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons (alk-PAH), together with purely aromatic PAH, are present e.g. in tobacco smoke, diesel exhausts and also in some foods (e.g. outdoor vegetables, vegetable oils). Benzylic hydroxylation and subsequent sulfo conjugation is an important metabolic activation pathway for some of these compounds. Nevertheless, oxidation of the benzylic alcohols by alcohol dehydrogenases (ADH) and subsequently by aldehyde dehydrogenases (ALDH) can compete with the sulfo conjugation. Therefore, this pathway is probably important in the detoxification as could be shown for the representative compound 1-hydroxymethylpyrene in the rat (Ma, L., Kuhlow, A. & Glatt, H. (2002). *Polycyclic Aromat Compnds* **22**, 933-946). Inhibition of ADH and/or ALDH should increase bioactivation as indeed was shown for 1-hydroxymethylpyrene in this study. Particularly ethanol, a competing ADH substrate, is of high interest in this context. Humans often consume large quantities of ethanol and often they are coexposed to alk-PAH (e.g. due to tobacco smoking). Similar relationships can be considered for 5-(hydroxymethyl)-2-furfural (HMF), a common pyrolysate of reducing sugars with high exposure to humans. Oxidative metabolism of HMF by ADH and ALDH also competes with its bioactivation by sulfotransferases (SULT). To clarify the importance of human ADH and ALDH in the metabolism of alk-PAH and HMF, all known human ADH as well as human ALDH2 and 3A1 (the most promising forms according to theoretical considerations) were expressed in bacteria for kinetic analyses. Cytosolic preparations or enzymes partially purified by anion exchange chromatography were used as enzyme source.

In the present study it was shown that primary benzylic alcohols of methyl- and dimethylpyrenes were good substrates for human ADH. However, secondary benzylic alcohols and benzylic alcohols derived from alk-PAH with a bulkier hydrocarbon skeletal were poor substrates for human ADH. The most promising forms (ADH1C, 2, 3 and 4) were partially purified and further analysed. The purification step was necessary to eliminate the bacterial ADH. Particularly ADH2 was efficient for oxidation of pyrenylmethanols, although ADH1C and 4 were relatively efficient too. ADH3 was also capable of oxidising the tested pyrenylmethanols but with low catalytic efficiency. The reduction of the corresponding pyrene aldehydes was catalysed by ADH1C, 2 and 4 even with higher efficiency than the oxidation of the pyrenylmethanols emphasising the importance of ALDH for the detoxification of these compounds. In a diploma work related to the present study (Rost, K. (2007). University of Potsdam, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät) it was shown

that human ALDH2, but also ALDH3A1, can oxidise pyrene aldehydes to pyrenylcarboxylic acids. Particularly ALDH2 efficiently catalyse these reactions and, therefore, is probably of importance for the detoxification of methyl- and dimethylpyrenes. Due to the enzymes involved ethanol consumption could be a risk factor for methyl- and dimethylpyrene induced damage in the case of coexposure to methyl- and dimethylpyrenes. It is probable that ethanol and, after its oxidation, acetaldehyde will inhibit the ADH- and ALDH-catalysed oxidation of pyrenylmethanols and pyrenealdehydes. Indeed, it was shown that ADH2-catalysed oxidation of 1-hydroxymethylpyrene and of 1-(hydroxymethyl)-8-methylpyrene was efficiently inhibited by physiologically attainable concentrations of ethanol.

Three human ADHs (4, 2 and 3) that efficiently oxidise HMF to 2,5-diformylfuran were identified. Further oxidation by ALDH leads to 2,5-furandicarboxylic acid, which was found in human urine after exposure to HMF (Jellum, E., Børresen, H. C. & Eldjarn, L. (1973). *Clin Chim Acta* **47**, 191-201). Moreover, it was shown that human ALDH3A1 and also ALDH2 efficiently oxidise HMF to 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxylic acid (HMFA), which was also found in human urine. That 2,5-furandicarboxylic acid can be formed in significant amounts by ADH-catalysed oxidation of HMFA and subsequent oxidation by ALDH could be ruled out due to the kinetic data with HMFA as a substrate for human ADH. Due to the enzymes involved it is probable that ethanol consumption will inhibit the oxidative metabolism of HMF and, therefore, will increase the sulfo conjugation of HMF.

6. Literaturverzeichnis

- Abdulmalik, O., Safo, M. K., Chen, Q., Yang, J., Brugnara, C., Ohene-Frempong, K., Abraham, D. J., & Asakura, T. (2005). 5-Hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells, *Br J Haematol* **128**, 552-561.
- Agarwal, D. P. (2001). Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes, *Pathol Biol (Paris)* **49**, 703-709.
- Antal, M. J., Jr., Mok, W. S. L., & Richards, G. N. (1990). Mechanism of formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from D-fructose and sucrose, *Carbohydr Res* **199**, 91-109.
- Bachmann, S., Meier, M., & Känzig, A. (1997). 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in Lebensmitteln, *Lebensmittelchemie* **51**, 49-50.
- Borràs, E., Coutelle, C., Rosell, A., Fernández-Muixi, 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. *et al.* (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.
- Borron, S. W., Mégarbane, B., & Baud, F. J. (1999). Fomepizole in treatment of uncomplicated ethylene glycol poisoning, *Lancet* **354**, 831.
- Bosron, W. F. & 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.
- Bosron, W. F., Li, T.-K., Däfeldecker, W. P., & Vallee, B. L. (1979). Human liver π -alcohol dehydrogenase: kinetic and molecular properties, *Biochemistry* **18**, 1101-1105.
- Bosron, W. F., Magnes, L. J., & Li, T.-K. (1983). Human liver alcohol dehydrogenase: *ADH*_{Indianapolis} results from genetic polymorphism at the *ADH2* gene locus, *Biochem Genet* **21**, 735-744.
- Brennan, P., Lewis, S., Hashibe, M., Bell, D. A., Boffetta, P., Bouchardy, C., Caporaso, N., Chen, C., Coutelle, C., Diehl, S. R., Hayes, R. B., Olshan, A. F., Schwartz, S. M., Sturgis, E. M., Wei, Q., Zavras, A. I., & Benhamou, S. (2004). Pooled analysis of

- alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a HuGE review, *Am J Epidemiol* **159**, 1-16.
- Brent, J., McMartin, K., Phillips, S., Burkhart, K. K., Donovan, J. W., Wells, M., & Kulig, K. (1999). Fomepizole for the treatment of ethylene glycol poisoning, *N Engl J Med* **340**, 832-838.
- Brent, J., McMartin, K., Phillips, S., Aaron, C., & Kulig, K. (2001). Fomepizole for the treatment of methanol poisoning, *N Engl J Med* **344**, 424-429.
- Buervenich, S., Sydow, O., Carmine, A., Zhang, Z., Anvret, M., & Olson, L. (2000). Alcohol dehydrogenase alleles in Parkinson's disease, *Mov Disord* **15**, 813-818.
- Bullas, L. R. & Ryu, J.-I. (1983). *Salmonella typhimurium* LT2 strains which are r⁻ m⁺ for all three chromosomally located systems of DNA restriction and modification, *J Bacteriol* **156**, 471-474.
- Carr, L. G., Xu, Y., Ho, W.-H., & Edenberg, H. J. (1989). Nucleotide sequence of the *ADH2*³ gene encoding the human alcohol dehydrogenase β_3 subunit, *Alcohol Clin Exp Res* **13**, 594-596.
- Chambliss, K. L., Hinson, D. D., Trettel, F., Malaspina, P., Novelletto, A., Jakobs, C., & Gibson, K. M. (1998). Two exon-skipping mutations as the molecular basis of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria), *Am J Hum Genet* **63**, 399-408.
- Chan, W.-M., Tang, W.-K., Cheng, C. H. K., & Fong, W.-P. (2003). Purification, N-terminal sequence determination and enzymatic characterization of antiquitin from the liver of grass carp, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **136**, 443-450.
- Chen, C.-C., Lu, R.-B., Chen, Y.-C., Wang, M.-F., Chang, Y.-C., Li, T.-K., & Yin, S.-J. (1999). Interaction between the functional polymorphisms of the alcohol-metabolism genes in protection against alcoholism, *Am J Hum Genet* **65**, 795-807.
- Chen, C.-S. & Yoshida, A. (1991). Enzymatic properties of the protein encoded by newly cloned human alcohol dehydrogenase *ADH6* gene, *Biochem Biophys Res Commun* **181**, 743-747.
- Cho, H. & Plapp, B. V. (1998). Specificity of alcohol dehydrogenases for sulfoxides, *Biochemistry* **37**, 4482-4489.
- Consalvi, V., Mårdh, G., & Vallee, B. L. (1986). Human alcohol dehydrogenases and serotonin metabolism, *Biochem Biophys Res Commun* **139**, 1009-1016.

- Cornish-Bowden, A. (1974). A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors, *Biochem J* **137**, 143-144.
- Crosas, B., Cederlund, E., Torres, D., Jörnvall, H., Farrés, J., & Parés, X. (2001). A vertebrate aldo-keto reductase active with retinoids and ethanol, *J Biol Chem* **276**, 19132-19140.
- Daly, A. K., Cholerton, S., Gregory, W., & Idle, J. R. (1993). Metabolic polymorphisms, *Pharmacol Ther* **57**, 129-160.
- de la Luna, S., Soria, I., Pulido, D., Ortín, J., & Jiménez, A. (1988). Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker, *Gene* **62**, 121-126.
- De Laurenzi, V., Rogers, G. R., Hamrock, D. J., Marekov, L. N., Steinert, P. M., Compton, J. G., Markova, N., & Rizzo, W. B. (1996). Sjögren-Larsson syndrome is caused by mutations in the fatty aldehyde dehydrogenase gene, *Nat Genet* **12**, 52-57.
- de Vos, R. H., van Dokkum, W., Schouten, A., & de Jong-Berkhout, P. (1990). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986), *Food Chem Toxicol* **28**, 263-268.
- Deitrich, R. A., Bludeau, P., Roper, M., & Schmuck, J. (1978). Induction of aldehyde dehydrogenases, *Biochem Pharmacol* **27**, 2347-2347.
- Dennis, M. J., Massey, R. C., McWeeny, D. J., Knowles, M. E., & Watson, D. (1983). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets, *Food Chem Toxicol* **21**, 569-574.
- Dixon, M. (1953). The determination of enzyme inhibitor constants, *Biochem J* **55**, 170-171.
- Dong, Y.-J., Peng, T.-K., & Yin, S.-J. (1996). Expression and activities of class IV alcohol dehydrogenase and class III aldehyde dehydrogenase in human mouth, *Alcohol* **13**, 257-262.
- 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., Farrés, J., Felder, M. R., Holmes, R. S., Höög, J.-O., Parés, X., Plapp, B. V., Yin, S.-J., & Jörnvall, H. (1999). Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family, *Biochem Pharmacol* **58**, 389-395.
- Edenberg, H. J. & Brown, C. J. (1992). Regulation of human alcohol dehydrogenase genes, *Pharmacogenetics* **2**, 185-196.

