

Клеточные ретинолсвязывающие белки. Свойства и функции

С. В. Четыркин, Л. А. Чернухина, Г. В. Донченко

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины
Ул. Леонтовича, 9, Киев, 01601, Украина

В обзоре приведены современные данные о свойствах и функциях двух представителей семейства витамин А-связывающих белков — клеточного ретинолсвязывающего белка первого и второго типов (кРСБ-I и кРСБ-II). Обсуждается участие этих белков во внутриклеточном транспорте и метаболизме витамина А. Представлены также собственные данные авторов о роли кРСБ во внутриклеточном транспорте ретинола в ядра клеток.

Введение. Действие витамина А невозможно рассматривать изолированно от взаимодействия с клеточными ретиноидсвязывающими белками, которые солюбилизируют гидрофобную молекулу витамина в гидрофильной среде клетки, выполняют транспортную функцию, защищают лабильную молекулу ретиноида от окисления, изомеризации и воздействия «нежелательных» ферментов, а также защищают саму клетку от детергентоподобного воздействия ретиноида. На сегодняшний день без учета клеток зрительных тканей обнаружены и охарактеризованы четыре внутриклеточных ретиноидсвязывающих белка. Каждый из них назван в соответствии с наиболее характерным для данного белка природным лигандом: клеточный ретинолсвязывающий белок (кРСБ); клеточный ретинолсвязывающий белок, тип II (кРСБ-II); клеточный ретиноевую кислоту связывающий белок (кРКСБ); и клеточный ретиноевую кислоту связывающий белок, тип II (кРКСБ-II). В каждом случае обозначение «тип II» появляется по отношению к белку, который ранее уже был хорошо охарактеризован, и после выяснения родства нового члена семейства к белку первого типа. Все четыре члена семейства этих белков входят в состав гораздо более крупного «надсемейства» белков — переносчиков гидрофобных лигандов, к которому относятся, например, белки, связывающие жирные кислоты [1].

В последние несколько лет были проведены очень важные исследования, направленные на определение свойств и роли этих высококонсервативных и широко распространенных белков. Достигнут значительный прогресс в определении их структуры при помощи рентгеновской кристаллографии, ядерного магнитного резонанса и изучения специфичности связывания. Однако функции этих цитоплазматических витамин А-связывающих белков, особенно участие во внутриклеточном транспорте ретиноидов, изучены недостаточно. В данном обзоре рассматриваются свойства и функции двух представителей ретиноидсвязывающих белков — клеточные ретинолсвязывающие белки I и II типа.

Обнаружение, распределение и характеристика клеточных ретинолсвязывающих белков. Обнаружение и характеристика кРСБ. В 1973 г. автором работы [2] обнаружен кРСБ — первый из семейства внутриклеточных ретиноидсвязывающих белков. Интересно отметить тот факт, что поиск ретиноидсвязывающих компонентов клеток, чувствительных к действию витамина А, был предпринят в рамках проверки рабочей гипотезы о том, что механизм действия витамина А может быть подобен таковому стероидных гормонов. В цитозоле тканей крысы и человека был обнаружен белковый компонент, связывающий ретинол. По размеру молекулы (коэффициент седиментации порядка 2S, что соответствует молекулярной массе ≈ 15 кДа) этот белок существенно отличался от рецепторов

стероидных гормонов (≈ 60 кДа). Однако его высокая аффинность и специфичность по отношению к ретинолу послужили поводом для продолжения исследований по выяснению возможной роли этого белкового компонента в механизме действия витамина А.

В первой же публикации [2] было выдвинуто предположение о потенциальной значимости этого белка на основании его присутствия во всех витамин А-чувствительных тканях. Отсутствие этого белка в сыворотке крови, а также неспособность антисыворотки к ретинолсвязывающему белку плазмы осаждать этот цитозольный ретинолсвязывающий компонент [3] позволили предположить, что он не только не имеет никакой связи с РСБ плазмы, но, наоборот, является совершенно новым ретинолсвязывающим белком. Последующие исследования установили, что после частичной очистки этого белка он остается связанным с лигандом, спектральные характеристики которого идентичны таковым полностью-*транс*-ретинола [4, 5]. Препарат белка, полученный из органов животных с авитаминозом А, был почти полностью лишен лиганда [6]. Точная идентификация лиганда как полностью-*транс*-ретинола была проведена при помощи ВЭЖХ-анализа после экстракции лиганда из препарата кРСБ, выделенного из ретины быка [7]. Идентификация эндогенного лиганда окончательно подтвердила участие кРСБ в метаболизме витамина А в организме. Название «клеточный ретинолсвязывающий белок» [6] было выбрано, чтобы подчеркнуть, во-первых, его отличие от РСБ плазмы, во-вторых, его внутриклеточную локализацию и, в-третьих, наличие его эндогенного лиганда. Такая номенклатура утвердилась, и впоследствии ее применяли по мере открытия новых членов семейства этих белков.

Первое независимое подтверждение существования кРСБ было получено в работе [8], автор которой обнаружил этот белок в ретине эмбрионов кур. Вслед за этим кРСБ был выявлен различными исследователями во многих тканях: печени крыс, человека и собаки, яичниках крыс, ретине [9] и печени [10] быка, слизистой железистого желудка кур [11] и др. В настоящее время нет позвоночных животных, у которых бы не был обнаружен кРСБ. Не исключается возможность существования аналога кРСБ у беспозвоночных. Ретинолсвязывающий белок был также обнаружен и у различных паразитов [12] и насекомых [13], но эти белки еще недостаточно хорошо охарактеризованы, чтобы показать их связь с кРСБ или РСБ плазмы. Нет доказательств существования кРСБ у одноклеточных организмов. Вероятно, белки, связывающие

ретиноиды, появляются на определенном этапе эволюции у более сложных организмов, для которых витамин А является уже необходимым экзогенным фактором.

