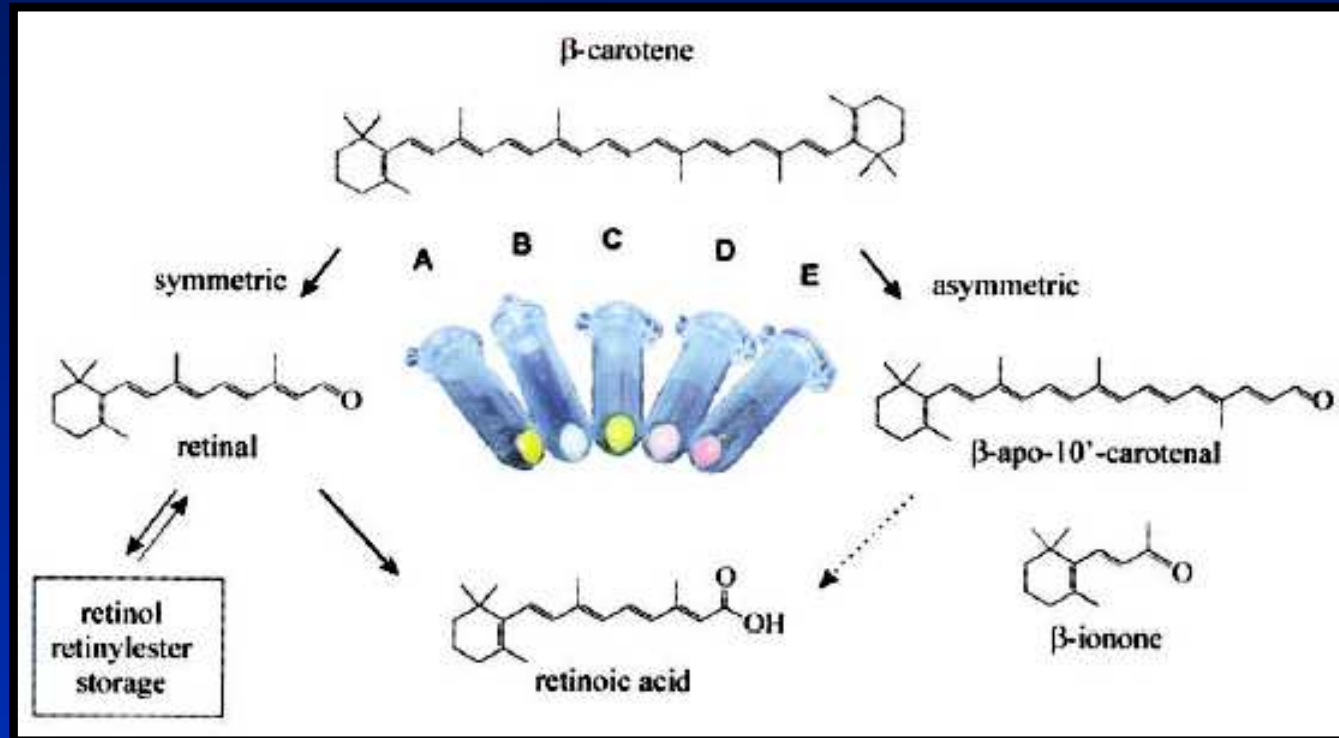


Biologie vitaminu A a jeho úloha ve fyziologii živočichů

E-mail: jipa@sci.muni.cz

Tel: 532 146 223 / 116

KAROTENOIDY



 abscise acid	 retinoic acid	 retinal
 β-ionone	 retinal	 3-hydroxy-retinal
 safranal	 retinol	 3-hydroxy-retinol
 plants	 mammals	 arthropods

von Linting, 2006

RETINOIDY

- **Vitamin A** jsou obecně lipofilní látky podobné struktury a aktivity (**retinol, retinal, kyselina retinová**)
- Prekurzory retinoidů jsou karotenoidy, zejména β -karoten (~ 50 z >400 je využitelných)
- Nejdůležitějším derivátem je **kyselina retinová (RA)**, odvozená od **retinalu**

retinyl estery \leftrightarrow retinol \leftrightarrow retinal \leftrightarrow kyselina retinová
(vit. A) (RA – retinoic acid)

- Tělo je přijímá v potravě, karotenoidy v rostlinné, vitamin A a jeho deriváty v živočišné

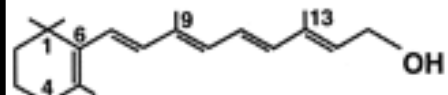
Retinol equivalent (RE) = retinol v potravě (μg) + $\frac{\beta\text{-karoten } (\mu\text{g})}{6}$ + $\frac{\text{ostatní karotenoidy } (\mu\text{g})}{12}$

RE u žen ~ 800 μg na den

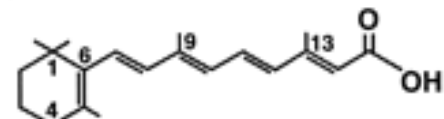
RE u mužů ~ 1000 μg na den

STRUKTURY NEJBĚŽNĚJŠÍCH PŘIROZENÝCH RETINOIDŮ

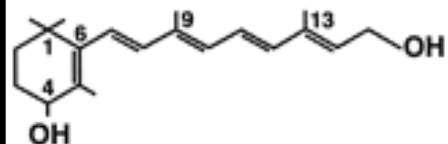
Natural Retinoids



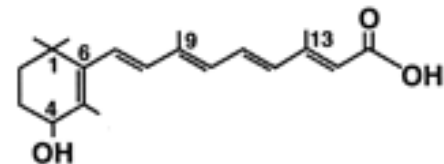
RETINOL (Vitamin A)