- Edenberg, H. J. & Bosron, W. F. (1997). Alcohol dehydrogenases. In: *Comprehensive Toxicology*, Guengerich, F. P. (ed.) Pergamon, New York, 119-131.
- Edenberg, H. J., Jerome, R. E., & Li, M. (1999). Polymorphism of the human alcohol dehydrogenase 4 (*ADH4*) promoter affects gene expression, *Pharmacogenetics* **9**, 25-30.
- Engst, W., Landsiedel, R., Hermersdörfer, H., Doehmer, J., & Glatt, H. (1999). Benzylic hydroxylation of 1-methylpyrene and 1-ethylpyrene by human and rat cytochromes P450 individually expressed in V79 Chinese hamster cells, *Carcinogenesis* **20**, 1777-1785.
- Ford, D. K. & Yerganian, G. (1958). Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture, *J Natl Cancer Inst* **21**, 393-425.
- Germond, J. E., Philipposian, G., Richli, U., Bracco, I., & Arnaud, M. J. (1987). Rapid and complete urinary elimination of [¹⁴C]-5-hydroxymethyl-2-furaldehyde administered orally or intravenously to rats, *J Toxicol Environ Health* **22**, 79-89.
- Gibson, K. M., Hoffmann, G. F., Hodson, A. K., Bottiglieri, T., & Jakobs, C. (1998). 4-Hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism, *Neuropediatrics* **29**, 14-22.
- Glatt, H. & Meinel, W. (2005). Sulfotransferases and acetyltransferases in mutagenicity testing: technical aspects, *Meth Enzymol* **400**, 230-249.
- Glatt, H., Gemperlein, I., Turchi, G., Heinritz, H., Doehmer, J., & Oesch, F. (1987). Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolising activities and their use in toxicological studies, *Mol Toxicol* **1**, 313-333.
- Godfrey, V. B., Chen, L.-J., Griffin, R. J., Lebetkin, E. H., & Burka, L. T. (1999). Distribution and metabolism of (5-hydroxymethyl)furfural in male F344 rats and B6C3F1 mice after oral administration, *J Toxicol Environ Health A* **57**, 199-210.
- Goedde, H. W., Harada, S., & Agarwal, D. P. (1979). Racial differences in alcohol sensitivity: a new hypothesis, *Hum Genet* **51**, 331-334.
- Goedde, H. W., Agarwal, D. P., Fritze, G., Meier-Tackmann, D., Singh, S., Beckmann, G., Bhatia, K., Chen, L. Z., Fang, B., Lisker, R., Paik, Y. K., Rothhammer, F., Saha, N., Segal, B., Srivastava, L. M., & Czeizel, A. (1992). Distribution of *ADH2* and *ALDH2* genotypes in different populations, *Hum Genet* **88**, 344-346.
- Gonzalez, F. J. & Idle, J. R. (1994). Pharmacogenetic phenotyping and genotyping. Present status and future potential, *Clin Pharmacokinet* **26**, 59-70.

- Gotoh, Y., Sumimoto, H., & Minakami, S. (1989). Purification and characterization of 20-hydroxy-leukotriene B⁴ dehydrogenase in human neutrophils, *Eur J Biochem* **179**, 315-321.
- Grimmer, G. (1988). Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe. In: *Derzeitige Belastung und Trends bei der Belastung der Lebensmittel durch Fremdstoffe*, Eisenbrand, G., Frank, H. K., Grimmer, G., Hapke, H.-J., Thier, H.-P. *et al.* (eds.), Verlag W. Kohlhammer GmbH, Karlsruhe, 151-187.
- Guillén, M. D. & Sopelana, P. (2004). Load of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible vegetable oils: importance of alkylated derivatives, *J Food Prot* **67**, 1904-1913.
- Hedberg, J. J., Backlund, M., Strömberg, P., Lönn, S., Dahl, M.-L., Ingelman-Sundberg, M., & Höög, J.-O. (2001). Functional polymorphism in the alcohol dehydrogenase 3 (*ADH3*) promoter, *Pharmacogenetics* **11**, 815-824.
- Hernández-Muñoz, R., Caballería, J., Baraona, E., Uppal, R., Greenstein, R., & Lieber, C. S. (1990). Human gastric alcohol dehydrogenase: its inhibition by H₂-receptor antagonists, and its effect on the bioavailability of ethanol, *Alcohol Clin Exp Res* **14**, 946-950.
- Heroux, J. A., Falany, C. N., & Roth, J. A. (1989). Immunological characterization of human phenol sulfotransferase, *Mol Pharmacol* **36**, 29-33.
- Holmquist, B. & Vallee, B. L. (1991). Human liver class III alcohol and glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase are the same enzyme, *Biochem Biophys Res Commun* **178**, 1371-1377.
- Höög, J.-O. & Brandt, M. (1995). Mammalian class VI alcohol dehydrogenase. Novel types of the rodent enzymes, *Adv Exp Med Biol* **372**, 355-364.
- Höög, J.-O., Hedén, L.-O., Larsson, K., Jörnvall, H., & von Bahr-Lindström, H. (1986). The γ_1 and γ_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., Weis, M., Zeppezauer, M., Jörnvall, H., & von Bahr-Lindström, H. (1987). Expression in *Escherichia coli* of active human alcohol dehydrogenase lacking N-terminal acetylation, *Biosci Rep* **7**, 969-974.
- Inoue, T., Sunagawa, M., Mori, A., Imai, C., Fukuda, M., Takagi, M., & Yano, K. (1989). Cloning and sequencing of the gene encoding the 72-kilodalton dehydrogenase subunit of alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*, *J Bacteriol* **171**, 3115-3122.

- Janzowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J., & Eisenbrand, G. (2000). 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione, *Food Chem Toxicol* **38**, 801-809.
- Jellum, E., Børresen, H. C., & Eldjarn, L. (1973). The presence of furan derivatives in patients receiving fructose-containing solutions intravenously, *Clin Chim Acta* **47**, 191-201.
- Johansson, B. (1992). A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites, *Acta Psychiatr Scand* **369**, 15-26.
- Jörnvall, H., Hempel, J., Vallee, B. L., Bosron, W. F., & Li, T.-K. (1984). Human liver alcohol dehydrogenase: amino acid substitution in the $\beta_2\beta_2$ Oriental isozyme explains functional properties, establishes an active site structure, and parallels mutational exchanges in the yeast enzyme, *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 3024-3028.
- Jörnvall, H., Danielsson, O., Hjelmqvist, L., Persson, B., & Shafqat, J. (1995a). The alcohol dehydrogenase system, *Adv Exp Med Biol* **372**, 281-294.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., González-Duarte, R., Jeffery, J., & Ghosh, D. (1995b). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR), *Biochemistry* **34**, 6003-6013.
- Kedishvili, N. Y., Gough, W. H., Chernoff, E. A. G., Hurley, T. D., Stone, C. L., Bowman, K. D., Popov, K. M., Bosron, W. F., & Li, T.-K. (1997). cDNA sequence and catalytic properties of a chick embryo alcohol dehydrogenase that oxidizes retinol and $3\beta,5\alpha$ -hydroxysteroids, *J Biol Chem* **272**, 7494-7500.
- Keung, W.-M. (1993). Biochemical studies of a new class of alcohol dehydrogenase inhibitors from *Radix puerariae*, *Alcohol Clin Exp Res* **17**, 1254-1260.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-209.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, S.-L., Wang, M.-F., Lee, A.-I., & Yin, S.-J. (2003). The metabolic role of human ADH3 functioning as ethanol dehydrogenase, *FEBS Lett* **544**, 143-147.
- Li, T.-K. & Theorell, H. (1969). Human liver alcohol dehydrogenase: inhibition by pyrazole and pyrazole analogs, *Acta Chem Scand* **23**, 892-902.
- Li, T.-K., Bosron, W. F., Däfeldecker, W. P., Lange, L. G., & Vallee, B. L. (1977). Isolation of π -alcohol dehydrogenase of human liver: is it a determinant of alcoholism? *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 4378-4381.

- Lin, S. W., Chen, J. C., Hsu, L. C., Hsieh, C.-L., & Yoshida, A. (1996). Human γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9): cDNA sequence, genomic organization, polymorphism, chromosomal localization, and tissue expression, *Genomics* **34**, 376-380.
- Lineweaver, H. & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants, *J Am Chem Soc* **56**, 658-666.
- Ma, L., Kuhlow, A., & Glatt, H. (2002). Ethanol enhances the activation of 1-hydroxymethylpyrene to DNA adduct-forming species in the rat, *Polycyclic Aromat Compnds* **22**, 933-946.
- Mårdh, G. & Vallee, B. L. (1986). Human class I alcohol dehydrogenases catalyze the interconversion of alcohols and aldehydes in the metabolism of dopamine, *Biochemistry* **25**, 7279-7282.
- Mårdh, G., Luehr, C. A., & 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., & Vallee, B. L. (1986). Human class II (π) alcohol dehydrogenase has a redox-specific function in norepinephrine metabolism, *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 8908-8912.
- Maron, D. M. & Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat Res* **113**, 173-215.
- Marschall, H.-U., Oppermann, U. C. T., Svensson, S., Nordling, E., Persson, B., Höög, J.-O., & Jörnvall, H. (2000). Human liver class I alcohol dehydrogenase $\gamma\gamma$ isozyme: the sole cytosolic 3β -hydroxysteroid dehydrogenase of iso bile acids, *Hepatology* **31**, 990-996.
- Marselos, M., Strom, S. C., & Michalopoulos, G. (1986). Enhancement of aldehyde dehydrogenase activity in human and rat hepatocyte cultures by 3-methylcholanthrene, *Cell Biol Toxicol* **2**, 257-269.
- Mauron, J. (1981). The Maillard reaction in food; a critical review from the nutritional standpoint, *Prog Food Nutr Sci* **5**, 5-35.
- McCarver, D. G., Thomasson, H. R., Martier, S. S., Sokol, R. J., & Li, T.-K. (1997). Alcohol dehydrogenase-2*3 allele protects against alcohol-related birth defects among African Americans, *J Pharmacol Exp Ther* **283**, 1095-1101.
- McEvily, A. J., Holmquist, B., Auld, D. S., & Vallee, B. L. (1988). 3β -Hydroxy- 5β -steroid dehydrogenase activity of human liver alcohol dehydrogenase is specific to γ -subunits, *Biochemistry* **27**, 4284-4288.

