

Proteïnes cel·lulars d'unió a retinoides: Estructura, funció al metabolisme i a l'acció dels retinoides

Crespo García, Isidro. Grau en Bioquímica, Facultat de Biociències, curs 2012-2013

Resum:

Les **Proteïnes cel·lulars d'unió a retinoides**, també conegudes com **CRBP**, són proteïnes de la família de les **calcines**, de la superfamília de **proteïnes d'unió a àcids grassos (FABP)**. Són proteïnes citosòliques petites, d'uns 16kDa. Fins al moment es coneixen tres CRBP humans diferents, que comparteixen una estructura comuna de 10 fulles β i dues hèlixs α . Aquesta estructura, es plasma formant un barril β que acomoda el retinoide al seu interior, amb el grup funcional enterrat en l'estructura. Gràcies a que cada CRBP té una expressió específica de teixit, juntament amb variacions seqüencials, fan que cadascuna tingui un paper diferent en les diverses etapes del metabolisme dels retinoides, des de la seva ingesta fins al seu destí com a molècula reguladora de l'expressió gènica.

Introducció:

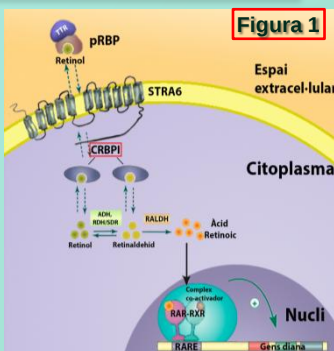
La vitamina A (retinol) i els seus derivats, coneguts com retinoides, són molècules de naturalesa hidrofòbica, essencials per a molts processos biològics. Els retinoides funcionen com hormones regulant l'expressió gènica en unir-se als receptors nuclears d'àcid retínic, RAR i RXR, els quals s'associen al DNA als anomenats elements de resposta a l'àcid retínic (RARE). D'aquesta manera els retinoides poden controlar processos com la proliferació i diferenciació cel·lular, el desenvolupament embrionari, el sistema immunitari, entre altres. També s'ha demostrat que els retinoides poden suprimir lesions preneoplàstiques i prevenir el desenvolupament de certs càncers. La funció dels retinoides depèn del seu transport, metabolisme i unió als receptors nuclears, pel que és essencial per a la cel·lula i per l'organisme el control de la quantitat de retinoides en cada moment per mantenir l'homeòstasi cel·lular. Les proteïnes cel·lulars d'unió a retinoides (CRBP) participen en el transport i emmagatzemament intracel·lular d'aquests, pel que poden influir en el control de la quantitat de retinol lliure i consegüentment, en l'homeòstasi dels retinoides.

Funció de les CRBP al metabolisme i a l'acció dels retinoides:

CRBPI:

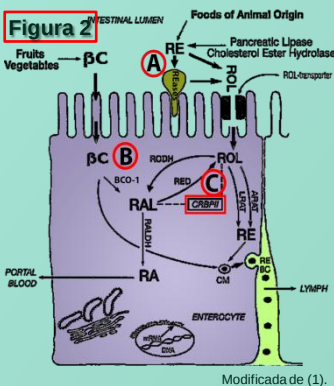
- Expressió ubiqüa: participa en el transport i emmagatzemament dels retinoides al citosol de totes les cel·lules.
- Ratolins KO viables, encara que propensos a patir la síndrome d'hipovitaminosi A.
- Pot patir silenciament epigenètic per hipermetilació del promotor. Aquest silenciament s'ha detectat en molts càncers humans.

Figura 1:
• Retinol plasmàtic transportat per pRBP.
• Codi al receptor STRA6 perquè entri a la cel·lula.
• STRA6 el transmet a CRBP-I, que l'unifica (també activa la via JAK-STAT $\Rightarrow$ implicació en diabetis 2).
• Els enzims catalitzen la fracció lliure de retinol al citoplasma ($\approx$ 10¹⁰), produint retinaldehid, també unit per CRBPI.
• CRBPI crea una reserva de retinol i retinaldehid al citoplasma.