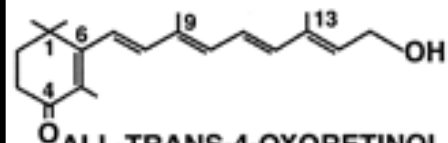
ALL-TRANS-RETINOIC ACID



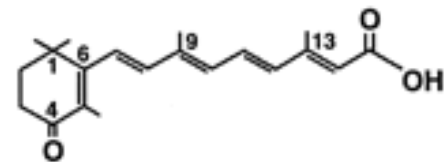
ALL-TRANS-4-HYDROXYRETINOL



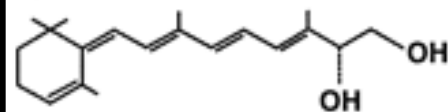
ALL-TRANS-4-HYDROXYRETINOIC ACID



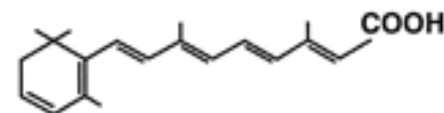
ALL-TRANS-4-OXORETINOL



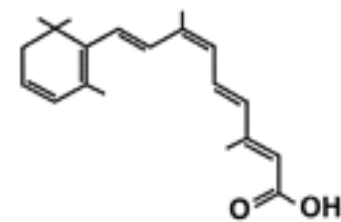
ALL-TRANS-4-OXORETINOIC ACID



14-HYDROXYL-4, 14-RETRORETINOL



3,4-DIDEHYDRORETINOIC ACID



9-CIS RETINOIC ACID

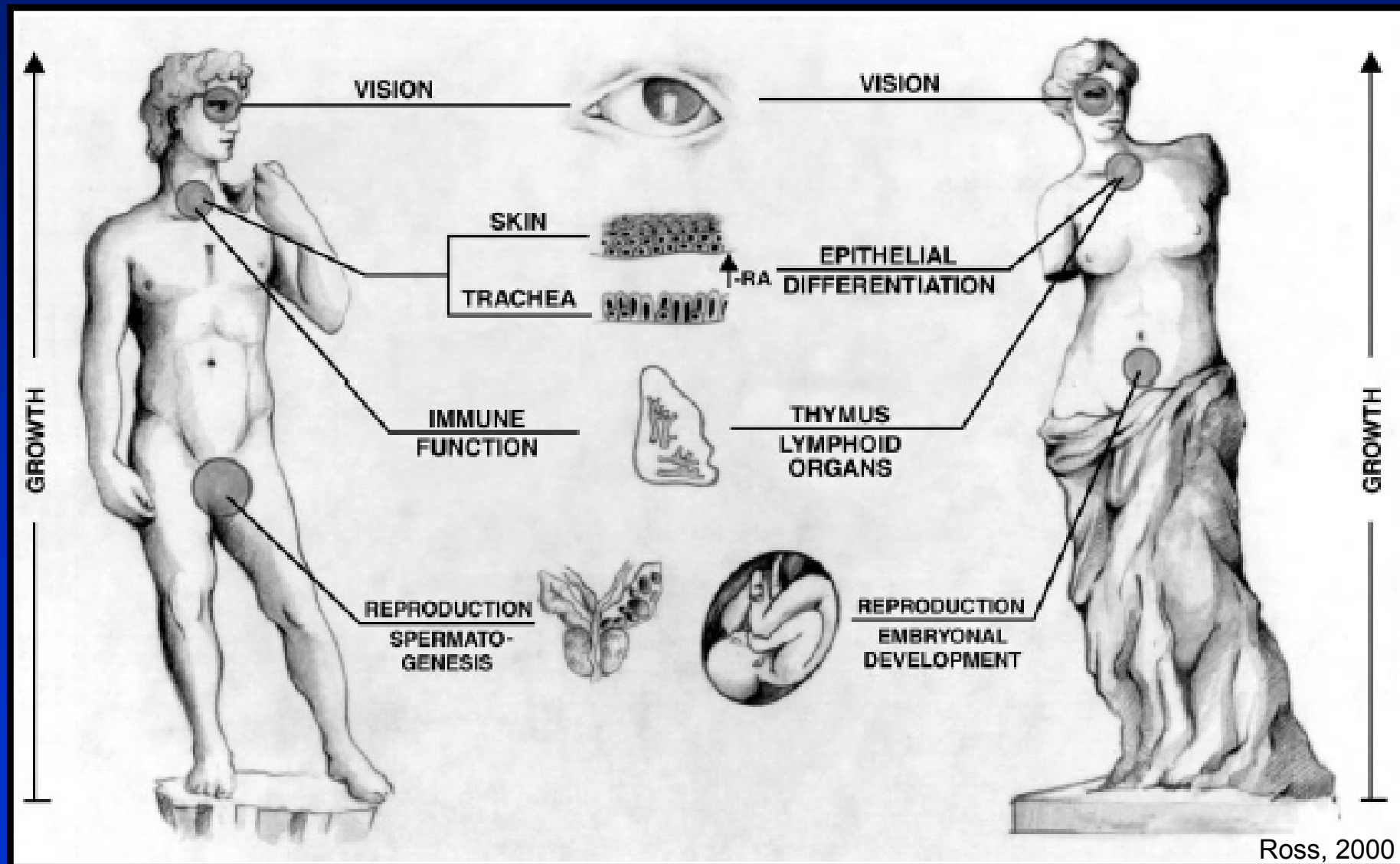
Distribuce retinoidů v organismu

- Resorbovány jsou v tenkém střevě, v enterocytech se karotenoidy mění na aktivní retinoidy (retinyl estery), s lipidy a dalšími lipofilními látkami tvořícími chylomikrony jsou uvoněny do lymfatického systému odkud se postupně uvolňují do celkového tělního oběhu. Zásoba je vytvářena v játrech (50-85% celkového) v lipidových kapénkách ve hvězdicovitých buňkách jater.
- 90% retinoidů je v těle v podobě retinyl esterů v lipidové složce chylomikronů, část jich může být i přímo v buněčných membránách.
- beta-karoteny mohou být uloženy navíc v tukové tkáni
- v případě potřeby (mobilizace zásob) je retinol uvolňován z jater do krve, vázaný s v hepatocytech syntetizovaným proteinem RBP (retinol vázající (binding) protein). Tento komplex (holo-RBP) se váže s transthyretinem (TTR, prealbumin), čímž je zabráněno vylučování retinolu v ledvinách. Takto v plasmě cirkulující retinol je připraven ke zpracování v cílových buňkách.
- K přeměně na koněčné funkční retinoidy dochází až v místě spotřeby.
Retinoidy tedy působí zejména autokrinně a parakrinně.

