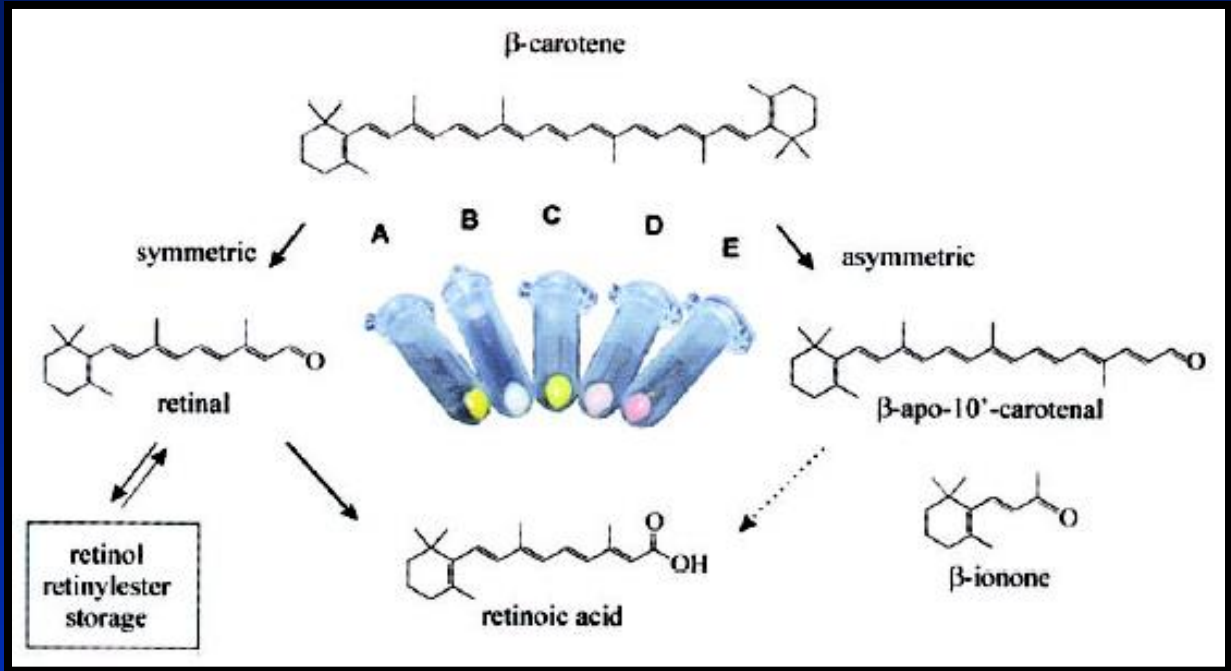


Biologie vitaminu A a jeho úloha ve fyziologii živočichů

E-mail: jipa@sci.muni.cz

Tel: 532 146 223 / 116

KAROTENOIDY



 abscisic acid β-ionone safranal	 retinoic acid retinal retinol	 retinal 3-hydroxy-retinal 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 (vit. A) \leftrightarrow retinal \leftrightarrow kyselina retinová (RA – retinoic acid)

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

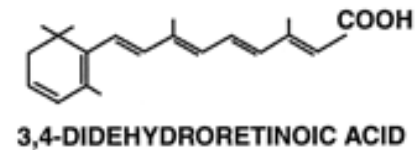
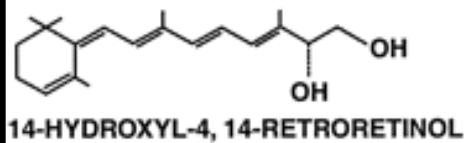
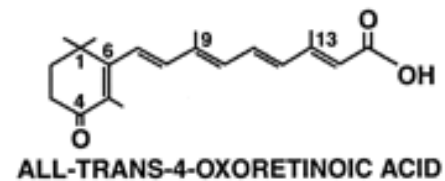
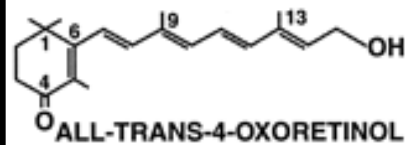
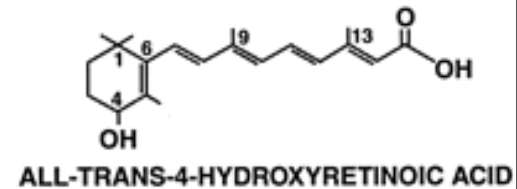
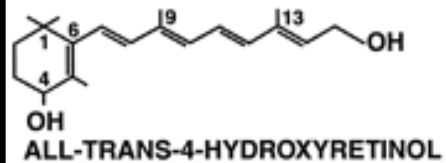
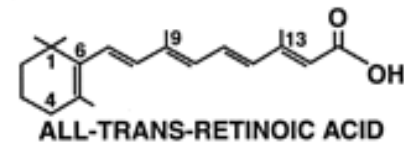
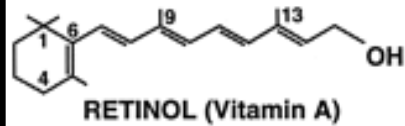
Retinol equivalent (RE) = retinol v potravě (μg) + $\frac{\beta\text{-karoten } (\mu\text{g})}{6}$ + $\frac{\text{ostatní karotenoidy } (\mu\text{g})}{12}$

RE u žen ~ 800 μg na den

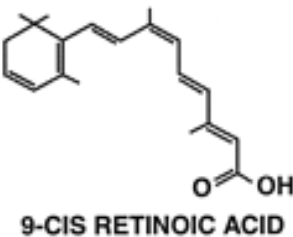
RE u mužů ~ 1000 μg na den

STRUKTURY NEJBĚŽNĚJŠÍCH PŘIROZENÝCH RETINOIDŮ

Natural Retinoids



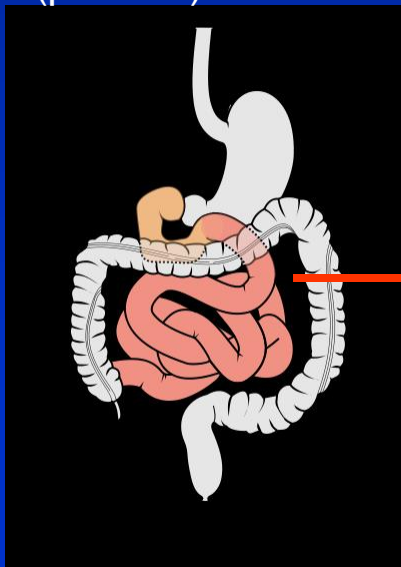
Ross, 2000



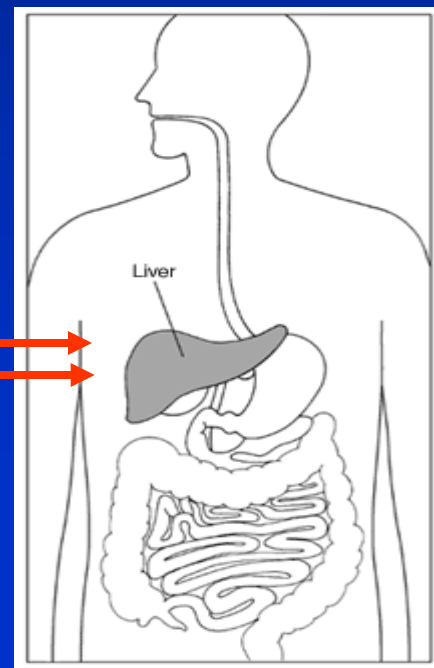
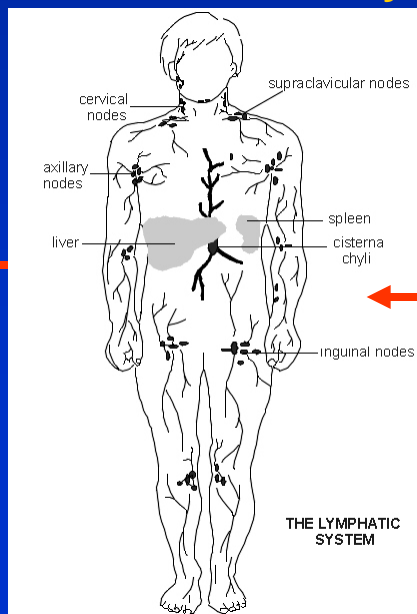
Distribuce retinoidů v organismu

Retinoidy jsou resorbovány v tenkém střevě, v enterocytech se karotenoidy mění na aktivní retinoidy (retinyl estery), s lipidy a dalšími lipofilními látkami tvořícími chylomikrony jsou uvozeny 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.

karoteny & retinoidy
(potrava)



retinyl estery



Distribuce retinoidů v organismu

- 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 navíc uloženy 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 !