Первоначальные исследования связывающих свойств кРСБ, проводимые при использовании клеточных экстрактов или частично очищенных препаратов, выявили более высокую специфичность белка к ретинолу по сравнению с ретиналем, ретиноевой кислотой и эфирами ретинола [2, 6]. Основа такой избирательности стала понятна после изучения общей структуры лигандсвязывающего участка молекулы кРСБ. Особенно интригующим наблюдением при изучении связывающих свойств гомогенного белка было выявление «предпочтения» кРСБ к полностью-*транс*- и 13-*цис*-ретинолу по сравнению с 9-*цис*- или 9,13-ди-*цис*-ретинолом, что соответствовало биологической активности этих изомеров в опытах с интактными животными [6, 14]. Это наблюдение еще раз подтвердило важную роль кРСБ в процессах метаболизма витамина А. Кроме того, кРСБ связывает и дидегидроретинол с аффинностью, равной полностью-*транс*- и 13-*цис*-ретинолу [14].

Определение константы диссоциации K_D комплекса ретинол—кРСБ, а также для других ретиноидов и связывающих белков было связано с некоторыми проблемами из-за очень плохой растворимости и неустойчивости ретинола в водных растворах. Наиболее распространенным методом определения константы диссоциации чистых белков является флюорометрическое титрование, основанное или на увеличении флюоресценции ретиноида, или на тушении флюоресценции входящего в состав белка триптофана, которое происходит при связывании ретиноида с белком. Впервые этот метод был использован для определения K_D РСБ плазмы [15]. С его помощью была определена кажущаяся константа диссоциации кРСБ из печени крыс — 16 нМ [16], из печени быка — 22 нМ [10]. Подобные результаты [17] были получены и в других лабораториях. Однако вполне вероятно, что определенная данным методом K_D может быть меньше истинной, и поэтому нужно быть чрезвычайно осторожным при интерпретации констант связывания, полученных этим методом.

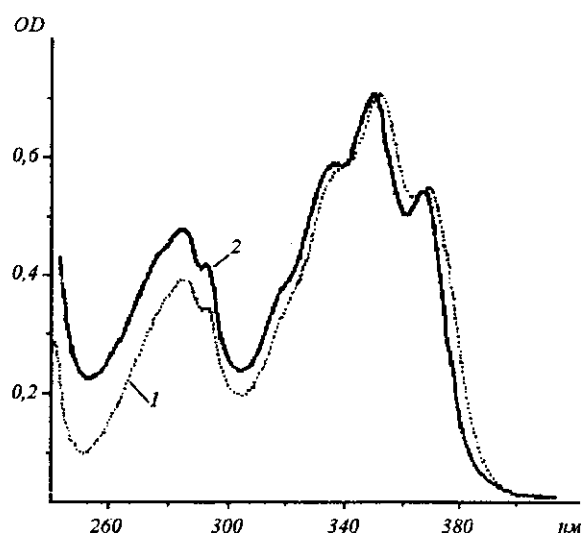
Очистка кРСБ до гомогенного состояния позволила получить специфические антитела для радиоиммунологических исследований, а также провести секвенирование для сравнения различных белков этого семейства. В 1978 г. кРСБ был выделен в чистом виде из печени крыс [16], яичников крыс [18, 19] и ретины быка [20]. В 1982 г. был получен гомогенный препарат кРСБ из печени человека

[21, 22]. В 1985 г. независимо друг от друга, различными методами (клонированием кДНК [23] и традиционным методом секвенирования [24]) была определена аминокислотная последовательность кРСБ, вследствие чего было показано, что белок состоит из 134 аминокислотных остатков. Аминокислотная последовательность кРСБ из различных источников (печень человека и крысы) идентична на 96 %. Отличия наблюдаются только в пяти позициях. Определение N-концевой последовательности белков, выделенных из печени и яичников крыс, показало, что эти белки идентичны [25]. В отделе биохимии коферментов Института биохимии им. А. В. Палладина НАНУ выделены и охарактеризованы кРСБ из слизистой промежуточной зоны железистого желудка кур и печени быка [10, 11]. Доказана гомологичность выделенных белков как по аминокислотному составу, так и по физико-химическим показателям. Показано, что выделенные белки не обладают четко выраженной тканевой и видовой специфичностью.

Обнаружение и характеристика кРСБ-II. Существование второго типа кРСБ впервые показано при попытке получения чистых препаратов кРСБ и кРКСБ из новорожденных крысят. Был обнаружен РСБ, разделяющийся в процессе очистки на две формы. После изучения его физических свойств установлено, что хотя он и подобен кРСБ, но не идентичен последнему [26]. Сходство и различие между двумя белками можно проиллюстрировать, сравнив их спектральные характеристики (рисунок). Оба белка изменяют спектр связанного с ними ретинола по сравнению со спектром чистого ретинола в органическом растворителе ($\lambda_{\text{макс}} = 350$ вместо 325 нм) и сдвинуты относительно друг друга приблизительно на 2 нм. Новый белок был назван клеточным ретинолсвязывающим белком второго типа (кРСБ-II), чтобы подчеркнуть его сходство с кРСБ. Гомология этих белков позднее была подтверждена определением аминокислотной последовательности [27, 28], которая оказалась идентичной на 56 % (75 из 134 аминокислотных остатков).

Структурное различие между двумя изоформами кРСБ-II ограничивается лишь N-концевым треонином, который находится в ацилированном или неацилированном состоянии [28], а функциональное различие между этими двумя формами так и остается невыясненным.

В процессе очистки кРСБ-II остается в связанном с эндогенным лигандом состоянии, спектральные характеристики которого идентичны таковым полностью-транс-ретинола [26]. Определение связывающих свойств белка показало, что наибольшую аффинность этот белок проявляет к полно-



Спектры поглощения комплексов ретинол—кРСБ (1) и ретинол—кРСБ-II (2) [26]

стью-транс-ретинолу, чуть меньшую — к полностью-транс-ретинолу [14, 17]. Кроме того, кРСБ-II способен также связывать 3-дегидро- и 13-цис-ретинол, но не ретиноевую кислоту, эфиры ретинола, 9-цис- или 11-цис-ретинол и ретиналь [14]. Таким образом, специфичность кРСБ-II по отношению к ретиноидам идентична кРСБ, но относительная аффинность двух белков различна.