- Meerman, J. H. N., Sterenborg, H. M., & Mulder, G. J. (1983). Use of pentachlorophenol as long-term inhibitor of sulfation of phenols and hydroxamic acids in the rat *in vivo*, *Biochem Pharmacol* **32**, 1587-1593.
- Meinl, W., Meerman, J. H. N., & Glatt, H. (2002). Differential activation of promutagens by alloenzymes of human sulfotransferase 1A2 expressed in *Salmonella typhimurium*, *Pharmacogenetics* **12**, 677-689.
- Michaelis, M. & Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung, *Biochem Z* **49**, 333-369.
- Miyakawa, Y., Nishi, Y., Kato, K., Sato, H., Takahashi, M., & Hayashi, Y. (1991). Initiating activity of eight pyrolysates of carbohydrates in a two-stage mouse skin tumorigenesis model, *Carcinogenesis* **12**, 1169-1173.
- Moreno, A. & Parés, X. (1991). Purification and characterization of a new alcohol dehydrogenase from human stomach, *J Biol Chem* **266**, 1128-1133.
- Murkovic, M. & Pichler, N. (2006). Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine, *Mol Nutr Food Res* **50**, 842-846.
- Nishimura, M. & Naito, S. (2006). Tissue-specific mRNA expression profiles of human phase I metabolizing enzymes except for cytochrome P450 and phase II metabolizing enzymes, *Drug Metab Pharmacokinet* **21**, 357-374.
- Nordling, E., Jörnvall, H., & Persson, B. (2002). Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active site modeling, *Eur J Biochem* **269**, 4267-4276.
- Osier, M. V., Pakstis, A. J., Kidd, J. R., Lee, J.-F., Yin, S.-J., Ko, H.-C., Edenberg, H. J., Lu, R.-B., & Kidd, K. K. (1999). Linkage disequilibrium at the ADH2 and ADH3 loci and risk of alcoholism, *Am J Hum Genet* **64**, 1147-1157.
- Osier, M. V., Pakstis, A. J., Goldman, D., Edenberg, H. J., Kidd, J. R., & Kidd, K. K. (2002a). A proline-threonine substitution in codon 351 of *ADH1C* is common in Native Americans, *Alcohol Clin Exp Res* **26**, 1759-1763.
- Osier, M. V., Pakstis, A. J., Soodyall, H., Comas, D., Goldman, D., Odunsi, A., Okonofua, F., Parnas, J., Schulz, L. O., Bertranpetit, J., Bonne-Tamir, B., Lu, R.-B., Kidd, J. R., & Kidd, K. K. (2002b). A global perspective on genetic variation at the ADH genes reveals unusual patterns of linkage disequilibrium and diversity, *Am J Hum Genet* **71**, 84-99.

- Parés, X. & Farrés, J. (1996). Alcohol and aldehyde dehydrogenases in the gastrointestinal tract. In: *Alcohol and the Gastrointestinal Tract*, Preedy, V. R. & Watson, R. R. (eds.), CRC Press, Boca Raton, 41-56.
- Pettersen, J. E. & Jellum, E. (1972). The identification and metabolic origin of 2-furoylglycine and 2,5-furandicarboxylic acid in human urine, *Clin Chim Acta* **41**, 199-207.
- Phillips, D. H. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet, *Mutat Res* **443**, 139-147.
- Robodoc (18. Feb. 2007). *Laktatdehydrogenase*, <http://de.wikipedia.org/wiki/Laktatdehydrogenase>
- Rodrigues, M. A., Fernandes, M. J., & Angelo, M. D. (1995). Lactate dehydrogenase isoenzymes in mammalian cells exposed to isophenphos, *Biomed Environ Sci* **8**, 18-22.
- Roe, C. R., Struys, E., Kok, R. M., Roe, D. S., Harris, R. A., & Jakobs, C. (1998). Methylmalonic semialdehyde dehydrogenase deficiency: psychomotor delay and methylmalonic aciduria without metabolic decompensation, *Mol Genet Metab* **65**, 35-43.
- Rost, K. (2007). *Expression der humanen Aldehyddehydrogenasen 2 und 3A1 in Bakterien für kinetische Untersuchungen mit Pyrederivaten und 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural*, Diplomarbeit, Universität Potsdam (Deutschland): Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Potsdam.
- Sanghani, P. C., Stone, C. L., Ray, B. D., Pindel, E. V., Hurley, T. D., & Bosron, W. F. (2000). Kinetic mechanism of human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, *Biochemistry* **39**, 10720-10729.
- Scopes, R. K. (1983). An iron-activated alcohol dehydrogenase, *FEBS Lett* **156**, 303-306.
- Seitz, H. K., Simanowski, U. A., Egerer, G., Waldherr, R., & Oertl, U. (1992). Human gastric alcohol dehydrogenase: *in vitro* characteristics and effect of cimetidine, *Digestion* **51**, 80-85.
- Sellin, S., Holmquist, B., Mannervik, B., & Vallee, B. L. (1991). Oxidation and reduction of 4-hydroxyalkenals catalyzed by isozymes of human alcohol dehydrogenase, *Biochemistry* **30**, 2514-2518.
- Sharkawi, M. (1979). Inhibition of alcohol dehydrogenase by dimethyl formamide and dimethyl sulfoxide, *Toxicol Lett* **4**, 493-497.