Kyselina retinová (RA)

MORFOGEN & TERATOGEN

PLEIOTROPNÍ VLASTNOSTI

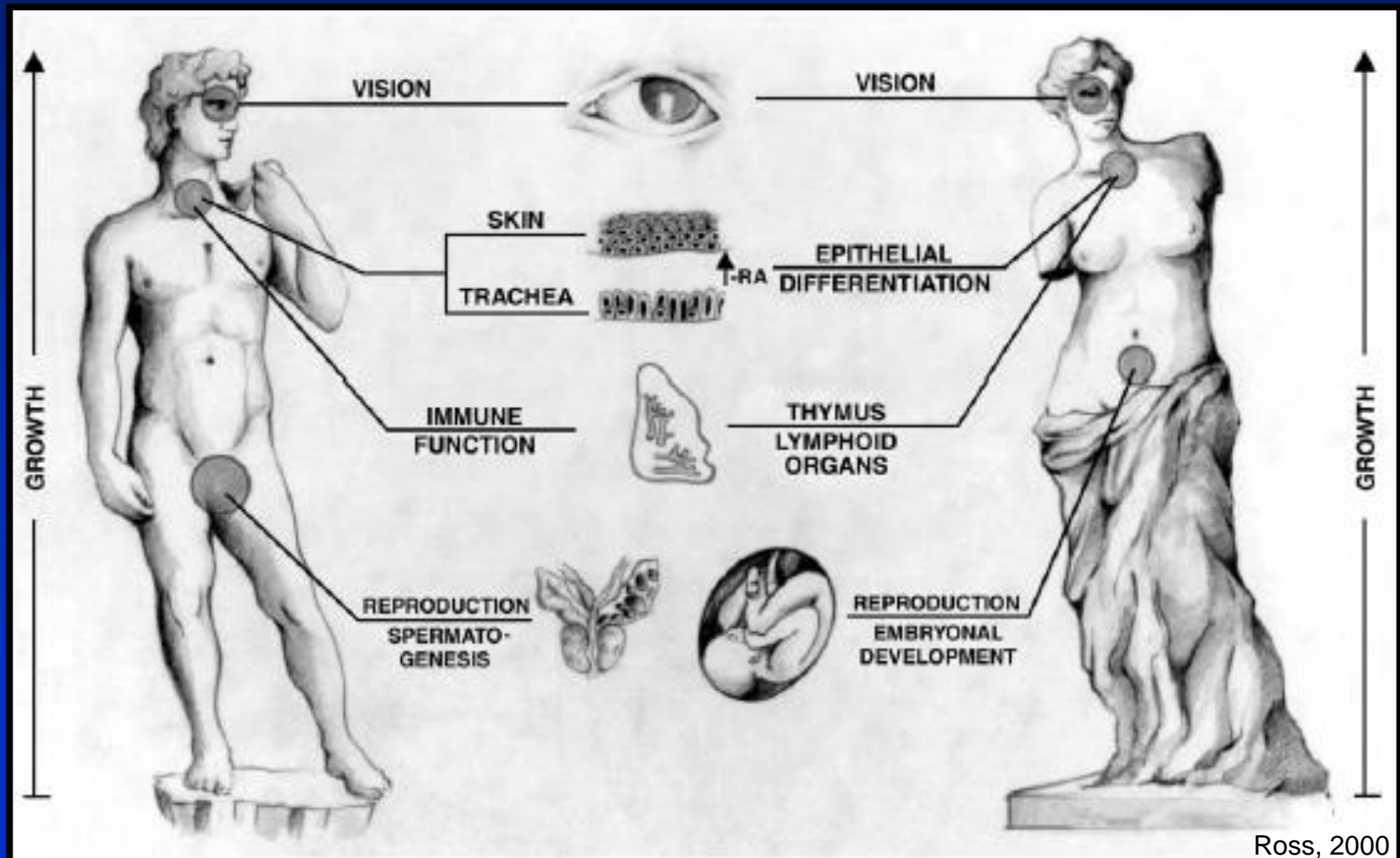
V průběhu embryonálního vývoje je metabolismus RA nezbytný zejména pro formování tělní osy a segmentaci (*Hox* geny), vývoj CNS, očí, srdce, ledvin, pohlavních orgánů, a epitelů obecně.

U dospělců se pak podílí zejména na udržování homeostáze imunitního systému, epitelů a zrání pohlavních buněk (spermatogenezi).

Výběr nejvýznamnějších oblastí vyžadujících metabolismus retinolu/vit.A

A) fotorecepce

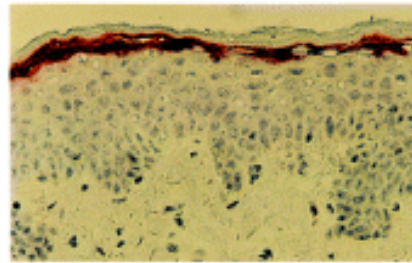
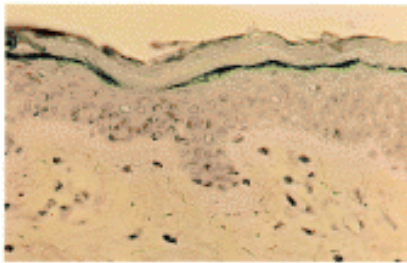
B) růst a vývoj organismu



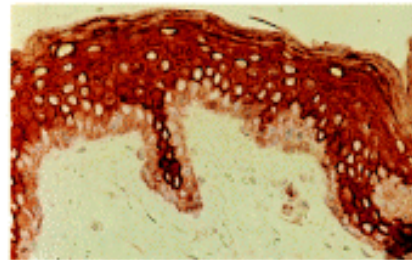
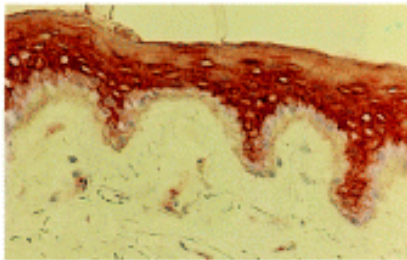
Control

All-trans RA

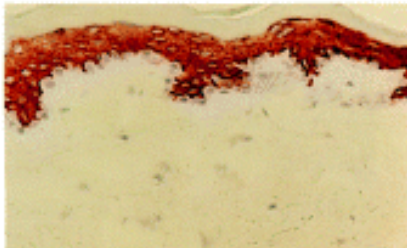
K4



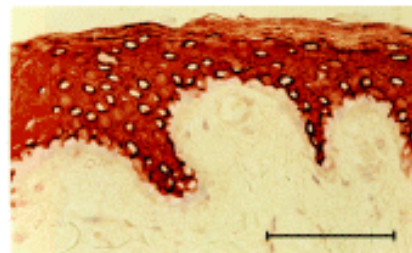
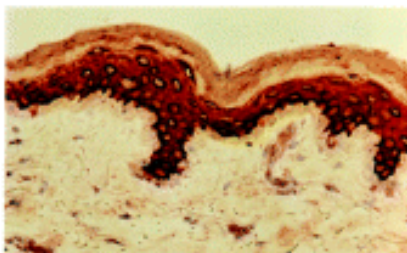
K2e