Было показано также, что кажущиеся K_D комплексов ретинол—кРСБ и ретинол—кРСБ-II, определенные методом флуорометрического титрования, подобны (10—40 и 10—20 нМ соответственно) [14, 16, 17, 29]. Однако проведенные при помощи ^{19}F -ЯМР исследования изотопно меченных 6-фтор-триптофаном кРСБ и кРСБ-II продемонстрировали, что аффинность кРСБ к ретинолу приблизительно в 100 раз выше, чем у белка второго типа [30]. Эти исследования показали, что, если в инкубационной среде присутствуют оба белка, то ретинол, связанный с кРСБ-II, способен переноситься к кРСБ, но не наоборот; в то же время ретиналь переносится в обоих направлениях. Это свидетельствует о том, что в присутствии обоих белков и при ограниченной концентрации лиганда насыщаться ретинолом предпочтительнее будет лигандсвязывающий участок молекулы кРСБ. Принимая во внимание закон действия масс, можно предположить, что таким образом природа облегчила перенос ретинола из слизистой кишечника,

где концентрация кРСБ-II выше, в другие органы, где превалирует кРСБ.

Распределение кРСБ и кРСБ-II по органам и тканям. Первоначально исследования количества и распределения кРСБ по органам основывались на измерении связывания [³H]-ретинола, которое определяли после инкубации и отделения от несвязавшегося лиганда центрифугированием в градиенте плотности сахарозы [2, 5]. Однако использование этого метода не позволяет отличить кРСБ от других возможных РСБ сходной молекулярной массы. В настоящее время доказано существование в тонком кишечнике кРСБ-II и, следовательно, использование вышеописанного метода приводило к завышению концентрации кРСБ в этой ткани. Занижение содержания кРСБ может быть также вызвано разведением добавляемого радиоактивного изотопа эндогенным ретиноидом, неполным замещением эндогенного лиганда на радиоактивный изотоп или возможной диссоциацией комплекса [³H]-ретинол—кРСБ в процессе отделения несвязавшегося лиганда. Поэтому только получение специфичной антисыворотки к кРСБ крысы [22, 25, 31, 32] дало возможность более точно определить его содержание в различных тканях и органах.

К сожалению, и радиоиммуноанализ приводил к существенно отличающимся результатам, получаемым в различных лабораториях. Возможно, это объясняется процедурными или технологическими различиями, например, применением для холо-кРСБ различных молярных коэффициентов экстинкции — 21 800 [31] и 28 000 [22], что дает в результате различающиеся на 28 % величины концентрации в тканях.

Однако в целом можно отметить приемлемое соответствие относительной концентрации кРСБ в различных органах. Самыми богатыми кРСБ органами крыс являются печень, почки, проксимальный эпидидимис и легкие [33, 34] (табл. 1). Далее идут семенники и селезенка. Наименьшее количество кРСБ наблюдается в яичниках и матке [22, 34]. Относительное содержание мРНК кРСБ хорошо коррелирует с содержанием белка в соответствующем органе [32, 35, 36].

Интересно отметить, что концентрация кРСБ в органах человека достаточно сильно отличается от вышеприведенной. Такие результаты были получены в двух разных лабораториях [37, 38]. Наибольшая концентрация этого белка определяется в яичниках, затем идут семенники, надпочечники и печень. В отличие от крысы в человеческих почках и легких содержание кРСБ относительно мало.

Из этих данных можно сделать несколько выводов. Присутствие в органе кРСБ свидетельствует

Таблица 1
Содержание кРСБ в органах человека и крысы [38]

| Орган | Средняя величина, пмоль/г ткани | |
|-----------------------------|---------------------------------|----------|
| | Человек | Крыса |
| Надпочечники | 750±135 | — |
| Мозг: | | |
| мозжечек | 280±50 | 22±3 |
| кора | 128±37 | 9,5±0,7 |
| гипоталамус | 174±31 | 62±13 |
| Эпидидимис | 288±62 | 820±76 |
| Почки | 119±28 | 513С16 |
| Печень | 600±100 | 1150±140 |
| Легкие | 93±23 | 520±50 |
| Мышцы (поперечно-полосатые) | 54±12 | — |
| Яичники | 2790±230 | 90±87 |
| Простата | 108±32 | 33,8±1,4 |
| Спинальный мозг | 276±50 | 29,1±1,8 |
| Селезенка | 278±48 | 117±11 |
| Семенники | 1054±140 | 264±23 |
| Тимус | 80±33 | 26,6±5,4 |
| Матка | 265±25 | 72±6,2 |

о том, что данный орган или клетки определенного типа участвуют в метаболизме ретинола. Не удивляет поэтому обилие кРСБ в печени, однако, с другой стороны, нет достаточно четкого объяснения значительной концентрации белка в эпидидимисе. Также неизвестно, есть ли органы, лишенные кРСБ. В связи с этим возможность присутствия кРСБ в клетке в небольших концентрациях не должна исключаться.