- Sherman, D., Dave, V., Hsu, L. C., Peters, T. J., & Yoshida, A. (1993). Diverse polymorphism within a short coding region of the human aldehyde dehydrogenase-5 (*ALDH5*) gene, *Hum Genet* **92**, 477-480.
- Simonyan, T. A. (1971). Hygienic assessment of the oxymethylfurfurol content in a daily food ration of man, *Vopr Pitan* **30**, 50-53.
- Sládek, N. E. (2003). Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact, *J Biochem Mol Toxicol* **17**, 7-23.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Sommer, Y. (2006). *5-(Hydroxymethyl)-2-furfural: Sulfokonjugation und ihre Bedeutung für die Genotoxizität*, Dissertation, Universität Potsdam (Deutschland): Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Potsdam.
- Sommer, Y., Hollnagel, H., Schneider, H., & Glatt, H. (2003). Metabolism of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) to the mutagen, 5-sulfoxymethyl-2-furfural (SMF) by individual human sulfotransferases, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **367**, R166.
- Sophos, N. A. & Vasiliou, V. (2003). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update, *Chem Biol Interact* **143-144**, 5-22.
- Stone, C. L., Hurley, T. D., Peggs, C. F., Kedishvili, N. Y., Davis, G. J., Thomasson, H. R., Li, T.-K., & Bosron, W. F. (1995). Cimetidine inhibition of human gastric and liver alcohol dehydrogenase isoenzymes: identification of inhibitor complexes by kinetics and molecular modeling, *Biochemistry* **34**, 4008-4014.
- Strausberg, R. L., Feingold, E. A., Grouse, L. H., Derge, J. G., Klausner, R. D., Collins, F. S., Wagner, L., Shenmen, C. M., Schuler, G. D., Altschul, S. F., Zeeberg, B., Buetow, K. H., Schaefer, C. F., Bhat, N. K., Hopkins, R. F., Jordan, H., Moore, T., Max, S. I., Wang, J., Hsieh, F. *et al.* (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 16899-16903.
- Strömberg, P. & 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.

- Strömberg, P., Svensson, S., Hedberg, J. J., Nordling, E., & Höög, J.-O. (2002). Identification and characterisation of two allelic forms of human alcohol dehydrogenase 2, *Cell Mol Life Sci* **59**, 552-559.
- Sturgis, E. M., Dahlstrom, K. R., Guan, Y., Eicher, S. A., Strom, S. S., Spitz, M. R., & Wei, Q. (2001). Alcohol dehydrogenase 3 genotype is not associated with risk of squamous cell carcinoma of the oral cavity and pharynx, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 273-275.
- Sundaram, R. S., Szumlanski, C., Otterness, D. M., van Loon, J. A., & Weinshilboum, R. M. (1989). Human intestinal phenol sulfotransferase: assay conditions, activity levels and partial purification of the thermolabile form, *Drug Metab. Dispos.* **17**, 255-264.
- Surh, Y.-J. & Miller, J. A. (1994). Roles of electrophilic sulfuric acid ester metabolites in mutagenesis and carcinogenesis by some polynuclear aromatic hydrocarbons, *Chem Biol Interact* **92**, 351-362.
- Surh, Y.-J. & Tannenbaum, S. R. (1994). Activation of the Maillard reaction product 5-(hydroxymethyl)furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination, *Chem Res Toxicol* **7**, 313-318.
- Svensson, S., Hedberg, J. J., & Höög, J.-O. (1998). Structural and functional divergence of class II alcohol dehydrogenase. Cloning and characterisation of rabbit liver isoforms of the enzyme, *Eur J Biochem* **251**, 236-243.
- Svensson, S., Some, M., Lundsjö, A., Helander, A., Cronholm, T., & Höög, J.-O. (1999). Activities of human alcohol dehydrogenases in the metabolic pathways of ethanol and serotonin, *Eur J Biochem* **262**, 324-329.
- Tang, W.-K., Cheng, C. H. K., & Fong, W.-P. (2002). First purification of the antiquitin protein and demonstration of its enzymatic activity, *FEBS Lett* **516**, 183-186.
- Thakker, D. R., Yagi, H., Levin, W., Wood, A. W., Conney, A. H., & Jerina, D. M. (1985). Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolic activation to ultimate carcinogens. In: *Bioactivation of Foreign Compounds*, Anders, M. W. (ed.) Academic Press, Inc., 177-242.
- Theobald, A., Müller, A., & Anklam, E. (1998). Determination of 5-hydroxymethylfurfural in vinegar samples by HPLC, *J Agric Food Chem* **46**, 1850-1854.
- Theorell, H., Yonetani, T., & Sjöberg, B. (1969). On the effects of some heterocyclic compounds on the enzymic activity of liver alcohol dehydrogenase, *Acta Chem Scand* **23**, 255-260.