K1

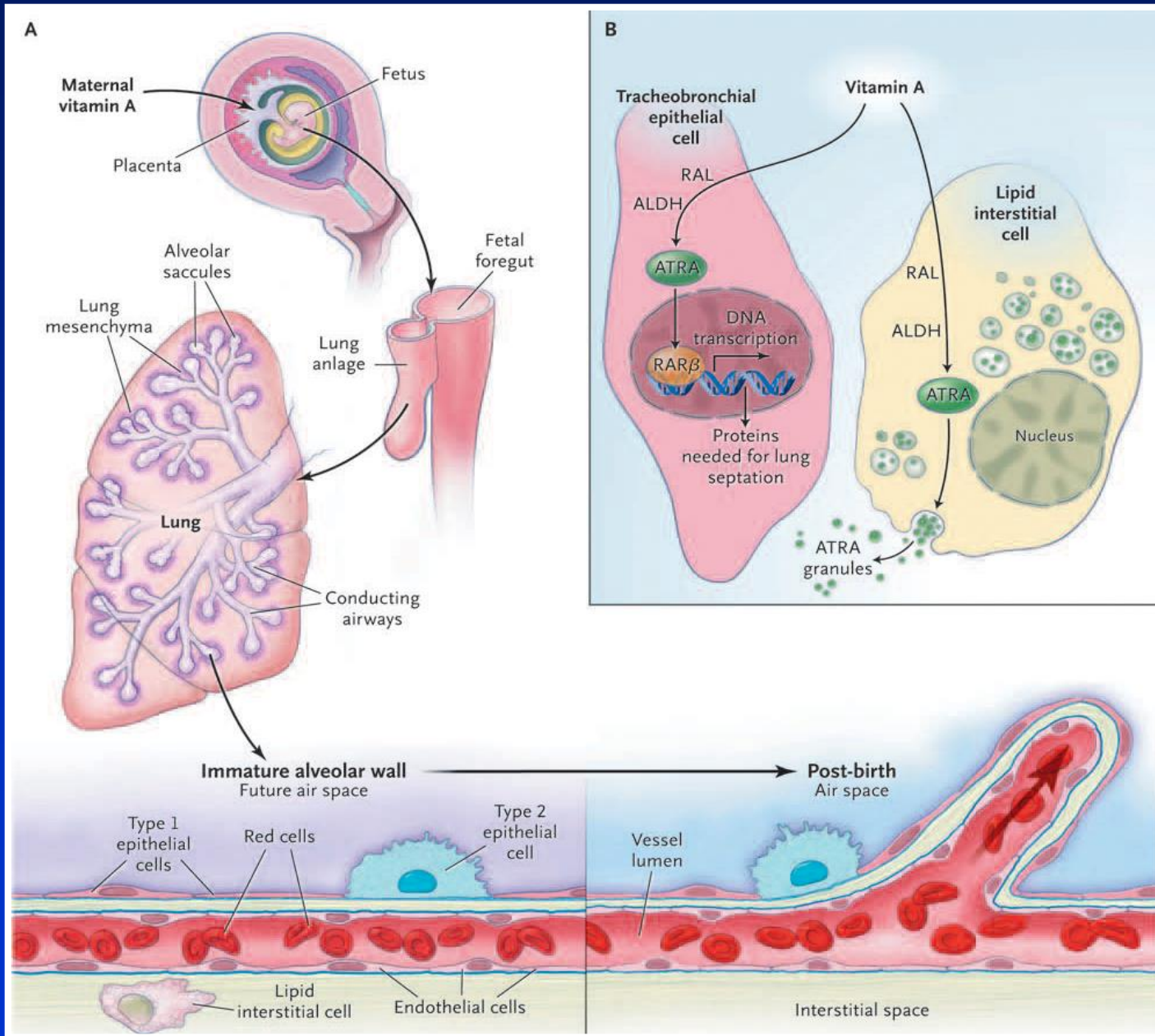


K10

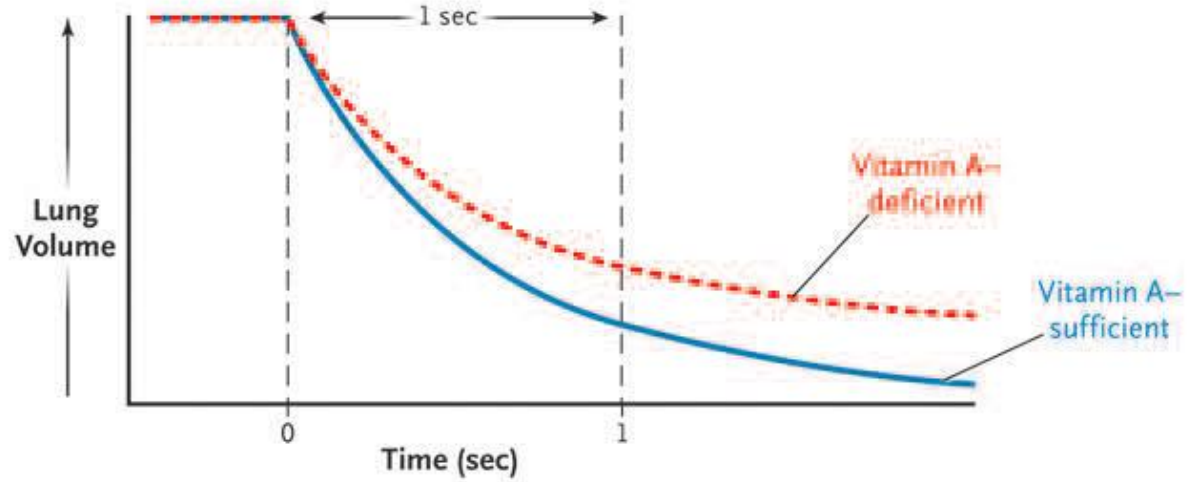
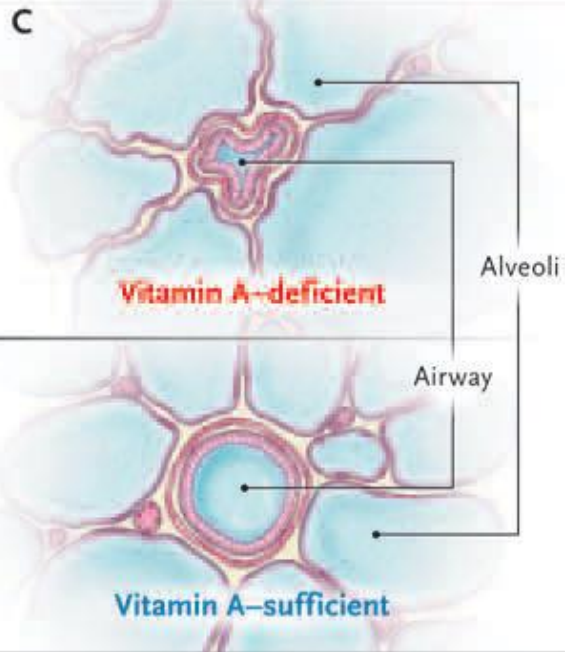