Поскольку печень играет очень важную роль в метаболизме витамина А и, кроме того, является одним из самых «богатых» кРСБ органов крысы, рассмотрим распределение этого белка по клеткам данного органа. Иммуногистохимическими исследованиями было показано, что кРСБ преимущественно локализован в паренхимных и стеллатных клетках печени [25, 39]. Более интенсивное окрашивание наблюдалось в стеллатных клетках и оно увеличивалось, если животным предварительно скармливали высокие дозы витамина А. Средняя паренхимная клетка содержит приблизительно вдвое больше кРСБ, чем стеллатная [40—42]. Вследствие того, что паренхимные клетки являют-

ся основными клетками печени, а стеллатные не богаты на кРСБ, можно считать, что практически полностью этот белок обнаруживается в паренхимных клетках. Но содержание общего белка в стеллатных клетках составляет около одной десятой части белка паренхимных клеток и поэтому относительное содержание кРСБ (на 1 мг белка) в стеллатных клетках по крайней мере в пять раз выше, чем в паренхимных. Кроме того, стеллатные клетки содержат 70—90 % общего количества эфиров ретинола печени [42] и способны синтезировать и секретировать РСБ плазмы [43]. Исходя из такой картины распределения полагают, что кРСБ участвует, во-первых, в очень важном распределении ретиноидов, осуществляемом стеллатными и паренхимными клетками и, вероятно, выступает в качестве акцептора ретинола в процессе метаболизма ретиноловых эфиров из остатков хиломикрон; во-вторых, в доставке ретинола к апо-РСБ для секреции в кровь; в-третьих, в этерификации ретинола для последующего хранения или в мобилизации уже этерифицированного ретинола.

В других богатых кРСБ органах локализация этого белка также весьма специфична. Например, в почках кРСБ иммунологически обнаружен только в проксимальном извитом почечном канальце коркового вещества, меньшее его количество — в прямом почечном канальце. В мозговом веществе почек кРСБ не был найден.

Интересно отметить тот факт, что в проксимальном извитом почечном канальце было выявлено значительное количество ресорбированного РСБ плазмы. Локализация кРСБ и ресорбированного РСБ в одном и том же месте свидетельствует о возможном участии кРСБ в регенеративных процессах. Однако остается невыясненным, каким образом ретинол вновь возвращается в общую циркуляцию. В семенниках и эпидидимисе локализация кРСБ также достаточно специфична. В эпидидимисе большее количество кРСБ обнаружено только в клетках, расположенных в проксимальной части органа [33, 34, 44], что свидетельствует о существенной локализации транспорта витамина А в этом органе. Причины такой избирательности пока не ясны, но было обнаружено, что в этих же клетках наблюдается значительная экспрессия андрогензависимого белка, известного как В/С белок [45]. Этот белок специфичен по отношению к ретиноевой кислоте [46] и принадлежит к семейству, к которому относится и РСБ плазмы [47, 48]. Такое непосредственное соседство экспрессии кРСБ и В/С белка повышает возможность секреции витамина А в просвет эпидидимиса. В семенниках кРСБ был обнаружен в перитубулярных клетках и клетках

Sertoli [49]. Выявление кРСБ в клетках Sertoli представляет огромный интерес, поскольку эти клетки обеспечивают снабжение питательными веществами изолированных половых клеток, атрофирующихся при недостатке в организме витамина А. Кроме того, колебания уровня экспрессии кРСБ, коррелирующие со стадиями сперматогенеза [34, 44], указывают на меняющуюся в процессе сперматогенеза потребность клеток в этом белке. Роль кРСБ в этом процессе неясна, хотя предполагают, что этот белок может участвовать в межклеточном транспорте ретинола.

Хотя кРСБ и кРСБ-II имеют значительное сходство аминокислотных последовательностей (порядка 56 %), их распределение по тканям и характер экспрессии в процессе эмбриогенеза сильно различаются. Распределение кРСБ-II по органам также определяли при помощи радиоиммуноанализа, поскольку характеристики этого белка, особенно размер молекулы и связывание лиганда, очень схожи с аналогичными характеристиками кРСБ. Радиоиммунологический метод достаточно специфичен к кРСБ-II; кросс-реакция имеет место только при больших концентрациях кРСБ и кРСБ-II (приблизительно 1000-кратном избытке), что свидетельствует об очень незначительном влиянии этих двух белков при иммунологическом определении кРСБ-II [26].

Удивительно богата на кРСБ-II слизистая тонкого отдела кишечника взрослых крыс — его содержание составляет около 1 % от общего растворимого белка слизистой [26]. Этот белок был обнаружен и в толстой кишке, печени, плазме и глазе, но его содержание в этих органах в 500 раз меньше, чем в тонком кишечнике. В более ранних исследованиях уже отмечали высокое содержание кРСБ-II в этой ткани [2, 5, 50], однако речь шла, вероятно, о сумме кРСБ и кРСБ-II. Органы взрослых крыс были также исследованы на наличие мРНК кРСБ-II. В целом результаты скрининга соответствовали данным радиоиммунных исследований — информационная РНК, выделенная из тонкого кишечника, содержала 0,2—0,3 % мРНК кРСБ-II.

Присутствие значительного количества кРСБ-II в тонком кишечнике позднее было обнаружено также у человека [51] и курицы [52]. Белки из этих источников были очищены и определены их N-концевые аминокислотные последовательности, в результате чего выявлена высокая степень гомологии между последовательностями аминокислот кРСБ-II человека и крысы: они отличались лишь по одному аминокислотному остатку, а у человека и курицы — по четырем [53]. Антисыворотка к кРСБ-II крысы реагировала как с кРСБ-II человека

[51], так и курицы [54], что еще раз подтверждает высокую степень консервативности этого белка.

Изучение локализации кРСБ-II по клеткам тонкого кишечника при помощи иммуногистохимического метода показало, что белок в основном находится в зрелых энтероцитах [55]. В других клетках кишечного эпителия, включая бокаловидные клетки и незрелые энтероциты, кРСБ-II не найден. Таким образом, кРСБ-II находится в тех клетках тонкого отдела кишечника, которые непосредственно участвуют в абсорбции витамина А. Учитывая, что его количество составляет около 1 % общего растворимого белка слизистой, можно сделать вывод о том, что это наиболее распространенный белок упомянутых клеток и его количества достаточно для связывания общей дневной потребности крыс в витамине А, поступающем вместе с пищей. Данные по локализации кРСБ-II свидетельствуют также о его важной роли в процессе всасывания ретинола в тонком кишечнике, дальнейшем внутриклеточном транспорте ретинола и образующегося при расщеплении β -каротина ретинола.