- Tiemersma, E. W., Wark, P. A., Ocké, M. C., Bunschoten, A., Otten, M. H., Kok, F. J., & Kampman, E. (2003). Alcohol consumption, alcohol dehydrogenase 3 polymorphism, and colorectal adenomas, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**, 419-425.
- Törrönen, R., Nousiainen, U., & Hänninen, O. (1981). Induction of aldehyde dehydrogenase by polycyclic aromatic hydrocarbons in rats, *Chem Biol Interact* **36**, 33-44.
- Tóth, L. & Potthast, K. (1984). Chemical aspects of the smoking of meat and meat products, *Adv Food Res* **29**, 87-158.
- Tuyns, A. J. (1983). Oesophageal cancer in non-smoking drinkers and in non-drinking smokers, *Int J Cancer* **32**, 443-444.
- Tuyns, A. J., Esteve, J., Raymond, L., Berrino, F., Benhamou, E., Blanchet, F., Boffetta, P., Crosignani, P., del Moral, A., Lehmann, W., Merletti, F., Péquignot, G., Riboli, E., Sancho-Garnier, H., Terracini, B., Zubiri, A., & Zubiri, L. (1988). Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France), *Int J Cancer* **41**, 483-491.
- Uotila, L. & Koivusalo, M. (1989). Glutathione-dependent oxidoreductases: formaldehyde dehydrogenase. In: *Coenzymes and cofactors. Glutathione. Chemical, biochemical and medical aspects*, Dolphin, D., Poulson, R., & Avramović, O. (eds.), John Wiley & Sons, New York, 517-551.
- Valle, D., Goodman, S. I., Applegarth, D. A., Shih, V. E., & Phang, J. M. (1976). Type II hyperprolinemia. Δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid dehydrogenase deficiency in cultured skin fibroblasts and circulating lymphocytes, *J Clin Invest* **58**, 598-603.
- Vallee, B. L. & Bazzone, T. J. (1983). Isozymes of human liver alcohol dehydrogenase, *Isozymes Curr Top Biol Med Res* **8**, 219-244.
- Vasiliou, V. & Marselos, M. (1989). Changes in the inducibility of a hepatic aldehyde dehydrogenase by various effectors, *Arch Toxicol* **63**, 221-225.
- Vasiliou, V. & Nebert, D. W. (2005). Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) gene family, *Hum Genomics* **2**, 138-143.
- Vasiliou, V. & Pappa, A. (2000). Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. Consequences for drug metabolism and disease, *Pharmacology* **61**, 192-198.
- Vasiliou, V., Bairoch, A., Tipton, K. F., & Nebert, D. W. (1999). Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping, *Pharmacogenetics* **9**, 421-434.

- Vasiliou, V., Pappa, A., & Petersen, D. R. (2000). Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism, *Chem Biol Interact* **129**, 1-19.
- Vasiliou, V., Pappa, A., & Estey, T. (2004). Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism, *Drug Metab Rev* **36**, 279-299.
- Vaz, F. M., Fouchier, S. W., Ofman, R., Sommer, M., & Wanders, R. J. A. (2000). Molecular and biochemical characterization of rat γ -trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis, *J Biol Chem* **275**, 7390-7394.
- Visapää, J.-P., Götte, K., Benesova, M., Li, J., Homann, N., Conradt, C., Inoue, H., Tisch, M., Hörmann, K., Väkeväinen, S., Salaspuro, M., & Seitz, H. K. (2004). Increased cancer risk in heavy drinkers with the alcohol dehydrogenase *IC*1* allele, possibly due to salivary acetaldehyde, *Gut* **53**, 871-876.
- Wang, D., Ritchie, J. M., Smith, E. M., Zhang, Z., Turek, L. P., & Haugen, T. H. (2005). Alcohol dehydrogenase 3 and risk of squamous cell carcinomas of the head and neck, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 626-632.
- Yang, Z.-N., Davis, G. J., Hurley, T. D., Stone, C. L., Li, T.-K., & Bosron, W. F. (1994). Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction, *Alcohol Clin Exp Res* **18**, 587-591.
- Yasunami, M., Chen, C.-S., & Yoshida, A. (1991). A human alcohol dehydrogenase gene (*ADH6*) encoding an additional class of isozyme, *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7610-7614.
- Yin, S.-J., Chou, F.-J., Chao, S.-F., Tsai, S.-F., Liao, C.-S., Wang, S.-L., Wu, C.-W., & Lee, S.-C. (1993a). Alcohol and aldehyde dehydrogenases in human esophagus: comparison with the stomach enzyme activities, *Alcohol Clin Exp Res* **17**, 376-381.
- Yin, S.-J., Wang, S.-L., Liao, C.-S., & Jörnvall, H. (1993b). Human high- K_m aldehyde dehydrogenase (ALDH3): molecular, kinetic and structural features, *Adv Exp Med Biol* **328**, 87-98.
- Yokoyama, A., Muramatsu, T., Omori, T., Yokoyama, T., Matsushita, S., Higuchi, S., Maruyama, K., & Ishii, H. (2001). Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms and oropharyngolaryngeal, esophageal and stomach cancers in Japanese alcoholics, *Carcinogenesis* **22**, 433-439.
- Yokoyama, A., Kato, H., Yokoyama, T., Tsujinaka, T., Muto, M., Omori, T., Haneda, T., Kumagai, Y., Igaki, H., Yokoyama, M., Watanabe, H., Fukuda, H., & Yoshimizu, H. (2002). Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and

- glutathione *S*-transferase M1 and drinking, smoking, and diet in Japanese men with esophageal squamous cell carcinoma, *Carcinogenesis* **23**, 1851-1859.
- Yoshida, A., Ikawa, M., Hsu, L. C., & Tani, K. (1985). Molecular abnormality and cDNA cloning of human aldehyde dehydrogenases, *Alcohol* **2**, 103-106.
- Žgombić-Knight, M., Ang, H. L., Foglio, M. H., & Duester, G. (1995a). 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.
- Žgombić-Knight, M., Foglio, M. H., & Duester, G. (1995b). Genomic structure and expression of the *ADH7* gene encoding human class IV alcohol dehydrogenase, the form most efficient for retinol metabolism *in vitro*, *J Biol Chem* **270**, 4305-4311.
- Zhang, X.-M., Chan, C. C., Stamp, D., Minkin, S., Archer, M. C., & Bruce, W. R. (1993). Initiation and promotion of colonic aberrant crypt foci in rats by 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in thermolyzed sucrose, *Carcinogenesis* **14**, 773-775.
- Zheng, Y.-W., Bey, M., Liu, H., & Felder, M. R. (1993). Molecular basis of the alcohol dehydrogenase-negative deer mouse. Evidence for deletion of the gene for class I enzyme and identification of a possible new enzyme class, *J Biol Chem* **268**, 24933-24939.
- Ziegler, T. L. & Vasiliou, V. (1999). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily. The 1998 update, *Adv Exp Med Biol* **463**, 255-263.