Účinek RA na epidermis

Úloha RA ve vývoji plic

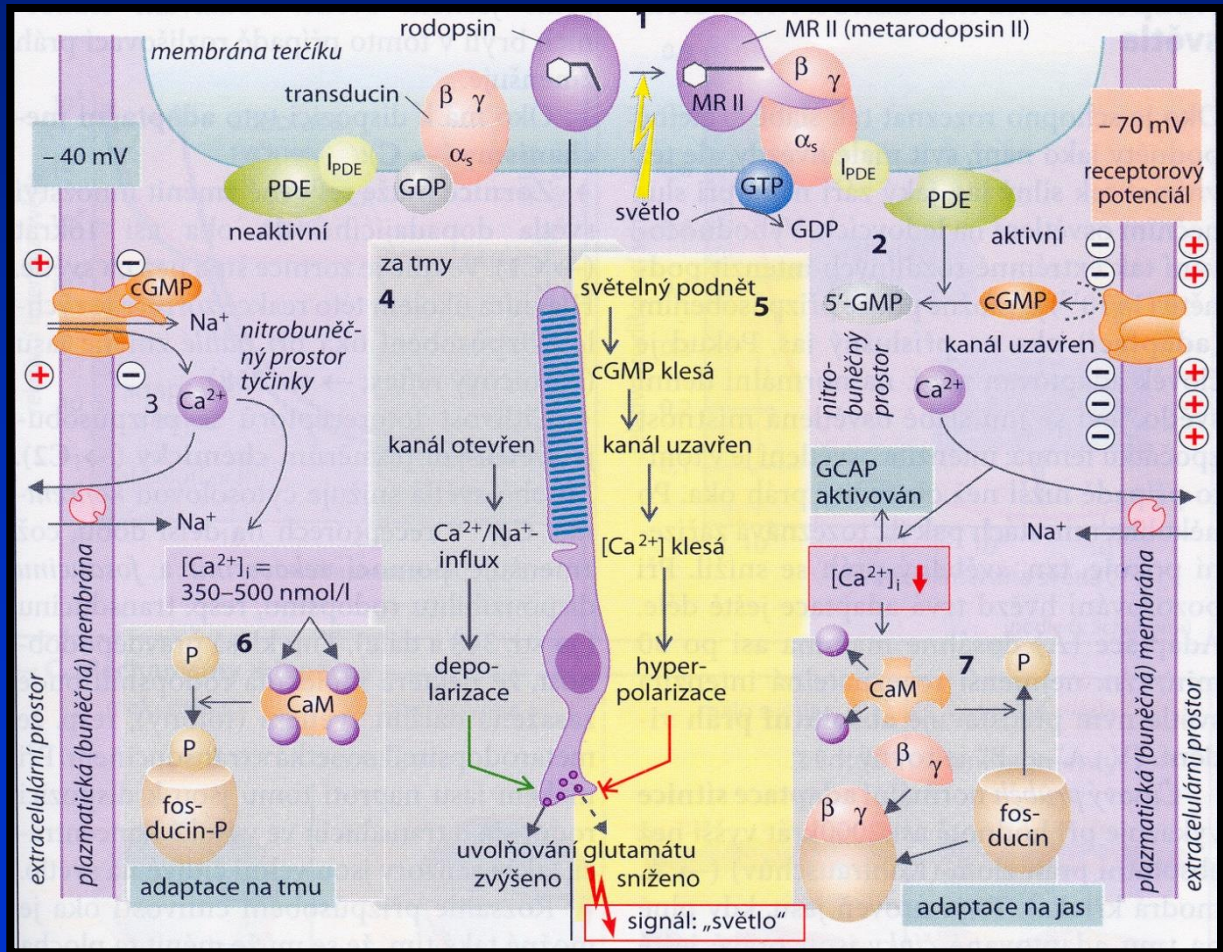
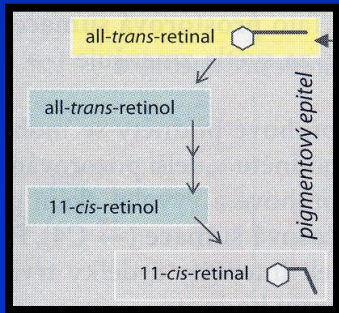
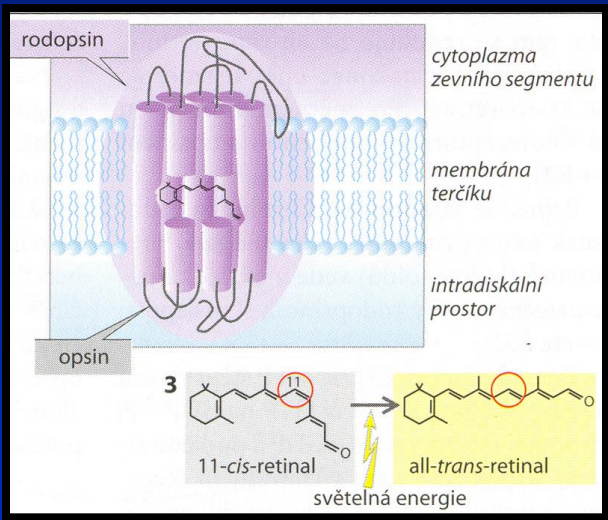


Úloha RA ve vývoji plic



ÚLOHA RETINOIDŮ VE FOTORECEPCI

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



Mechanismy regulující účinky RA v buňce

- proteiny jejího metabolismu

a) Enzymy

Metabolismus karotenoidů a retinoidů, zejména oxidace.

b) Retinoidy vázající proteiny

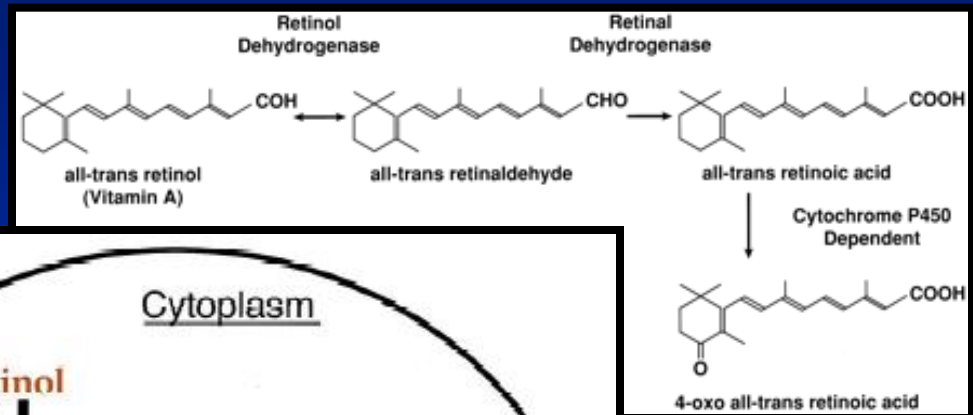
Zásoba v buňce, regulace jejich intracelulární koncentrace, transport.

c) Jaderné receptory RA (transkripční faktory)