Сравнение содержания кРСБ-II в органах взрослых и новорожденных крыс показало, что у однодневных крысят самым богатым на кРСБ-II органом является кишечник. Однако и печень новорожденных крыс (в отличие от взрослых) содержит значительное количество этого белка. Все другие исследованные органы содержат, по крайней мере, в 100 раз меньшее количество кРСБ-II [26, 56]. Присутствие кРСБ-II в печени новорожденных — явление временное, наблюдаемое только в перинатальный период [27, 57].

Функции клеточных ретинолсвязывающих белков. Хотя точную функциональную роль клеточных ретинолсвязывающих белков еще предстоит выяснить, имеются данные о том, что эти белки принимают участие в поглощении ретинола клеткой, его внутриклеточном метаболизме и выполняют цитопротекторную функцию. Кроме того, на основании локализации кРСБ-II (в основном в кишечнике) предполагают, что этот белок приспособлен для абсорбции ретинола в кишечнике и/или для его метаболизма [58].

Транспорт ретинола между кРСБ и мембранами. Существование ассоциированного с мембраной специфического переносчика ретинола является спорным вопросом [59—61]. Исследования с использованием синтетических фосфолипидных мембран показали способность спонтанного проникновения ретинола через липидный бислой [62]. Авторы этой работы делают вывод о том, что перенос ретинола через мембрану может осуществляться

без участия каких бы то ни было ассоциированных с мембраной белков, что, на наш взгляд, является сомнительным. Измерение транспорта радиоактивно меченного ретинола или изучение снижения флюоресценции связанного с белком ретинола показали, что имеет место незначительная диссоциация ($\approx 10\%$) комплекса кРСБ—ретинол при совместной инкубации с мембранами [63, 64]. Исследование спектров ^{19}F -ЯМР продемонстрировало, что кРСБ более эффективно конкурирует с фосфолипидным бислоем, чем кРСБ-II [65].

Скорость переноса ретинола от кРСБ к фосфолипидным везикулам не зависит от концентрации последних, что может служить доказательством возможного механизма транспорта лиганда путем обычной пассивной диффузии, а не специфическим взаимодействием между белком и везикулами [64]. Подобные исследования с использованием кРСБ-II не проводились. Следует еще раз подчеркнуть, что в этих экспериментах использовали синтетические мембраны и, как нам кажется, *in vivo* пассивная диффузия вряд ли имеет место, поскольку внутриклеточные мембраны содержат значительное количество метаболизирующих витамин А ферментов, к которым комплекс ретинол—кРСБ проявляет значительно большее сродство.

Пассивный «резервуар». Одной из возможных функций кРСБ считается их гипотетическая роль как клеточного «резервуара» ретиноидов, поддерживающего концентрацию свободных ретиноидов на очень низком уровне, защищая тем самым клетку от их детергентоподобного действия и в то же время предохраняя весьма лабильные ретиноиды от изомеризации и окисления. Однако известно, что витамин А накапливается и хранится в жировых каплях в виде более устойчивых эфиров и в этом случае непонятно, зачем для такой пассивной функции — хранения незначительного количества свободных ретиноидов — понадобилась пара связывающих белков для ретинола и еще одна пара — для ретиноевой кислоты. Возможно, это связано с различной аффинностью пары белков к ретиноидам, которая, в свою очередь, вызвана разной потребностью клеток в свободных ретиноидах. Однако из этого вытекает еще один вопрос: если различие в аффинных свойствах пары белков столь необходимы, то почему замены в аминокислотной последовательности этих белков наблюдаются в любом месте, кроме лигандсвязывающего участка белков? Кроме того, как уже упоминалось, клеточные ретиноидсвязывающие белки очень консервативны: из табл. 2 следует, что наблюдается более чем 90 %-я гомология аминокислотной последовательности для белков человека и грызунов [66].

Такая высокая степень гомологии всей аминокислотной последовательности белка вряд ли необходима для сохранения специфического лигандсвязывающего участка. Более вероятным можно считать предположение, что вся поверхность белка имеет определенное функциональное значение, например, для взаимодействия белок—фермент или для узнавания другими клеточными компонентами.

Метаболизм ретиноидов. Исследованию функциональной роли клеточных ретинолсвязывающих белков в ферментативных путях восстановления ретинальдегида, этерификации ретинола, гидролиза ретиноловых эфиров и синтеза ретиноевой кислоты было посвящено много работ, рассмотренных в обзорах [67—69]. Интерпретация результатов этих исследований осложняется нерастворимостью ретиноидов в водных растворах и их высоким сродством к мембранам, в которых обнаружена ретиноидметаболизирующая активность [64, 70]. Во многих случаях величина K_m такой активности превышает предел растворимости ретинола в воде (0,1 мкМ), который при добавлении в более высоких концентрациях, вероятно, образует агрегаты. Вследствие того, что ферментные системы, описанные ниже, способны *in vitro* взаимодействовать в качестве субстрата и со свободным ретинолом, наличие связывающих белков может не являться необходимым фактором. В случае ассоциированных с мембраной ферментов различия в скоростях переноса ретинола (свободного ретинола, комплекса ретинол—кРСБ или ретинол—кРСБ-II) в липидный бислой могут осложнять кинетический анализ каталитического процесса. Несмотря на это, было показано, что только цитоплазматические ретиноидсвязывающие белки способны ограничивать доступ ретиноидов к метаболизирующим ферментам.

Из-за труднодоступности спиртовой группы связанного с кРСБ или кРСБ-II ретинола (наличие такой группы является необходимым условием для связывания с кРСБ) структурная основа взаимодействия фермент—ретинол представляет собой очень интересную и активно изучаемую проблему [71, 72]. Кроме того, не выяснены механизмы, посредством которых клеточные ферменты распознают апо- и холо-формы кРСБ.