Výběr nejvýznamnějších oblastí vyžadujících metabolismus retinolu/vit.A

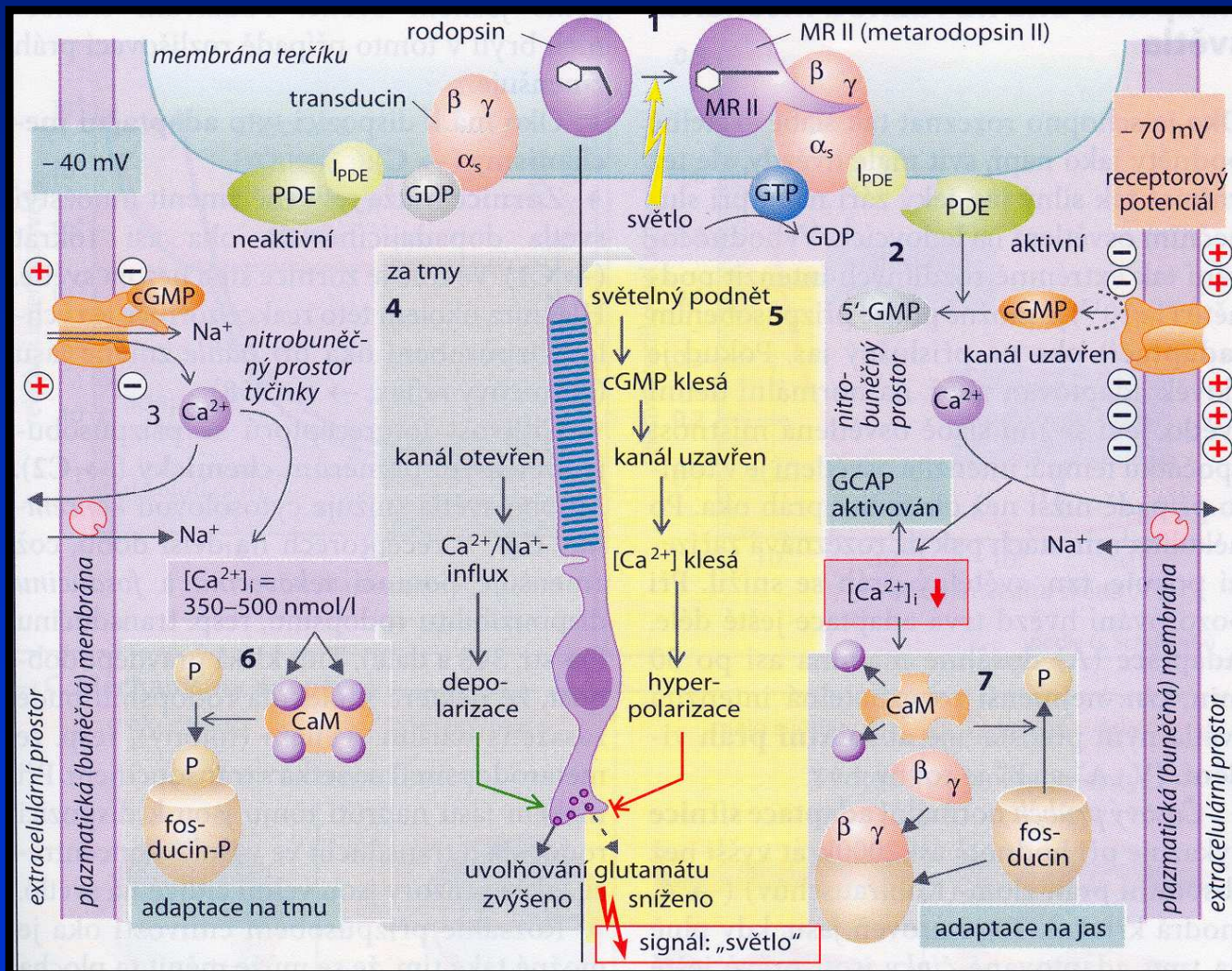
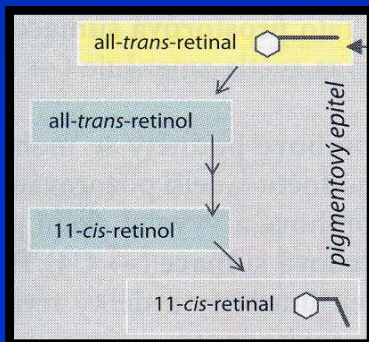
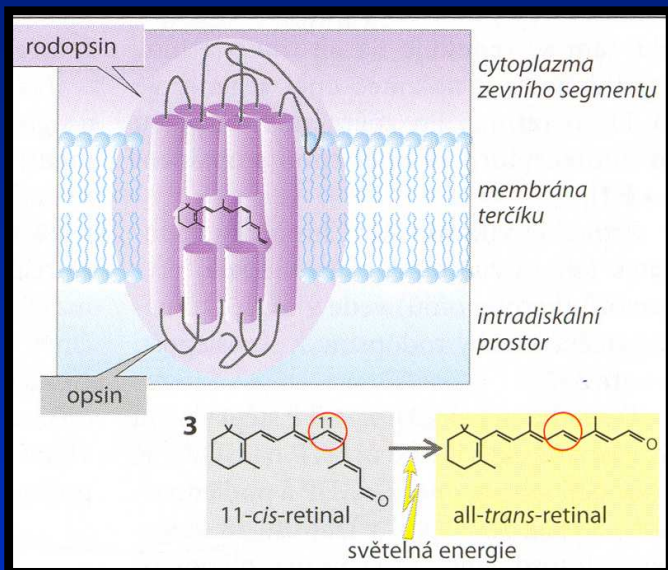
A) fotorecepce

B) růst a vývoj organismu



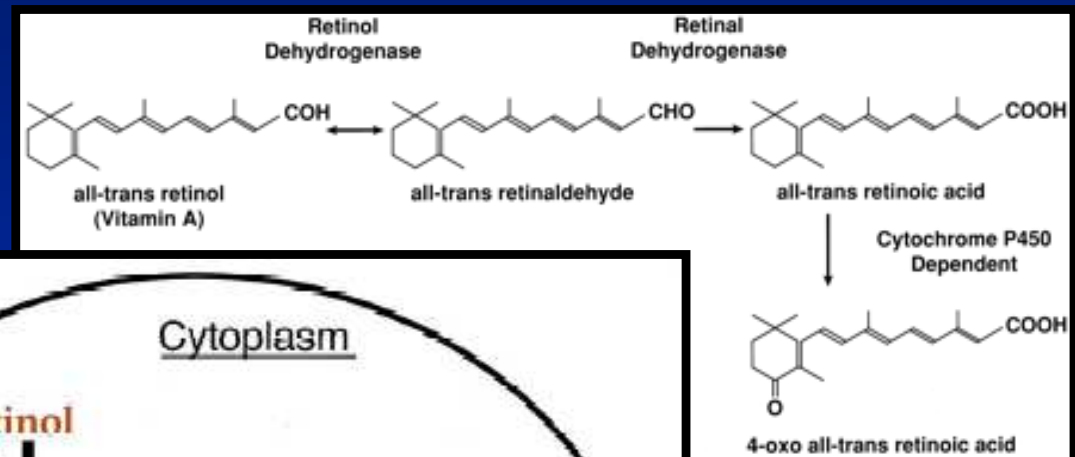
ÚLOHA RETINOIDŮ VE FOTORECEPCI

retinyl estery \leftrightarrow retinol \leftrightarrow retinal \leftrightarrow kyselina retinová
(vit. A) (RA – retinoic acid)