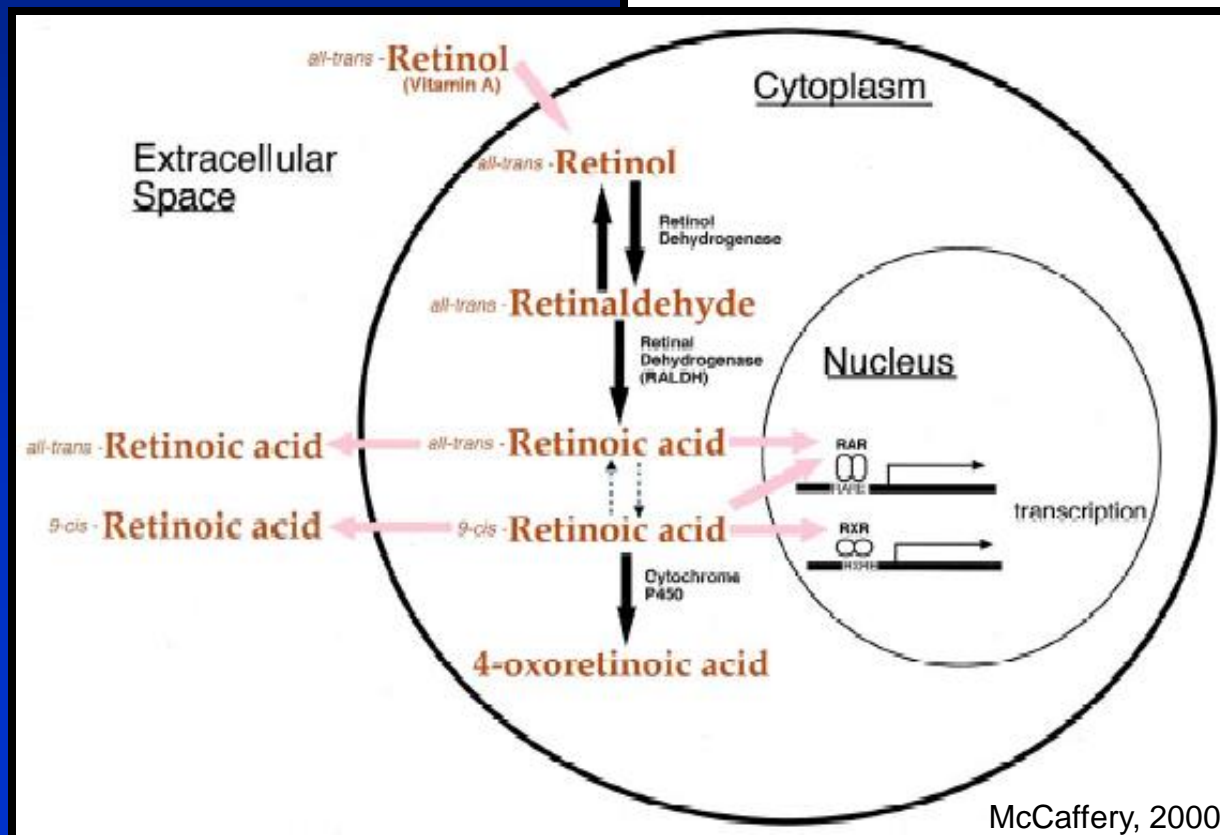
Realizace transkripce na RA závislých i nezávislých genů.

REGULACE RA na buněčné úrovni

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



Ross, 2000



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 (myš). 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 exprimována v retině, a tak prakticky všechna RA v retině je produktem tohoto enzymu. Dále je během embryogeneze exprimována 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, přidavkem RA, lze tyto efekty potlačit.

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

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 + transcobalamin). 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

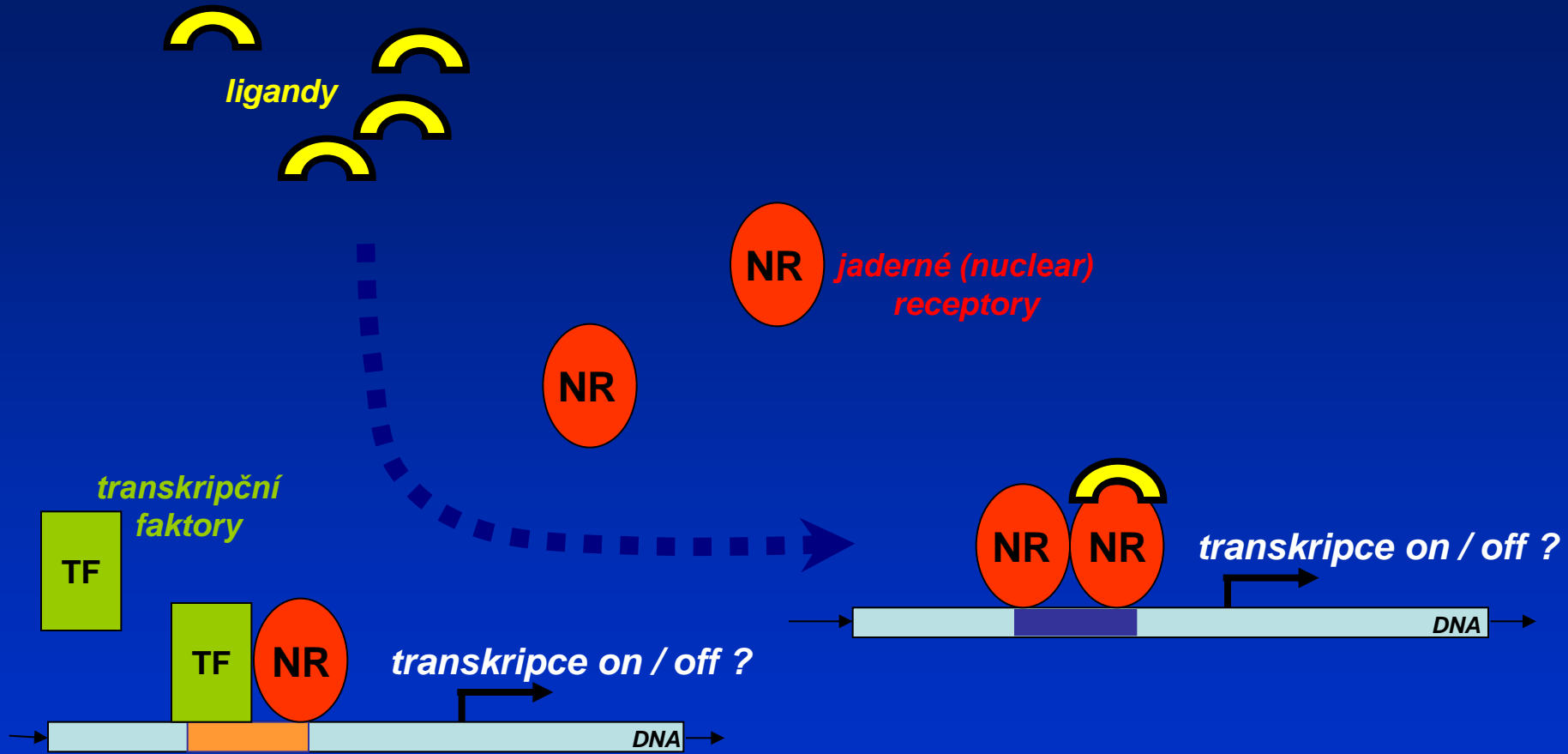
Receptor retinoidu X = RXR = retinoid X receptor (RXR α , RXR β , RXR γ + isoformy)
 RXR je aktivovaný pouze *9-cis* RA

Gene	Major isoforms	Chromosomal location*		Ligand
		Human	Mouse	
RAR α	$\alpha 1, \alpha 2$	17q21.1	11D	} <i>all-trans</i> and <i>9-cis</i> 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	} <i>9-cis</i> 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 thyroideálních hormonů**, **receptorem vit. D**, receptory aktivujícími peroxisomové proliferátory (**PPARs**), jaterním X Receptorem (**LXR**), farnenoidovým 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 receptory, 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 genů indukovaných RA.