С другой стороны, считается, что клеточные ретинолсвязывающие белки могут направлять метаболизм связанного с ними лиганда, защищая его от реакции с «нежелательными» ферментами, но не препятствуя для взаимодействия с другими. Последние, вероятно, имеют важное физиологическое значение. Клеточные ретинолсвязывающие белки участвуют в следующих метаболических процессах:

— в абсорбирующих клетках кишечника кРСБ-II направляет восстановление ретиналя до ретинола и последующую этерификацию этого ретинола в эфиры жирных кислот, которые встраиваются в хиломикроны для секреции из кишечника [73];

— в печени и других органах кРСБ направляет этерификацию/гидролиз ретинола, окисление этого ретинола до ретиналя и далее, до ретиноевой кислоты, вероятно, самой активной формы витамина А [67, 74].

Было показано, что ретиноидсвязывающие белки защищают связанный лиганд от взаимодействия с ферментом, который способен метаболизировать свободный ретиноид. Исходя из данных этих экспериментов можно считать доказанным существование прямого белок-ферментного взаимодействия для кРСБ.

Таблица 2

Идентичность аминокислотных последовательностей ретинолсвязывающих белков [66]

| Белок | Источник | Число замен из общего количества аминокислот | Идентичность, % |
|------------|---------------|--|-----------------|
| кРСБ | Крыса/человек | 5/134 | 96,3 |
| кРСБ-II | Крыса/человек | 1/140* | 97,5 |
| кРКСБ | Крыса/человек | 1/136 | 99,3 |
| кРКСБ-II | Мышь/человек | 9/137 | 93,4 |
| РСБ плазмы | Крыса/человек | 26/183 | 85,8 |

*Определена только N-концевая последовательность.

Восстановление ретинальдегида. В энтероцитах абсорбированные каротиноиды расщепляются окислительными ферментами, образуя ретиналь, который затем быстро восстанавливается до ретинола. кРСБ-II имеет очень высокую аффинность как к ретинолу, так и к ретинальдегиду и, следовательно, большая часть этих ретиноидов находится в связанном состоянии. Комплекс ретиналь—кРСБ-II очень плохо восстанавливается цитозольной ретиналь-редуктазой, но легко и быстро распознается микросомной ретиналь-редуктазой, выделенной из слизистой кишечника [75]. В то же время свободный ретинол восстанавливается обоими ферментами, но, как уже отмечалось, его концентрация очень мала и, вероятно, может не приниматься во внимание. В пользу этого свидетельствует и сравнение K_m микросомной дегидрогеназы для связанного (0,46 мкМ) и свободного (0,78 мкМ) ретинола.

Этерификация ретинола. Около 90 % поступившего с пищей ретинола этерифицируется в клетках слизистой кишечника и «упаковывается» в хиломикроны перед транспортом в печень. В печени ретинол переэтерифицируется и сохраняется в виде эфиров в гепатоцитах и stellatных клетках [76, 77].

Влияние кРСБ и кРСБ-II на процессы этерификации исследовали для микросом как клеток кишечника, так и печени [29, 63, 78—80]. Два разных фермента — ацил-СоА:ретинол-ацилтрансфераза (АРАТ) и лецитин:ретинол-ацилтрансфераза (ЛРАТ) — участвуют в этерификации ретинола [69], причем кРСБ и кРСБ-II селективно направляют ретинол ко второму ферменту. Сравнимые величины K_m для свободного и связанного с кРСБ ретинола свидетельствуют о том, что комплекс ретинол—кРСБ является субстратом для ЛРАТ. Отметим, что никаких определенных выводов не было сделано по поводу того, что величина K_m (0,63 мкМ), полученная в опытах с использованием свободного ретинола в качестве субстрата, превышает растворимость ретинола в водных растворах ($\approx 0,1$ мкМ). Апо-кРСБ, но не апо-кРСБ-II ингибирует этерификацию ретинола микросомной ЛРАТ печени [63]. Полагают, что степень насыщенности кРСБ лигандом регулирует этерификацию ретинола в печени. Ингибирование наблюдалось даже в случае предварительной инактивации связывания ретинола с апо-кРСБ обработкой пара-(хлормеркури)-бензсульфоновой кислотой, что является еще одним доказательством прямого взаимодействия кРСБ с ферментом [63].

Гидролиз эфиров ретинола. Хранящиеся в клетках печени эфиры ретинола перед связывани-

ем с РСБ плазмы с последующей секрецией из клетки гидролизуются до свободного ретинола. Было показано, что апо-кРСБ способен стимулировать независимый от желчных кислот гидролиз эндогенных ретинилэфиров печени [81] и пигментного эпителия сетчатки [82]. Доказано, что этот эффект специфичен, поскольку другие белки, связывающие ретинол, включая β -лактоглобулин и сывороточный альбумин, не оказывают влияния на активность гидролазы [81]. Как уже упоминалось, ингибирование этерификации ретинола апо-кРСБ может иметь очень важное функциональное значение. В случае недостатка витамина А в организме кРСБ гораздо менее насыщен лигандом. Поэтому, ингибируя ЛРАТ, апо-кРСБ может стимулировать гидролиз эндогенных эфиров ретинола, как было показано в опытах с микросомами печени крыс *in vitro*. Следовательно, внутриклеточное соотношение апо- и холо-форм кРСБ, вероятно, является одним из детерминирующих факторов для баланса процессов этерификации/деэтерификации, протекающих в печени.