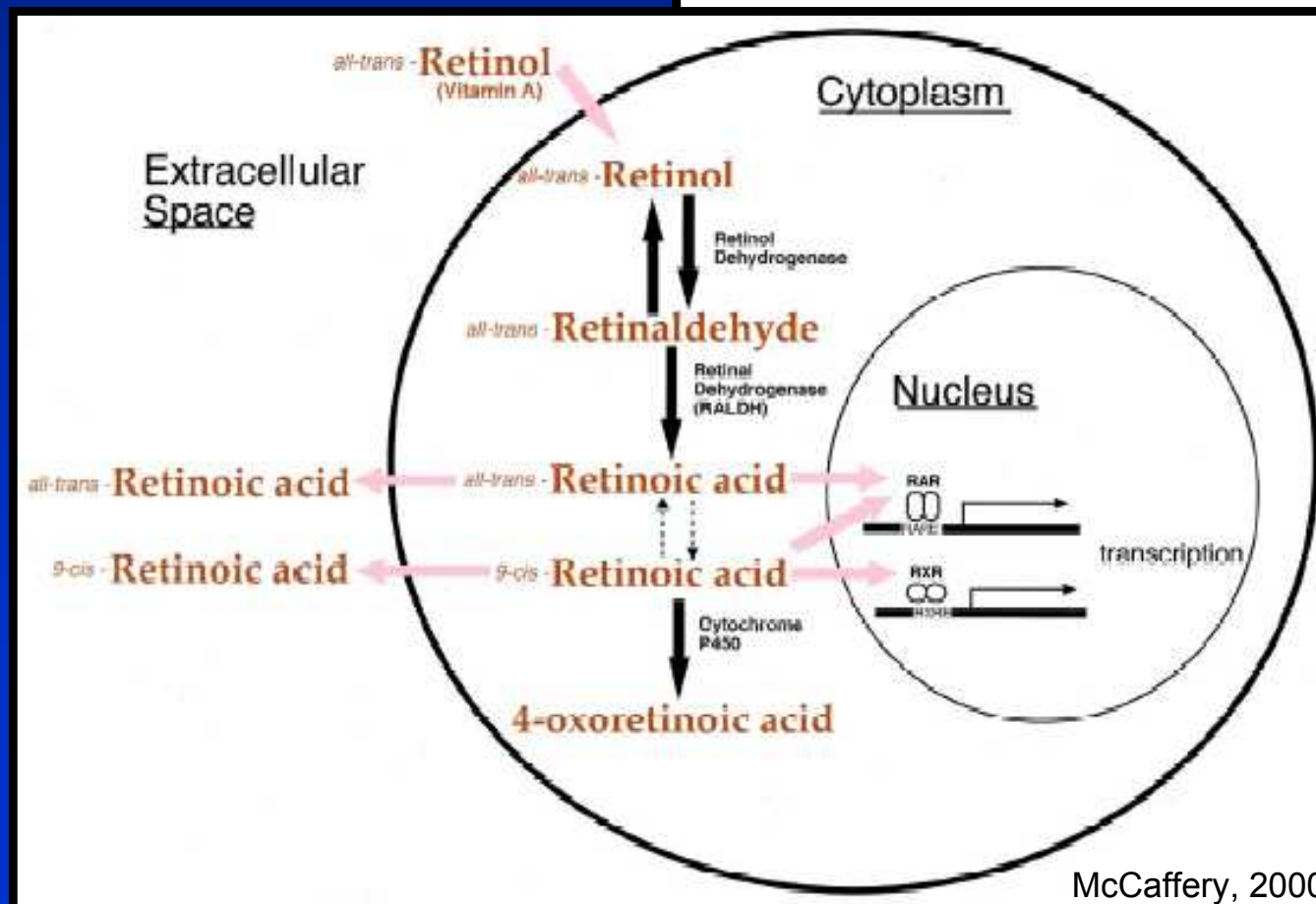


MECHANISMUS REGULACE RŮSTU A VÝVOJE ORGANISMU RETINOIDY

V regulaci ontogeneze je klíčovým retinoidem kyselina retinová – RA, a to její izoformy *all-trans* a *9-cis*.



Ross, 2000



McCaffery, 2000

Kyselina retinová (RA)

MORFOGEN & TERATOGEN

PLEIOTROPNÍ VLASTNOSTI

V průběhu embryonálního vývoje je metabolismus RA nezbytný zejména pro formování tělní osy a segmentaci (*Hox* geny), vývoj CNS, očí, srdce, ledvin, pohlavních orgánů, a epitelů obecně. U dospělců se pak podílí zejména na udržování homeostáze imunitního systému, epitelů a zrání pohlavních buněk (spermatogenezi).

Proteiny regulující účinky RA v buňce

a) Enzymy

Metabolismus retinoidů, zejména oxidace.

a) Retinoidy vázající proteiny

Zásoba v buňce, regulace jejich intracelulární koncentrace, transport.

a) Jaderné receptory RA (transkripční faktory)

Realizace transkripce na RA závislých i nezávislých genů.

ENZYMY metabolismu RA

ENZYMY - I

Retinol dehydrogenázy : oxidace RETINOLU -> RETINALALDEHYD

Dvě skupiny alkoholdehydrogenáz, třída I a IV. Přitom třída I se zdá málo významná pro metabolismus retinoidů, oproti třídě IV, kterou lze detekovat v oblastech intenzivního metabolismu retinoidů od 10 dpc. Pravděpodobně se ale uplatňují i membránově vázané alkohol dehydrogenázy (známe 2 co oxidují retinol), upřednostňují však pouze 9-cis isomery.

ENZYMY - II

2) Retinaldehyd dehydrogenázy : oxidace RETINALDEHYDŮ -> KYSELINU RETINOVOU

Tato reakce může být katalyzována i aldehyd nebo xanthin oxidázami, ale převážně je řízena retinaldehyd dehydrogenázami. Byly identifikovány 3 typy, RALDH, které s liší specifitou k retinaldehydům a distribucí v organismu.

RALDH1 (=AHD2, ALDH1) ačkoliv je relativně málo aktivní, je silně exprimován v retině, a tak prakticky všechna RA v retině je produktem tohoto enzymu. Dále je během embryogeneze exprimován ve středním mozku (mesencefalon) a v corpus striatum. Váže také androgeny a je možné, že tak zprostředkovává interakci mezi RA a androgenními jadernými receptory.

RALDH2 je vysoce selektivní k retinaldehydům. Začíná se exprimovat již v průběhu gastrulace a odpovídá za produkci RA ve všech tkáních závislých na RA (mozek - zejména motoneurony, mícha, srdce, ledviny, pohlavní orgány,...). RALDH2 $-/-$ embrya hynou v důsledku neuzavření nervové trubice a poruch ve vývoji srdce, přídatkem RA, lze tyto efekty potlačit.

RALDH3 (=V1) je sice vysoce aktivní enzym, ale málo specifický k oxidaci retinaldehydům. U časných embryí je exprimován ve ventrální části retiny a v gangliích koncového mozku (telencephalon). Později je přítomen zejména v játrech a kůži. Společně s RALDH1 u embryí katalyzuje přeměnu gamma-aminobutyraldehydu na GABA.

ENZYMY - III

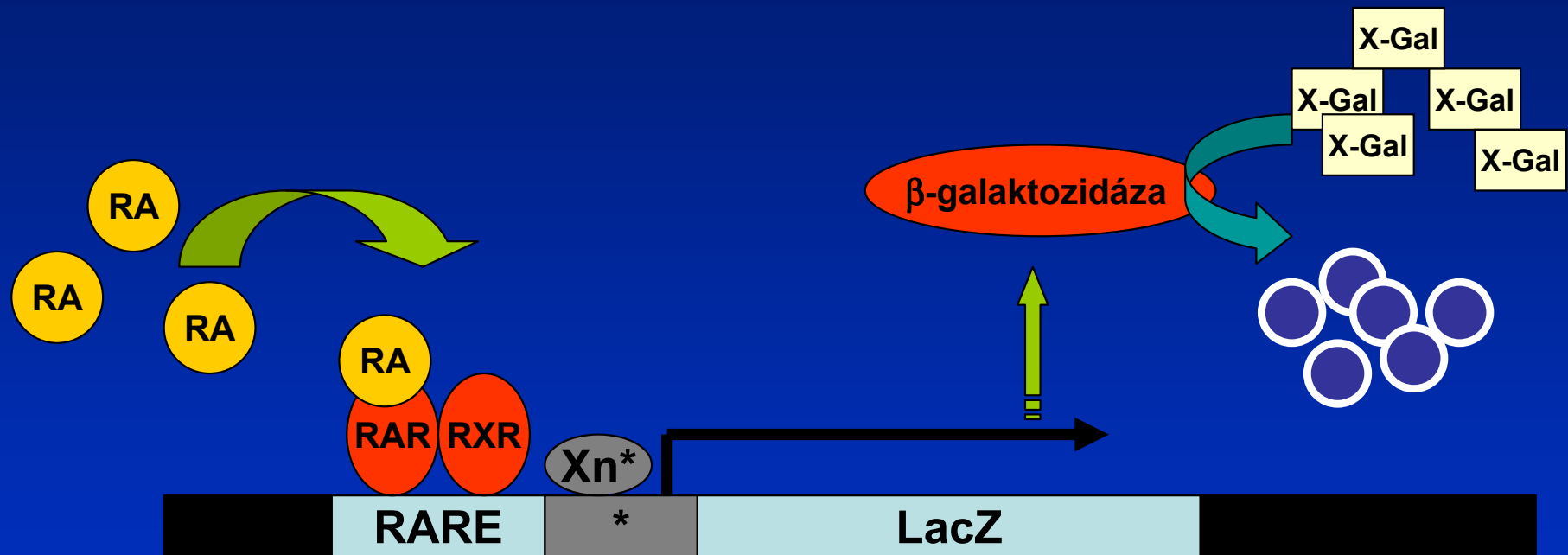
CYP26 (=P450RAI) : oxidace KYSELINY RETINOVÉ -> KYSELINU 4-OXORETINOVOU

(Hydroxyláza kyseliny retinové, dvě formy CYP26A1 a CYP26B1)

CYP26 je členem velké rodiny cytochromů P450. V současné době je jediným známým enzymem katabolizujícím RA. Exprese CYP26 je indukována RA, a je přítomen minimálně ve všech buňkách s metabolismem RA a v buňkách citlivých k působení RA. Jeho podíl na deaktivaci RA není však plně objasněno. Např. u žab, 4-oxoRA je silným aktivátorem receptorů RA a tak i buněčných regulací citlivých k RA.