7. Publikationen

7.1 Artikel in Fachzeitschriften

Kollock, R., Meinel, W., Schneider, H., Batke, M., Frank, H., Seidel, A., & Glatt, H. Human alcohol dehydrogenase 2 efficiently catalyzes the oxidation of hydroxymethylpyrene isomers, Manuskript.

Kollock, R., Meinel, W., Schneider, H., Batke, M., Frank, H., Seidel, A., & Glatt, H. Oxidation and reduction of alcohols and aldehydes derived from methyl- and dimethylpyrene isomers by human alcohol dehydrogenases, Manuskript.

Kollock, R., Rost, K., Batke, M., Donath, C., & Glatt, H. Pentachlorophenol is a potent inhibitor of human alcohol dehydrogenases, particularly of hADH2 and 3, Manuskript.

Kollock, R., Rost, K., & Glatt, H. Human alcoholdehydrogenases and aldehyde dehydrogenases in the metabolism of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural (HMF), in Vorbereitung.

Rost, K., Kollock, R., Frank, H., Seidel, A., & Glatt, H. Oxidation of aldehydes derived from methyl- and dimethylpyrenes by human aldehyde dehydrogenases 2 and 3A1. Kinetic evidence for the particular importance of hALDH2 in the detoxification of methylated pyrenes, Manuskript.

7.2 Tagungsbeiträge

Kollock, R., Meinel, W., Schneider, H., & Glatt, H. (2005). Oxidation of benzylic alcohols derived from alkylated polycyclic hydrocarbons (alk-PAH) by human alcohol dehydrogenases, *GBM Annual Fall Meeting*. Berlin (Deutschland), Sept. 18-21.

Ma-Hock, L., Hollnagel, H., Langheinrich, C., Stephani, M., Kollock, R., Seidel, A., & Glatt, H. (2005). Co-administration of ethanol or an alcohol dehydrogenase inhibitor dramatically enhances the DNA adduct formation by 1-hydroxymethylpyrene in the rat *in vivo*, *9th International Conference on Environmental Mutagens*. San Francisco (USA), Sept. 3-9.

Lebenslauf

Name: Ronny Kollock
Geburtsdatum: 23.04.1978
Geburtsort: Brandenburg an der Havel

Schulische Ausbildung

1984-1991 Polytechnische Oberschule „Geschwister Scholl“, Brandenburg an der Havel, OT Plaue
1991-1997 Bertolt-Brecht-Gymnasium, Brandenburg an der Havel

Grundwehrdienst

1997-1998 Henning-von-Treskow-Kaserne, Geltow

Universitäre Ausbildung

1998-2003 Studium der Ernährungswissenschaft (Diplom), Universität Potsdam
2002-2003 Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema „Genotyp-Phänotyp-korrelationen der humanen Sulfotransferase 1A1: Untersuchungen in Blutzellen und *in vivo*“, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke, Abteilung Ernährungstoxikologie
seit 2003 Anfertigung der Dissertation, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke, Abteilung Ernährungstoxikologie

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Hansruedi Glatt für das interessante Thema, dass ich in den vergangenen vier Jahren bearbeiten durfte, und für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten in den Laboren der Arbeitsgruppe.

Herrn Dr. Walter Meinel für die umfassende Betreuung und die vielen fachlichen Diskussionen und Anregungen, die insbesondere in der Anfangsphase von unschätzbarem Wert für das Gelingen dieser Arbeit waren.

Frau Katharina Rost für ihre hochmotivierte und zuverlässige Bearbeitung der Thematik der humanen Aldehyddehydrogenasen.

Herrn Dr. Heiko Schneider, Frau Monika Batke und Frau Martina Scholtyssek für die sehr hilfreiche fachliche und praktische Unterstützung bei den HPLC-Analysen.

Frau Jutta Schwenk und Frau Judith Duhse für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Zellkultur.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen weiteren Mitarbeitern der Abteilung Ernährungstoxikologie für die Kooperationsbereitschaft und das angenehme, freundliche Arbeitsklima bedanken.

Ferner gilt mein Dank:

Frau Elke Thom und ihrem Team für tierexperimentelle Arbeit bei der Herstellung der Antiseren.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Albrecht Seidel und seiner Arbeitsgruppe für die Synthese der alk-PAK-Derivate.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Harshadrai Rawel für die fachliche und praktische Unterstützung bei der Enzymreinigung, insbesondere für die Bereitstellung der FPLC-Anlage.

Erklärung zur Dissertation

Diese Arbeit entstand am Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke, in der Abteilung Ernährungstoxikologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hansruedi Glatt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der aufgeführten Mittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht.

Nuthetal, den

11.06.2007

Ronny Kollock