Синтез ретиноевой кислоты. В тканях-мишенях ретинол может окисляться до ретиноевой кислоты и более полярных метаболитов. Ретиноевая кислота является активным лигандом ядерных рецепторов (РРК и РХР) и ее синтез, вероятно, — это сложный процесс. Считается, что энзиматическое превращение ретинола в ретиноевую кислоту (РК) проходит через стадию образования промежуточного продукта — ретиналя [68, 83]. Были обнаружены как цитозольная, так и микросомная активности, превращающие ретинол в ретиналь [74, 84, 85]. При очистке микросомной фракции были выявлены два белка — 34 и 54 кДа [86]. Меньший белок, называемый ретинол-дегидрогеназой I или RoDH(I), был клонирован [87] и продемонстрировано его перекрестное NADH-зависимое связывание с холо-кРСБ, но не с апо-кРСБ, что подтверждает прямое взаимодействие между этими белками [68, 86]. В настоящее время проводятся многочисленные интенсивные исследования, направленные на изучение свойств и кинетических параметров нескольких обнаруженных ретинол- и ретиналь-дегидрогеназ [88—90].

По некоторым данным, холо-кРСБ может выступать в качестве субстрата для частично очищенной цитозольной дегидрогеназы [91], а апо-кРСБ способен ингибировать эту реакцию. Однако есть и противоположные данные, свидетельствующие о том, что субстратом для специфической дегидрогеназы может быть свободный ретинол [92, 93].

Сравнение скоростей реакции окисления ретинола микросомами кишечника показало, что ско-

рость реакции возрастает приблизительно в 50 раз, если в качестве субстрата выступает не свободный, а связанный с кРСБ-II ретинол [75]. Этот факт свидетельствует о том, что кРСБ-II может защищать ретинол от спонтанного окисления в эпителии кишечника.

Транспорт ретиноидов между клеточными связывающими белками и другими клеточными компонентами. Клеточные связывающие белки способны взаимодействовать не только с ферментами, но и с другими клеточными компонентами и, вероятно, способствуют выполнению их функций. В настоящее время подтверждения такого рода взаимодействия довольно малочисленны или вообще отсутствуют по сравнению с доказательствами существования метаболизирующих ретиноиды ферментов. Некоторые из таких доказательств были приведены выше, а некоторые представлены здесь, но их следует рассматривать как гипотезу, а не как установленный факт. Исследования внутриклеточного транспорта ретинола, проводимые в отделе биохимии коферментов Института биохимии НАН Украины, и осуществляются для проверки и подтверждения этих гипотез.

Перенос ретинола. Проникновение ретинола в клетку происходит вследствие абсорбции из просвета кишечника (абсорбирующие клетки) или из межклеточной жидкости (клетки-мишени). Данные литературы свидетельствуют о том, что в механизме поглощения ретинола принимает участие специфический белок-транспортер [94], однако факт существования ассоциированного с мембраной специфического переносчика ретинола является недоказанным [59—61].

Предполагают, что ретинол высвобождается из транспортера и переходит непосредственно к кРСБ-II за счет специфического взаимодействия, а не обычной диффузии. Однако это еще не было продемонстрировано однозначно. Таким же образом поглощение ретинола клетками-мишенями из межклеточной жидкости может осуществляться с участием специфического рецептора РСБ. Допуская существование подобного рецептора, можно было бы предложить следующий путь поглощения ретинола: РСБ-рецептор к РСБ. В пользу предложенного механизма свидетельствует такой факт: транспорт ретинола от РСБ и поглощение ретинола клетками Sertoli (в культуре) существенно уменьшаются при достижении насыщения всего доступного внутри клетки кРСБ. Другой вероятный механизм поглощения доставленного при помощи РСБ ретинола может включать сопутствующую этерификацию—этерификацию, в которой непосредственное участие принимает кРСБ (как это было

описано для плазматических мембран пигментного эпителия сетчатки [82]). Нельзя не принимать во внимание того, что механизм проникновения ретинола внутрь клетки может варьировать в зависимости от типа клеток.

Внутриклеточный транспорт ретиноидов. Тот факт, что кРСБ часто присутствует в высоких концентрациях в клетках, синтезирующих и секретирующих РСБ, например, паренхимных и stellatных клетках печени, клетках Sertoli семенных, клетках пигментного эпителия сетчатки, позволяет предположить возможную роль кРСБ в доставке ретинола к вновь синтезированному РСБ. Однако, поскольку синтезированный клеткой апо-РСБ находится внутри полостей эндоплазматического ретикула и аппарата Гольджи, такой транспорт не может осуществляться за счет прямого взаимодействия белков, а должен обязательно включать процесс переноса ретинола через мембрану этих органелл. Этот процесс практически совершенно не изучен, однако нами было показано, что в клетках слизистой железистого желудка кур комплекс ретинол—кРСБ способен специфически связываться с аппаратом Гольджи, доставляя ретинол к органелле, в которой происходит окончательное формирование секрета [95]. Для свободного лиганда специфическое связывание отсутствует, возможно, потому, что вследствие гидрофобной природы ретинола количество неспецифической ассоциации с мембраной достаточно велико и маскирует более низкое специфическое взаимодействие.

Ядра клеток также содержат ограниченное количество специфических участков, связывающих ретинол и, возможно, РК [96—98]. Эти участки проявляются только в том случае, если лиганд взаимодействует с ядрами в виде комплекса с соответствующим связывающим белком — кРСБ или кРКСБ.

Свободный лиганд так же, как и в случае аппарата Гольджи, взаимодействует с ядрами неспецифически, вероятно, вследствие той же причины, которая упоминалась выше. Следовательно, нельзя однозначно ответить на вопрос, является ли связывающий белок обязательным условием доставки ретинола к специфическим ядерным рецепторам или же свободный ретинол также способен связываться с этими рецепторами. Противоречивые данные получены при изучении возможного участия ядерной мембраны в процессе взаимодействия ретинола с клеточным ядром [98—100]. Нами в экспериментах *in vitro* показано, что ретинол может проникать в клеточное ядро путем специфического транспорта через ядерную мембрану и, специфически связываясь с рецепторами на хромати-

не, способен воздействовать на процессы экспрессии генов [100].