Je pravděpodobné, že enzymů metabolizujících retinoidy je více, avšak s menším významem než výše jmenovaní. Jejich exprese, podobně jako syntéza RA je v průběhu embryonálního vývoje velice dynamická v závislosti na typu tkáně a vývojovém období. Obecně je souhra v jejich expresi a aktivitě nezbytná pro segmentaci (zejména regulace **Hox** genů) vyvíjejícího se embrya.

System pro detekci RA v buňkách/tkáních (RARE-LacZ reportér)

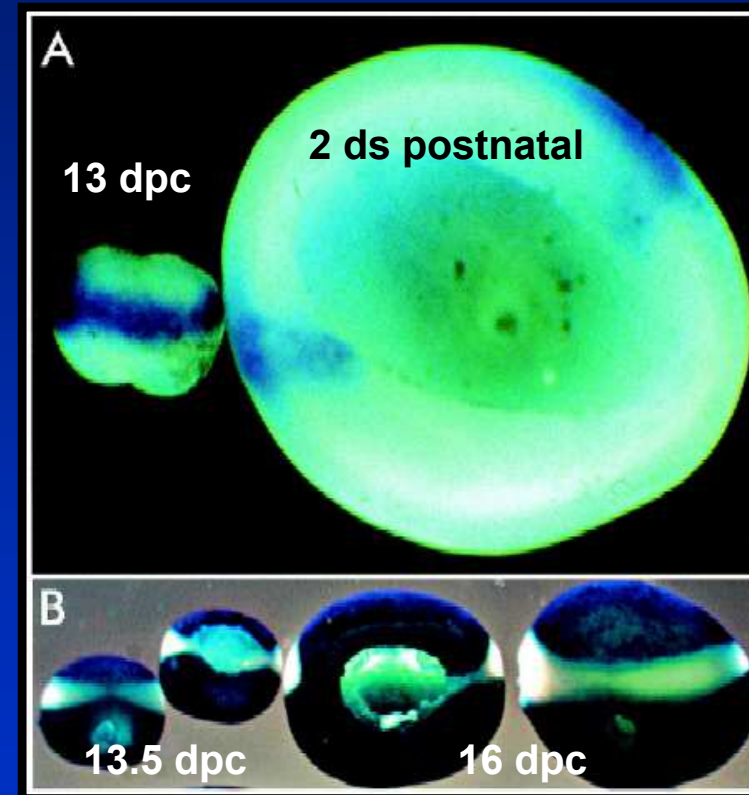
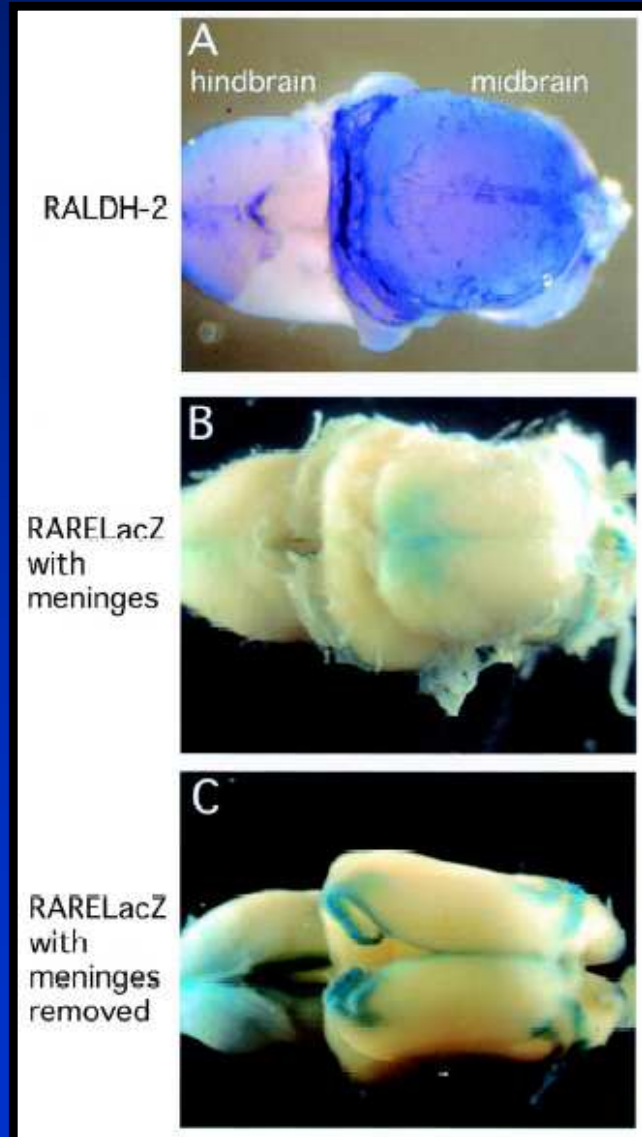


*další faktory/sekvence nezbytné pro funkci promotoru

Expres a aktivita RALDH-2 v mozku myšního embrya (16 dpc)