Signální dráha jaderných receptorů



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)GAAGGGTTCACCGAAAGTTCAGTTCGC(-32)-3' (273)
4) hRAR β 2	5'(-57)GTAGGGTTCACCGAAAGTTCAGTTCGC(-32)-3' (45, 86)
5) hRAR γ 2	5'(-401)GGCCGGGTCAGGAGGAGGTGAGCGCGC(-375)-3' (174)
6) hADH3	5'(-280)ACAGGGGTCATTTCAGAGTTCAGTTTT(-305)-3' (59)
7) mCRBPI	5'(-1015)TAGTAGGTCAAAAAGTTCAGACAC(-993)-3' (259)
8) mLamBI	5'(-432)GAGGTGAGCTAGGTTAAGCCCTTAGAA AAAGGGTCAA(-468)-3' (290, 291)
9) hapoAI	5'(-192)AGGGCAGGGTCAAGGGTTCAGTGGG(-217)-3' (238)
10) mCP-H	5'(-147)CAGCAGGTCAGTACAGGGCATAGTA(-122)-3' (196)
11) rCRBPII	5'(-639)GCTGTACAGGTCACAGGTCAC AGGTCACAGTTCA(-605)-3' (162)
12) hMCAD	5'(-341)GGGTTTGACCTTTCTCTCC GGGTAAAGGTGAAGG(-308)-3' 3'- CCCAAAGTGGAAAGAGAGGCCCATTTCCACTTCC-5' (228)
13) hLactoferrin composite element	
RARE	5'(-351)AAGTGTTCACAGGTC AAGGTAACCCAC(-326) (132)
ERE	TTCACAGTGTCCAGTTCCATTGGGTG
14) mCRABPII	
RARE1	5'(-1162)CCCCAGTTCACCAGGTCAGGGCT(-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)CATGGGGTCACTGTGAGAGGTCGCCAG TGGGGTCAGGATTA(-1751)-3' antisense (199)
17) mHox1.6	3'-enhancer 5'(-Sac-74)CAGGTTACCGAAAGTTCAAG(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)TCGAGATGGGTGAGGTTGATAAC(-252)-3' (114)
21) rDopamine D ₂ receptor	5'(-71)CCTCG TGGCCAGGGTGACCCC(-51)-3' (288)

Consensus

5'-	G	T				A	T					
	G	T	C	A	(X)	G	G	T	C	A	3'	
	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

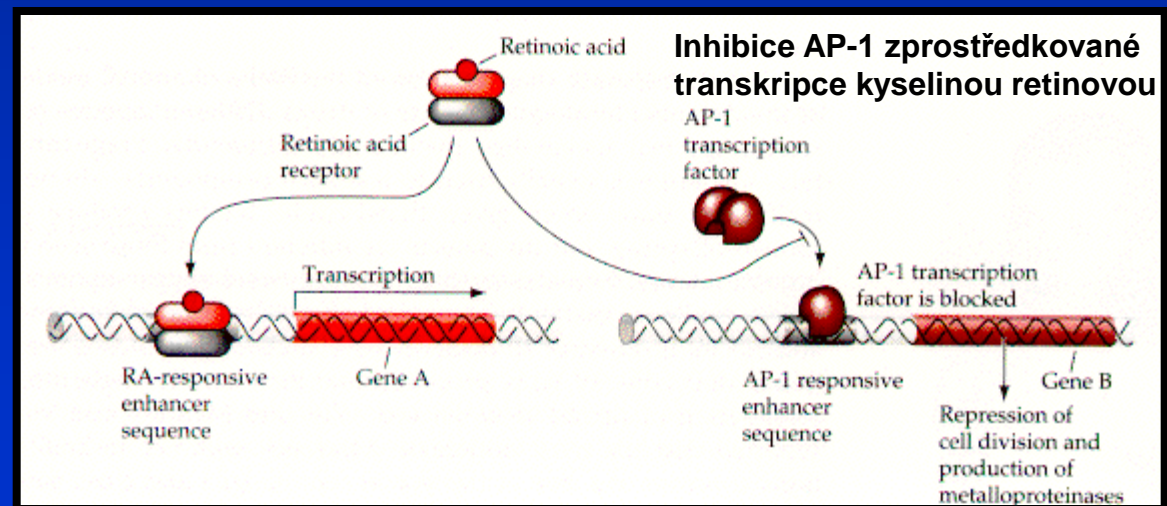
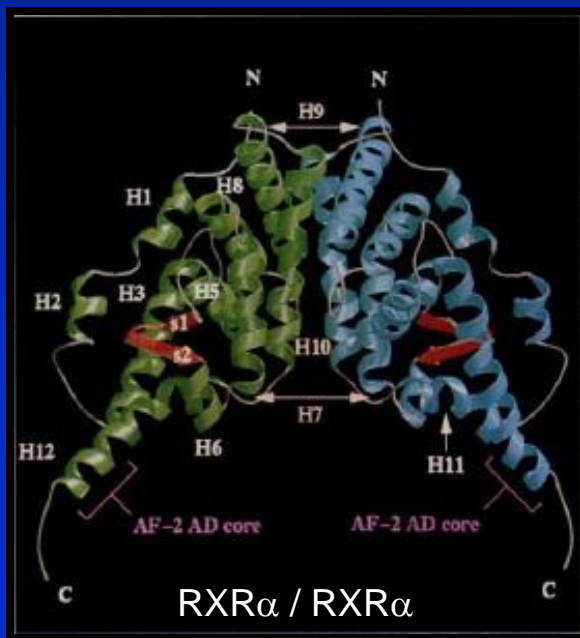
	RAD	RAR α / γ	RAR α / β 2	RAR β 2/ γ (2)	RXR α	RAR α /RXR α	RAR γ /RXR α
Eye							
Microphthalmia	+	+ ^a	-	-	+ ^a	NR ^a	+ ^a
Lens elongation/fiber anomaly	+	+ ^b	-	-	-	-	-
Lens cell apoptosis	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Neural retina apoptosis	+	NR	NR	+	NR	NR	NR
Intraretinal gap	+	+ ^c	-	+ ^c	-	\pm ^c	\pm ^c
Absent choroid fissure	+	-	-	-	-	-	-
Thickened precomeal 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	+	+ ^a	-	-	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), Grondana et al. (75a), Kastner et al. (98), Lohnes and co-workers (139, 140), Mendelsohn et al. (183), and Sucov et al. (271).]