CRBPII:

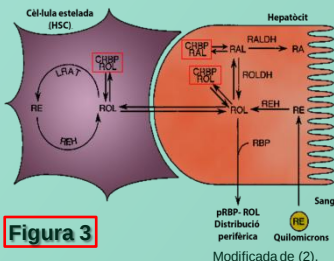
- Ratolins KO viables, encara que presenten una disminució de l'absorció de vitamina A.
- Expressió localitzada a l'intestí prim.
- Uneix amb una afinitat semblant retinol i retinaldehid.
- Permet l'assimilació de la vitamina A tant si prové d'animals (retinol èsters que es metabolitzen a retinol, Figura 2A) com de vegetals (β -carotens que es metabolitzen a retinaldehid, Figura 2B).
- El retinol i retinaldehid absorbits són units per CRBPII per disminuir la concentració de retinol lliure (Figura 2C).
- Els retinoides no units a CRBPII són esterificats i empaquetats en quilomicrons i s'envien al fetge.



CRBPIII

- S'expressa principalment al fetge i als ronyons, on pot compartir les funcions que realitza CRBPI.
- Expressió a òrgans del sistema immunitari.

Figura 3:
• Els èsters de retinol (RE) arriben en quilomicrons als hepatòcits.
• Dins l'hepatòcit, es forma retinol (ROL) per la hidrolasa d'èsters de retinol (REH).
• El ROL pot transferir-se a les cel·lules estel·lades per emmagatzemar-se, unir-se a CRBP (I i II) o metabolitzar-se per la ROL deshidrogenasa (ROLDH) per formar retinaldehid, que també pot unir-se a les CRBP.



Recull de dades de les CRBP

Proteïna	Nom recomanat	Aminoàcids	Massa molecular (kDa)	K _d retinoides (nM)	Especificitat de teixit	PDB ID
CRBP-I	Retinol-binding protein 1 (RBP1)	135	15,85	0,1 (Retinol) ³ 10 (Retinaldehid) ³	Ubiqua	1CRB (holo) 2RCQ (apo)
CRBP-II	Retinol-binding protein 2 (RBP2)	134	15,71	10 (Retinol) ⁴ 11 (Retinaldehid) ⁴	Intestí prim adults	2RCT (holo)
CRBP-III	Retinol-binding protein 5 (RBP5)	135	15,93	60 (Retinol) ⁵	Ronyó, fetge i òrgans sistema immunitari	1GGI (apo)

Font: Uniprot (excepte que s'indiqui el contrari).

Comparació seqüencial i estructural:

- CRBPI i CRBPII tenen una identitat del 54,8%.
- CRBPI i CRBPIII un 55,6%.
- CRBPII i CRBPIII un 49,6%.
- Els residus d'aminoàcid d'unió del lligand són químicament similars o idèntics.
 - Q108 de CRBPI i II, però en CRBPIII és H108.
 - $\Rightarrow$ Q i H poden fer pont d'hidrogen amb el grup funcional del retinoide, però pot variar l'estat d'ionització de la Histidina pel pH del microambient $\rightarrow$ regulació de la unió/alliberació del lligand.
- 10 fulles β antiparaleles formen un barril β (acomoda el retinol al seu interior).
- Barril tancat per un dels extrems per les cadenes laterals dels residus dels loops connectors de les fulles β .
- L'altre extrem format per 2 hèlixs α , resta obert per l'entrada del lligand.
- Diferències estructurals significatives es troben al lloc d'unió del retinoide.

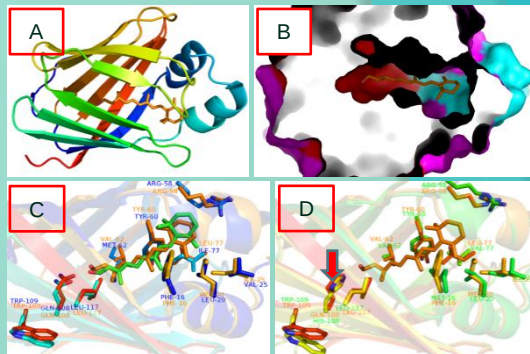


Figura 4: A) Dibuix representatiu de l'estructura comuna de les CRBP (PDBID 2RCT). B) Estructura en superfície d'HoloCRBPI amb retinol (PDBID 2RCT). S'observa que el grup funcional és inaccessible a l'exterior. C) Comparació de CRBPI (blau, PDBID 1CRB) amb CRBPIII (verd, PDBID 2RCT). D) Comparació de CRBPI (blau) amb CRBPIII (verd, PDBID 1GGI). S'assenyala el residu 108 que varia entre CRBPI i CRBPIII.