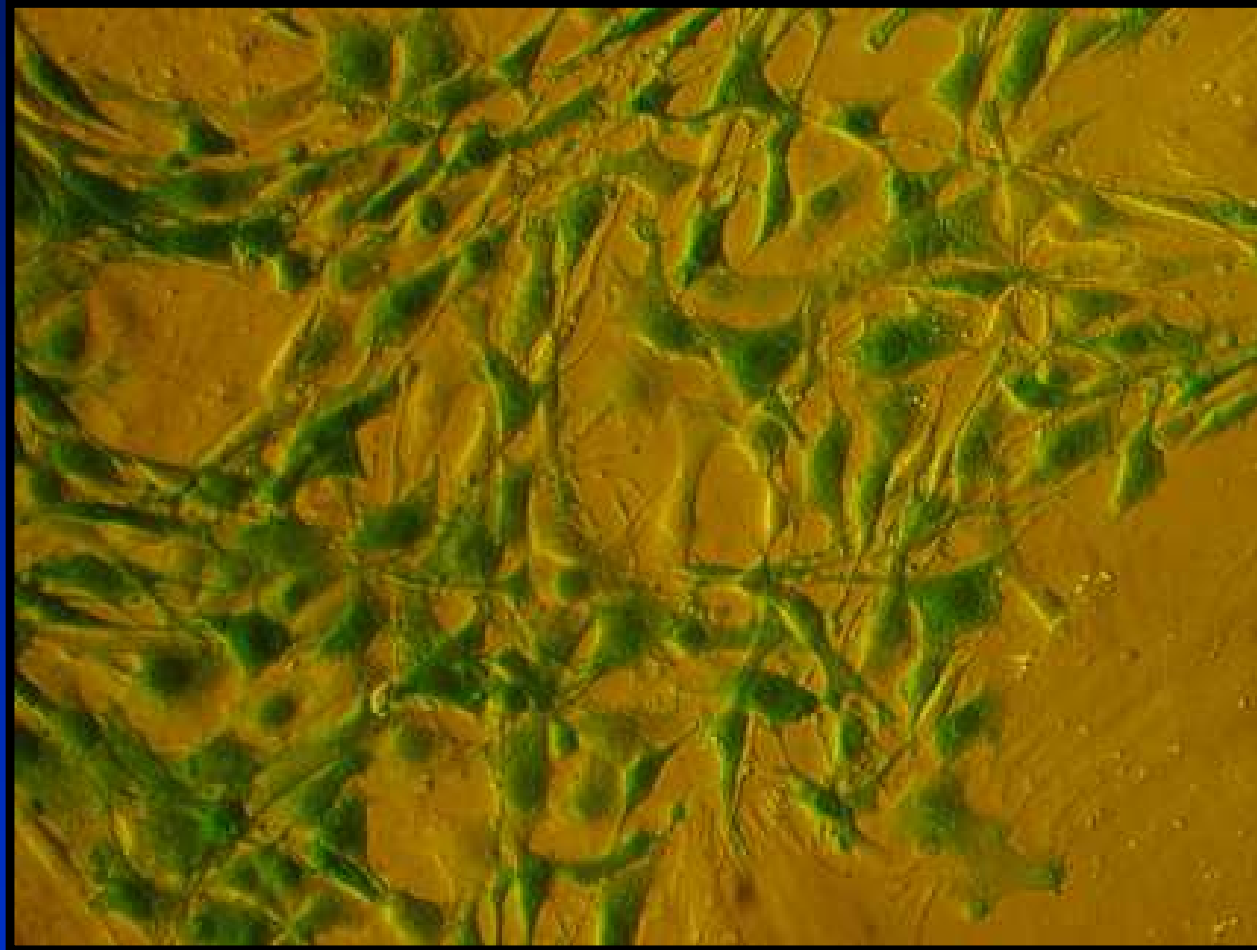
A) In situ hybridizace mRNA RALDH-2

B + C) RARE aktivita (RARE-LacZ reporter)



Detekce exprese CYP26 (in situ mRNA hybridizace) v retině (A) a RARE aktivita (RARE-LacZ reporter) v embryonální retině (čelní a zadní pohled)(B)

Ukázka stanovení LacZ na buněčné úrovni



Retinoidy vázající proteiny

1) Intracelulární

a) Buněčný retinol vázající protein (**CRBP – cellular retinol binding protein**)

Váže retinol i retinaldehyd a chrání je před oxidacemi a světlem. Retinol vázaný na CRBP-1 však může být oxidován na retinaldehyd retinol dehydrogenázou. Uvolněný retinaldehyd je pak přístupný pro oxidaci RALDH na RA.

b) Buněčný RA vázající protein (**CRABP – cellular RA binding protein**)

CRABP-I chrání RA před další metabolizací podobně jako CRABP-II, který je však přítomen nejen v cytoplasmě, ale i v jádře, asociuje s receptory pro RA a slouží tak i jako transkripční regulátor / kofaktor.

Je zajímavé, že absence **CRBP** a **CRABP** (knock-out myši) má minimální účinek na fenotyp organismu, na rozdíl od vypnutí některého z enzymů (viz. výše) nebo receptorů (viz. níže).

2) Vázané na membránu

Megalin (gp330 / LRP-2) - patří do rodiny LDL (low-density lipoprotein) receptorů.

Je exprimován v membránách zejména epiteliálních buněk a slouží jako receptor pro **RBP** a **retinol** (a také sonic hedgehog (**Shh**)). Megalin zprostředkovává transport retinolu (vázaného jak na RBP tak LDL) skrze vrstvy epiteliálních buněk, ale i do jejich intracelulárního prostoru. V ledvinách se podílí i na transportu dalších lipofilních vitaminů (např vit. D + vit. D vázající protein, vit. B12 + transcomalamin). Komplex ligand – megalin je pohlcen procesem endocytózy a vzniklý endosom cestuje buňkou na místo určení.

Receptory RA

Receptor RA = RAR = retinoic acid receptor (RAR α , RAR β , RAR γ + isoformy)

RAR je aktivovaný jak *all-trans* RA, tak *9-cis* RA

Receptor retinoidu X = RXR = retinoid X receptor (RXR α , RXR β , RXR γ + isoformy)

RXR je aktivovaný pouze *9-cis* RA

Gene	Major isoforms	Chromosomal location*		Ligand
		Human	Mouse	
RAR α	$\alpha 1, \alpha 2$	17q21.1	11D	} all-trans and 9-cis RA
RAR β	$\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4$	3p24	14	
RAR γ	$\gamma 1, \gamma 2$	12q13	15	
RXR α	$\alpha 1, \alpha 2$	9q34.3	2	} 9-cis RA
RXR β	$\beta 1, \beta 2$	6p21.3	17	
RXR γ	$\gamma 1, \gamma 2$	1q22-q23	1	

RA receptory patří do rodiny **jaderných receptorů** společně s **receptory thyroidních hormonů**, **receptorem vit. D**, receptory aktivujícími peroxisomové proliferátory (**PPARs**), jaterním X Receptorem (**LXR**), farsenoidovým receptorem (**FXR**) a se sirotčími (**orphan**) **receptory**. S těmi zde jmenovanými RXR tvoří také heterodimery regulující transkripci mnoha ontogeneticky významných genů.

Regulace genů řízených RA je zprostředkována jejími receptor, které zároveň slouží i jako transkripční faktory. Vytvářejí funkční homo (RAR/RAR, RXR/RXR) i heterodimery (RAR/RXR), přičemž heterodimery jsou výrazně transkripčně silnější/aktivnější. Jejich kombinace (48) jsou specifické pro konkrétní promotorové sekvence (response elements) v promotorech RA indukovaných genů.