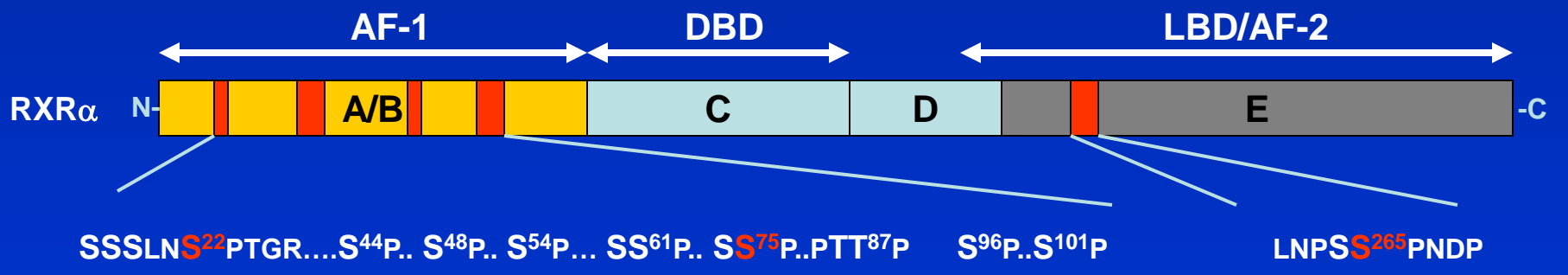
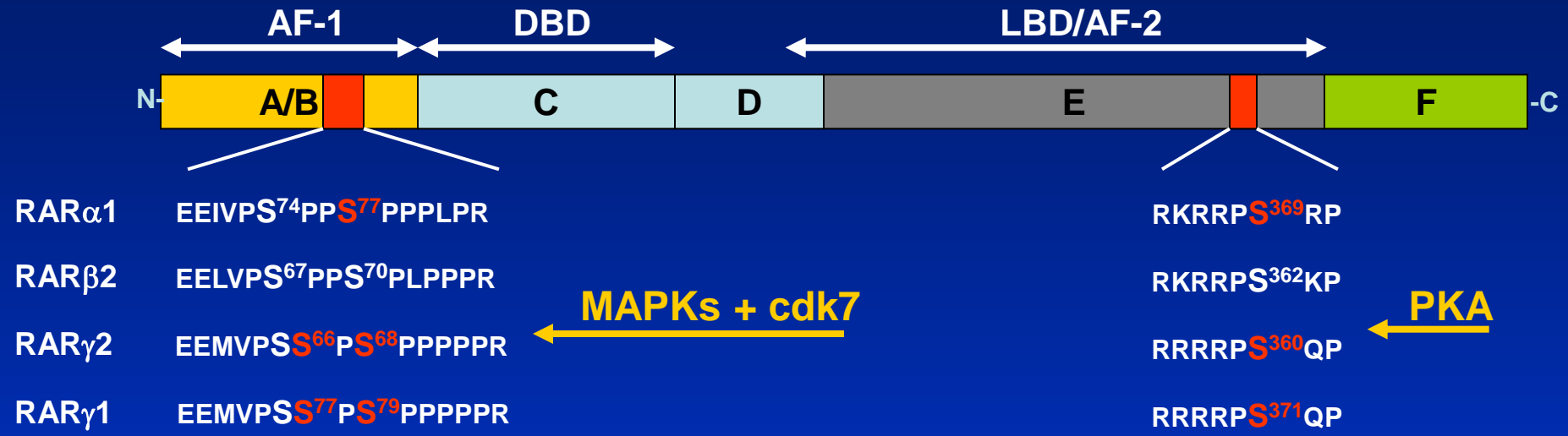
Obecně vyřazení jednotlivých isoform receptorů (homozygoti $-/-$ $RAR\alpha1$, $RAR\beta2$ nebo $RAR\gamma2$) nemá žádný zásadní účinek na fenotyp takových zvířat. Po vyřazením jednotlivých subtypů, však již můžeme pozorovat různé malformace a nedostatečnosti. Z RAR se jeví nejvýznamnější $RAR\gamma$. Větší účinek má vyřazení RXR, které je způsobeno pravděpodobně jejich úlohou při vytváření heterodimerů s ostatním jadernými receptory. $RXR\alpha -/-$, hyne 13.5-16.5 dpc, z důvodu nedostatečně vyvinutého srdce, má také nedostatečně vyvinuté oči. $RXR\beta -/-$ 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)

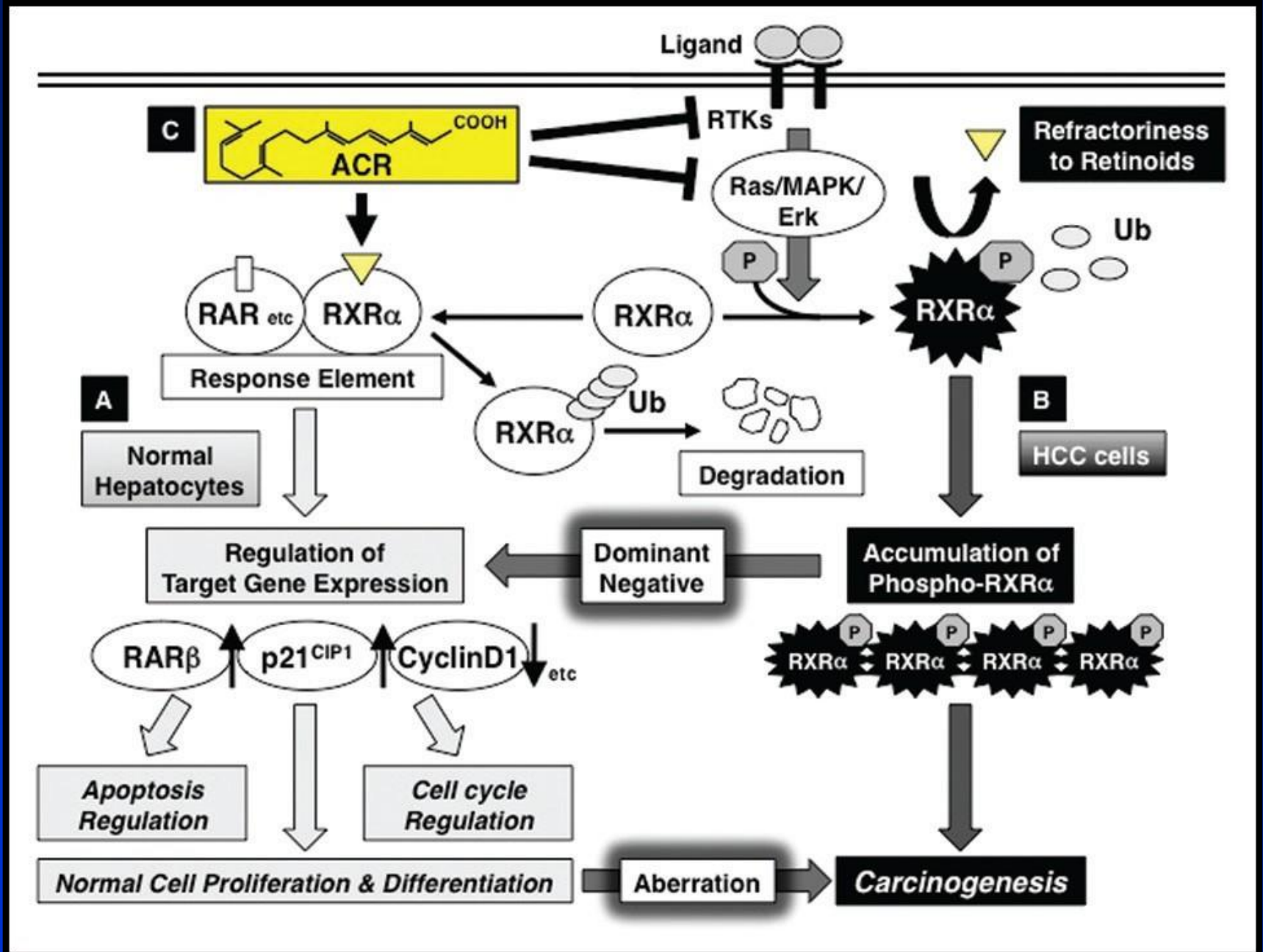


Serinové a threoninové zbytky fosforylované (■) u RAR/RXR receptorů, ukázány jsou i potencionálně fosforylovatelné(čísla)