Teories sobre l'efecte de la unió entre les CRBP i els retinoides al metabolisme

- Les CRBP actuen com xaperones del retinol unit-lo i impedeix la catàlisi inespecífica de la molècula.
 - "presenten" el retinol als enzims que els correspon catalitzar-lo específicament, com els enzims del metabolisme de retinoides.
 - Vol explicar per què enzims que in vitro poden catalitzar el retinol, in vivo no ho fan (i viceversa).
 - Les CRBP uneixen el retinol amb elevada afinitat (K_d baixa) $\rightarrow$ retinol lliure en citoplasma i membranes $\approx$ 10¹⁰.
 - L'especificitat de les reaccions ve donada per la Km dels enzims que catalitzen el retinol lliure (Km enzims via retinoides propers a la concentració lliure teòrica).
 - Reaccions inespecífiques només a 10¹⁰ [Retinol], perquè s'arriba a Km d'enzims inespecífics.
- Grup catalitzable enterrat a l'estructura $\rightarrow$ difícilment es pot presentar a un enzim per la seva catàlisi.
 - Pull-Down no mostra interacció entre CRBP i enzims de la via retinoides $\rightarrow$ agafa força la 2a teoria.
 - Activitat enzims específics en presència CRBP similar a la calculada per la quantitat de retinoide lliure al medi que es dissocia de CRBP $\rightarrow$ Sembla més probable la segona teoria.

Conclusions:

- Les CRBP són molt conservades entre elles i també amb les d'altres espècies.
- A l'estructura tridimensional s'aprecia que el grup funcional catalitzable queda molt endins del barril β , impedit la catàlisi de la molècula en estar unida a la proteïna.
- CRBP-I expressió ubiqüa.
 - $\Rightarrow$ Transport i emmagatzemament de retinol i retinaldehid a totes les cel·lules del cos.
 - $\Rightarrow$ Regula la disponibilitat de vitamina A i per tant el flux de la via metabòlica.
- Expressió de CRBP-II a l'intestí prim.
 - $\Rightarrow$ Capta els retinoides de la dieta per ser esterificats i enviats en quilomicrons al fetge.
- CRBP-III s'expressa al fetge i en òrgans del sistema immunitari.
 - $\Rightarrow$ Pot ser important en el metabolisme hepàtic de la vitamina A.
 - $\Rightarrow$ CRBPIII pot ser la connexió entre la vitamina A i la resposta immunitària.
- Pot haver punts de regulació de la via metabòlica a:
 - $\Rightarrow$ L'etapa de conversió de retinol a retinaldehid (regulació per CRBP i enzims)
 - $\Rightarrow$ L'entrada a la cel·lula i cessió del retinol a CRBP (Regulació per STRA6)
 - $\Rightarrow$ Fosforilacions d'STRA6 i activació de la via JAK-STAT

Bibliografia:

- (1) Silva ER, Moreno ES. Nutritional retinoids and β -carotene: from food to their actions on gene expression. *J Nutr Biochem* 1998;9(6):446-456.
- (2) Chaperonik H, Bialek C, Sapon V, Mark M, Bonner D, Haidich G, et al. Cellular retinol-binding protein is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J* 1999;18(18):4903-4914.
- (3) Napoli JL. Biochemical Pathways of Retinol Transport, Metabolism, and Signal Transduction. *Clin Immunol Immunopathol* 1999;93(3):552-562.
- (4) Kiang MK, Singh PV, Napoli JL. Binding affinities of CRBP and CRBPIII for β -carotene. *Biochem Biophys Acta* 2011; May;1810(5):514-518.
- (5) Foll C, Cardeuere V, Ottavio S, Bolchi A, Zanotti G, Stoppini M, et al. Identification, retinol-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001 March 27;98(7):3710-3715.
- (6) Esteller M, Guo M, Moreno V, Pineda MA, Capella G, Galm O, et al. Hypermethylation-associated inactivation of the Cellular Retinol-Binding Protein 1 Gene in Human Cancer. *Cancer Research* 2002 October 15;62(20):5902-5905.
- (7) Harrison EH. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochem Biophys Acta* 2012 Jan;1821(1):70-77.
- (8) Napoli JL. Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis. *Biochem Biophys Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2012;1821(1):152-167.
- (9) Shrivastava Y, Lee S, Clugston RD, Blazer WS. Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochem Biophys Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2012;1821(1):124-136.
- (10) Kawaguchi R, Zhong M, Kassai M, Ter-Stepanian M, Sun H. STRA6-Catalyzed Vitamin A Influx, Efflux, and Exchange. *J Membr Biol* 2012;116(1):245(11):731-745.