Příklady promotorových sekvencí s RAR/RXR vazebnými místy

TABLE 1. *Natural retinoic acid response elements*

1) mRAR α 2	5'(-59)GGCGAGTTCAGCAAGAGTTCAGCCGA(-34)-3' (136)
2) hRAR α 2	5'(-58)GGCGAGTTCAGCGAGAGTTCAGCCGC(-33)-3' (174)
3) mRAR β 2	5'(-57)GAAGGGTTCACCGAAAAGTTCACTCGC(-32)-3' (273)
4) hRAR β 2	5'(-57)GTAGGGTTCACCGAAAAGTTCACTCGC(-32)-3' (45, 86)
5) hRAR γ 2	5'(-101)GGCCGGGTCAGGAGGAGGTGAGCCGGC(-375)-3' (174)
6) hADH3	5'(-280)ACAGGGGTCATTTCAGAGTTCAGTTTT(-305)-3' (59)
7) mCRBPI	5'(-1015)TAGTAGGTCAAAAAGGTCAGACAC(-993)-3' (299)
8) mLamBI	5'(-432)GAGGTGAGCTAGGTTAAGCCCTTAGAA AAAGGGTCAA(-468)-3' (290, 291)
9) h α oAI	5'(-192)AGGGCAGGGGTCAAGGGTTCAGTGGG(-217)-3' (238)
10) mCP-H	5'(-147)CAGCAGGTCACTGACAGGGCATAGTA(-122)-3' (196)
11) rCRBPII	5'(-639)GCTGTACAGGTACAGGTAC AGGTACAGTTCA(-605)-3' (162)
12) hMCAD	5'(-341)GGGTTTACCTTTCTCTCC GGGTAAAGGTGAAGG(-308)-3' 3'- CCCAAACCTGGAAAGAGAGGGCCCATTTCCACTTCC-5' (228)
13) hLactoferrin composite element	
RARE	5'(-351)AAGTGT <u>CA</u> CAGGTCAAGGTAACCCAC(-326) (132)
ERE	TTCACAGTGTCCAGTTCATTGGGTG
14) mCRABPII	
RARE1	5'(-1162)CCCCAGTTCACCAGGTCAAGGGCT(-1140)-3' (61)
RARE2	5'(-657)CTGTGACCTCTGCCCTTCT(-639)-3' (61)
15) rPEPCK	
RARE1	5'(-451)TGACCTTTGGCCGTGGGA(-434)-3' (143)
RARE2	5'(-351)GATCCGTCCCGGCCAGCCCTGTCTT TGACCCCCACCTGACAATTAAGGCAAGAGCCT(-295)-3 (244, 274)
16) mTGase (mTGRRE1)	5'(-1703)CATGGGGGTCACTGTGAGAGGTCCCAG TGGGGTCAAGGATTA(-1751)-3' antisense (199)
17) mHox1.6	3'-enhancer 5'-(Sac-74)CAGGTTTACCGAAAAGTTCAAG(Sac-55)-3' (128)
18) mHoxb-1	3'-enhancer 5'-CTTAGAGGTA AAAAGGTCAGCCCAG-3' (169, 269)
19) mHoxb-1	5'-repressor 5'-AGGGCAAGAGTTCA-3' (169, 269)
20) mSTAT1	5'(-274)TCGAGATGGGTCAAGGTGATAAC(-252)-3' (114)
21) rDopamine D ₂ receptor	5'(-71)CCTCG TGGCCAGGGTGACCCC(-51)-3' (288)

Consensus

5'-	G	T				A	T				A-3'	
	G	T	C	A	(X)	G	T	C				
	A	G				G	G					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6

Srovnání některých defektů vyvolaných nedostatkem RA (RAD), oproti vyřazení jednotlivých receptů RAR nebo RXR

	RAD	RAR α / γ	RAR α / β 2	RAR β 2/ γ (2)	RXR α	RAR α /RXR α	RAR γ /RXR α
Eye							
Microphthalmia	+	+ ^a	-	-	+ ^a	NR ^a	+ ^a
Lens elongation/fiber anomaly	+	+ ^b	-	-	-	-	-
Lens cell apoptosis	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Neural retina apoptosis	+	NR	NR	+	NR	NR	NR
Intraretinal gap	+	+ ^c	-	+ ^c	-	\pm ^c	\pm ^c
Absent choroid fissure	+	-	-	-	-	-	-
Thickened precorneal stroma	+	+	-	+ ^d	+	-	+
Heart defects							
Abnormal limb shape	+	+	-	-	-	-	-
Absent tracheal-esophageal septum	+	-	+	-	-	-	-
Absent cranial flexure	+	-	NR	NR	NR	NR	NR
Head and nervous system							
Hindbrain defects	+	+ ^e	-	-	NR	NR	NR
Frontonasal hypoplasia, cell death	+	+	-	-	-	-	-
Mandibular hypoplasia, cell death	\pm	-	-	-	-	-	-
Cranial nerve hypoplasia, absence	+	+ ^f	-	-	NR	NR	NR
Brain hypoplasia	+ ^g	+ ^h	-	-	-	-	-

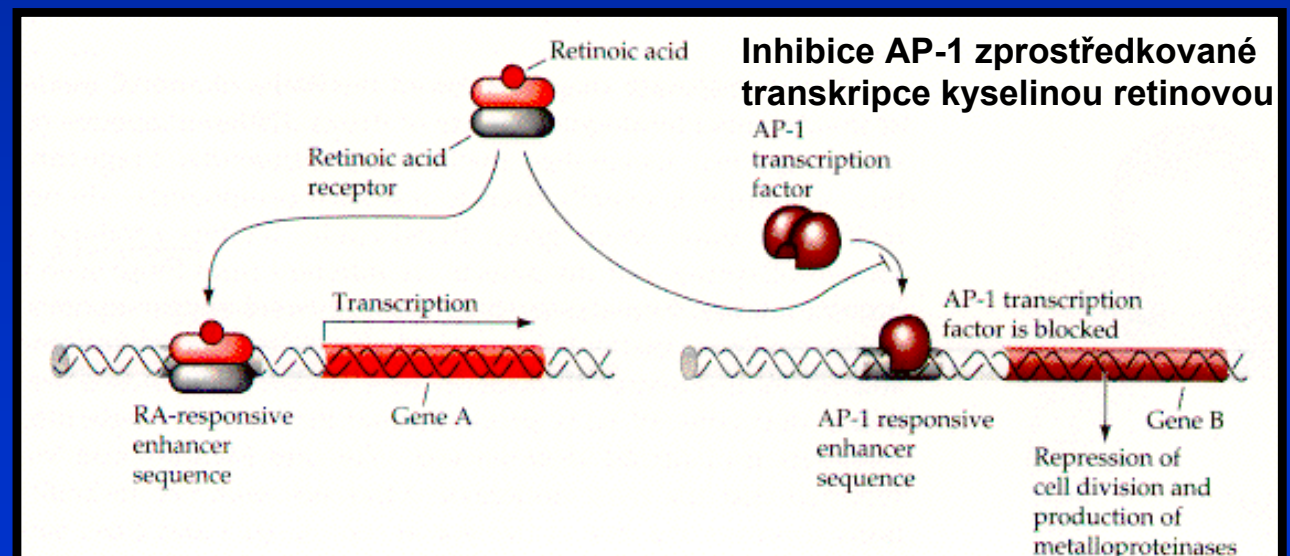
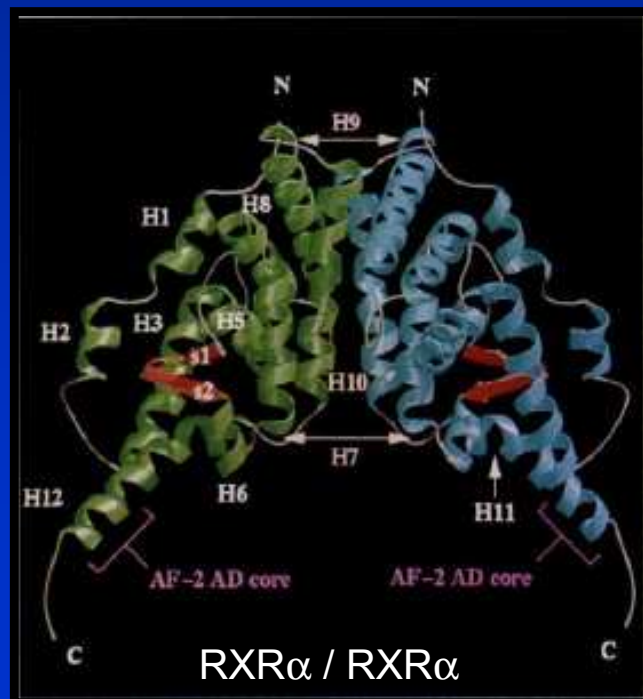
NR, not reported or assessed. ^a Also smaller ventral retina. ^b Not detailed; one instance of absent lens. ^c \pm indicates retinal eversion, no obvious gap. ^d Poorly differentiated. ^e Open rhombencephalon. ^f Motor nuclei of CNVI only. ^g Thinning of marginal layer. ^h Small cerebral hemispheres, collapsed ventricles. [Data from Smith and co-workers (47, 258), Grondona et al. (75a), Kastner et al. (98), Lohnes and co-workers (139, 140), Mendelsohn et al. (183), and Sucov et al. (271).]