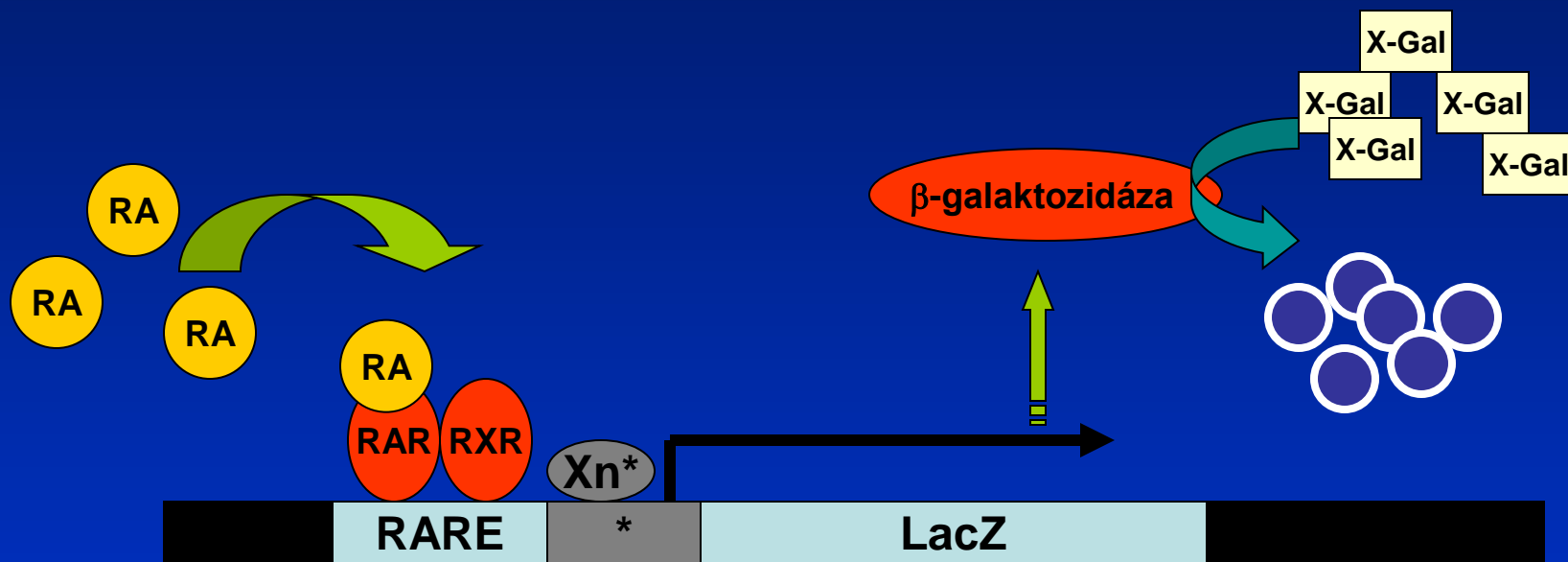


AF-1 (A/B doména) – oblast regulující aktivaci transkripce, nezávisle na ligandu
 DBD (C doména) – DNA vázající doména (DNA-binding domain)
 LBD/AF-2 (D/E doména) – oblast regulující aktivaci transkripce, závislé na ligandu

Jedna z možných interakcí metabolismu RA s promocií nádorového onemocnění



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

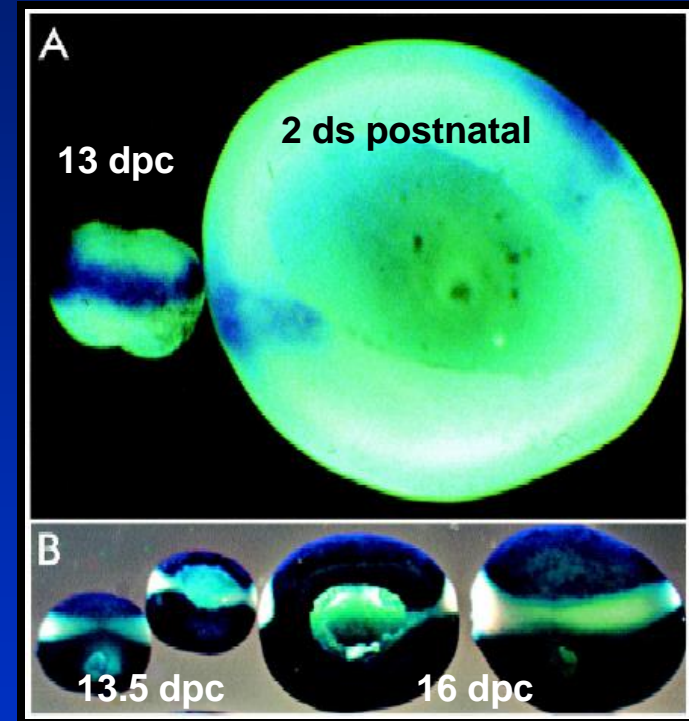
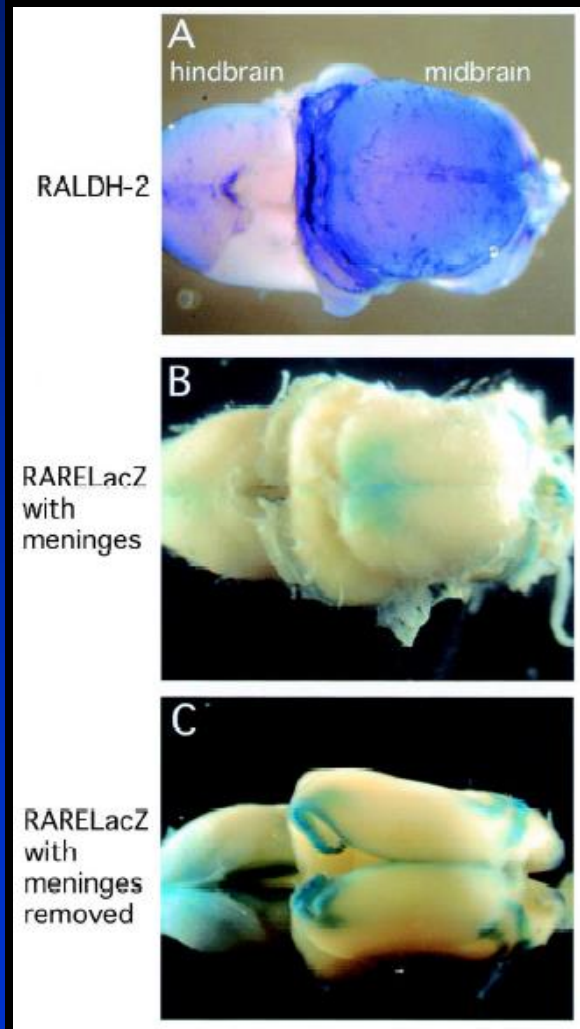


*další faktory/sekvence nezbytné pro funkci promotoru

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)

❖ **Klinické využití kyseliny retinové a jejich derivátů**

- **kožní onemocnění** (viz. Tab.1 další slide)
- **různá onkologická onemocnění** – stále předmětem výzkumu
- **akutní promyelocytická leukémie**
(spojeno s translokací $RAR\alpha$ -> potlačení jeho fce)
- **včetně retinoidů také inhibitory degradace RA**
 - inhibitory cytochromu P450/CYP26 (zejména dermatologie)

❖ **Experimentální využití kyseliny retinové**

- **vděčné diferenciační činidlo, induktor diferenciace mnoha typů nádorových buněk, ale i embryonálních kmenových a jim příbuzných buněk**

Retinoidy využívané v dermatologii

Tabulka 1. Přehled retinoidů používaných v dermatologii

Generický název	Firemní názvy, formy	Způsob aplikace	Indikace
Tretinoin I. generace	Retin A [®] , crm 0,5% a 0,025% Locacid [®] , crm. 0,05%, roztok 0,1% Airol [®] , crm. 0,05%, lotio 0,05% Aknemycin plus [®] , roztok 0,025% + erytromycin	lokální	acne vulgaris keratosis pilaris aktinické keratózy photoaging
Isotretinoin I. generace	Roaccutane [®] , cps. 20 a 10 mg Aknenormin [®] , cps. 20 a 10 mg Curacné [®] , tbl. 40, 20, 10 a 5 mg Isotrexin [®] , gel (kombinace s erytromycinem)	systemová i lokální	acne conglobata, acne papulopustulosa – torpidní formy, acne keloidea Daiš: rosacea, pyoderma faciale, gramnegativní folikulitis, hidradenitis suppurativa, steatocystoma multiplex, syndrom bazocelulárního névu
Acitretin II. generace	Neotigason [®] , cps. 25 a 10 mg	systemová	psoriasis vulgaris generalizovaná, pustulózní nebo palmoplantární, psoriasis arthropathica Daiš: keratoderma palmoplantaris, ichthyosis, m. Darier, pityriasis rubra pilaris, lichen planus, syndrom bazocelulárního névu
Adapalen III. generace	Differine [®] , krém, gel 0,1%	lokální	acne vulgaris
Tazaroten III. generace	Tazorac [®] , gel 0,05% a 0,1%	lokální	psoriasis vulgaris

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.

Shulman2005 RXR x metabolic syndrome