Ross, 2000

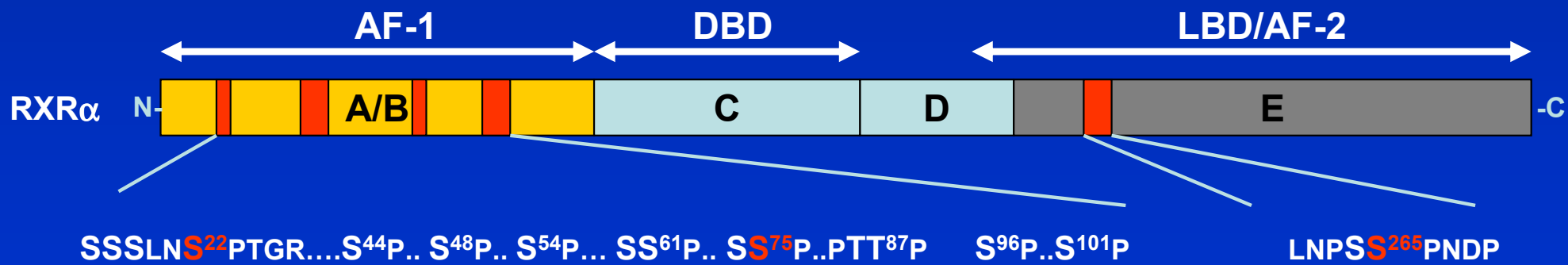
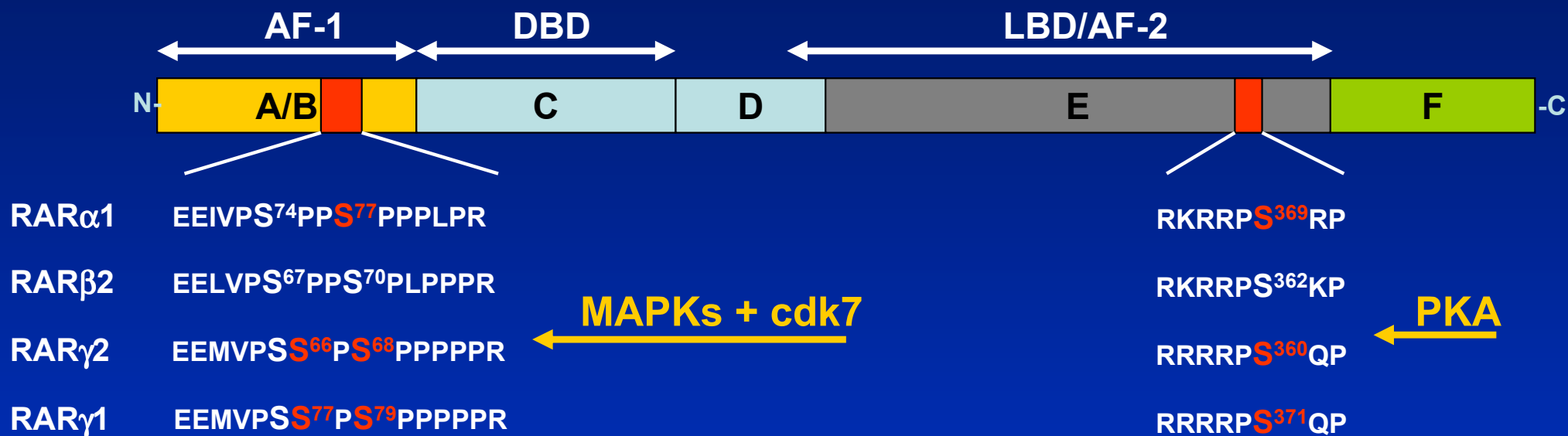
Obecně vyřazení jednotlivých isoform receptorů (homozygoti -/- RAR α 1, RA β 2 nebo RAR γ 2) nemá žádný zásadní účinek na fenotyp takových zvířat. Po vyřazením jednotlivých subtypů, však již můžeme pozorovat různé malformace a nedostatečnosti. Z RAR se jeví nejvýznamnější RAR γ . Větší účinek má vyřazení RXR, které je způsobeno pravděpodobně jejich úlohou při vytváření heterodimerů s ostatními jadernými receptory. RXR α -/-, hyne 13.5-16.5 dpc, z důvodu nedostatečně vyvinutého srdce, má také nedostatečně vyvinuté oči. RXR β -/- je viabilní ale samci jsou sterilní.

Interakce transkripční aktivity RA a některých drah transdukce signálu

Aktivní komplex **RAR/RXR** v mnoha případech působí jako represor v promotorech rozpoznávaných také **AP-1** (Jun/Fos komplexy) a **Smad** proteiny (TGF β rodina). Na druhou stranu, aktivita RA receptorů může být modifikována jejich fosforylací na serinových a threoninových zbytcích **serin/threonin kinázami**. A to zejména **MAPK** kinázami (**Erk; JNK1,2; p38**), protein kinázou A (**PKA**) a na cyklinu H závislou **cdk7**. Tyto postranslační modifikace RA receptorů vedou k další variabilitě v možnostech regulovat RAR/RXR řízenou transkripci jak pozitivně, tak negativně a to i za nepřítomnosti ligandu (RA). Modifikují, zejména interakce s dalšími proteiny transkripčního komplexu. Některé fosforylace (např. p38 \rightarrow RAR γ) indukují degradaci daných receptorů



Serinové a threoninové zbytky fosforylované (■) u RAR/RXR receptorů, ukázány jsou i potencionálně fosforylovatelné (čísla)



AF-1 (A/B doména) – oblast regulující aktivaci transkripce, nezávisle na ligandu
 DBD (C doména) – DNA vázající doména (DNA-binding domain)
 LBD/AF-2 (D/E doména) – oblast regulující aktivaci transkripce, závislé na ligandu

Literatura ke studiu

1. Clagett-Dame, M., and L. A. Plum. 1997. Retinoid-Regulated Gene Expression in Neural Development. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 7:299-342.
2. Clagett-Dame, M., and H. F. DeLuca. 2002. The Role of Vitamin A in Mammalian Reproduction and Embryonic Development. *Annu. Rev. Nutr.* 22:347-381.
3. Maden, M., and M. Hind. 2003. Retinoic Acid, A Regeneration-Inducing Molecule. *Developmental Dynamics* 226:237-244.
4. McCaffery, P., and U. C. Drager. 2000. Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11:233-249.
5. McCarthy, R. A., and W. S. Argraves. 2003. Megalin and the neurodevelopmental biology of sonic hedgehog and retinol. *J. Cell Science* 116:955-960.
6. Napoli, J. L. 1999. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1440:139-162.
7. Rochette-Egly, C., and P. Chambon. 2001. F9 embryocarcinoma cells: a cell autonomous model to study the functional selectivity of RARs and RXRs in retinoid signaling. *Histol Histopathol* 16:909-922.
8. Ross, S. A., P. J. McCaffery, U. C. Drager, and L. M. De Luca. 2000. Retinoids in Embryonal Development. *Physiological Reviews* 80:1021-1054.