Хотя довольно многообещающе выглядит предположение о том, что связывающие белки выступают в роли «челнока», доставляя свой лиганд к ядерным рецепторам, до сих пор не удалось еще продемонстрировать какого-либо функционального значения этих рецепторов. Количество последних у крыс с авитаминозом А увеличивается (за счет синтеза новых молекул или вследствие увеличения количества доступных для ретинола рецепторов), что свидетельствует о физиологической значимости таких рецепторов [96, 97, 100].

Было показано, что РРК способны связывать ретинол, хотя и с меньшей аффинностью, чем ретиноевую кислоту. Таким образом, необходимо дополнительное тщательное исследование этого вопроса, чтобы выяснить, являются ли упомянутые выше ядерные рецепторы членами семейства РРК либо существуют отдельные рецепторы для ретинола. Например, было показано, что сверхэкспрессия кРКСБ в линии клеток тератокарциномы F9 приводит к снижению эффективности РК в регуляции экспрессии определенных генов. Это может свидетельствовать о непосредственном участии кРКСБ в процессах регуляции, в частности, посредством связывания РК и препятствовании взаимодействию РК с определенными ядерными рецепторами, что в данном случае приводило к активации экспрессии некоторых генов [101].

Суммируя вышеизложенное, видно, что на сегодняшний день достигнут значительный прогресс в области изучения клеточных ретиноидсвязывающих белков. За последнее десятилетие количество известных белков удвоилось, их структура достаточно хорошо изучена, стала более понятной регуляция синтеза и, наконец, прояснилась их роль в клетке. Однако остается еще очень много белых пятен. В первую очередь это касается взаимодействия кРКСБ—фермент в реакциях этерификации, окисления и восстановления. Предстоит выяснить возможную роль этих белков в доставке лиганда к ядерным рецепторам, ответить на вопросы, связанные с транспортом геометрических изомеров ретинола и ретиноевой кислоты, особенно 9-цис-, дидегидроретиноевой кислоты и ретрооксиретинола, а также многое другое. В частности, практически не изучены процессы внутриклеточного транспорта витамина А, неизвестно, например, каким образом ретинол и ретиноевая кислота попадают в клеточное ядро, считающееся главной мишенью действия этого витамина. Все эти вопросы можно рассматривать в качестве основных направлений в области биохимии витамина А.

С. В. Четиркин, Л. О. Чернухина, Г. В. Донченко

Клітинні ретинолзв'язуючі білки. Властивості та функції

Резюме

В огляді наведено сучасні дані стосовно властивостей та функцій двох представників родини вітамін А-зв'язуючих білків — клітинного ретинолзв'язуючого білка першого та другого (кРЗБ-I і кРЗБ-II) типів. Обговорюється участь цих білків у внутрішньоклітинному транспорті та метаболізмі вітаміну А.

S. V. Chetyrkin, L. A. Chernukhina, G. V. Donchenko

Cellular retinol-binding proteins. The properties and functions

Summary

Here we report the current data about the properties and functions of two representatives of the retinoid binding protein family — cellular retinol-binding protein type I and type II. Participation of these proteins in the intracellular transport and metabolism of vitamin A are discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Clarke S. D., Armstrong M. K. Cellular lipid binding proteins: expression, function, and nutritional regulation // *FASEB J.*—1989.—3.—P. 2480—2487.
2. Bashor M. M., Toft D. O., Chytil F. *In vitro* binding of retinol to rat-tissue components // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1973.—70.—P. 3483—3487.
3. Bashor M. M., Chytil F. Cellular retinol-binding protein // *Biochim. et biophys. acta.*—1975.—104.—P. 671—678.
4. Ong D. E., Chytil F. Multiple retinol-binding protein in rabbit lung // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1974.—59.—P. 221—229.
5. Ong D. E., Chytil F. Retinoic acid binding protein in rat tissue. Partial purification and comparison to rat tissue retinol-binding protein // *J. Biol. Chem.*—1975.—250.—P. 6113—6117.
6. Ong D. E., Chytil F. Specificity of cellular retinol-binding protein for compounds with vitamin A activity // *Nature.*—1975.—255.—P. 74—75.
7. Saari J. C., Bredberg L., Garwin S. Identification of the endogenous retinoids associated with three callular retinoid binding proteins from bovine and retinol pigment epithelium // *J. Biol. Chem.*—1982.—257.—P. 13329—13333.
8. Wiggert B. O., Chader G. J. A receptor for retinol in the developing retina and pigment epithelium // *Exp. Eye Res.*—1975.—21.—P. 143—151.
9. Chytil F., Ong D. E. Cellular retinoid-binding proteins // *The retinoids* / Eds M. Sporn, A. Roberts, D. S. Goodman.—New York: Acad. press, 1984.—P. 89—123.
10. Четиркин С. В., Чернухина Л. А., Донченко Г. В. Выделение кРКСБ из печени быка // *Укр. біохім. журн.*—1993.—65, № 3.—С. 101—103.
11. Чернухина Л. А., Пинская И. Е., Донченко Г. В. Клеточные ретинолсвязывающие белки слизистой промежуточной зоны железистого желудка кур // *Укр. біохім. журн.*—1989.—61, № 5.—С. 16—23.
12. Sani B. P. Parasite retinoid-binding proteins // *Meth. Enzymol.*—1990.—189.—P. 348—356.
13. Shim K., Picking W. L., Kuty R. K., Thomas C. F., Wiggert B. N., Stark W. S. Control of *Drosophila* retinoid and fatty acid binding glycoprotein expression by retinoids and retinoic acid: northern, western and immunocytochemical analyses // *Exp. Eye Res.*—1997.—65, N 5.—P. 717—727.

14. MacDonald P. N., Ong D. E. Binding specificities of cellular retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein, Type II // *J. Biol. Chem.*—1987.—262.—P. 10550—10556.
15. Cogan V., Kopelman M., Mokady S., Shinitzky M. Binding affinities of retinol and related compounds to retinol binding proteins // *Eur. J. Biochem.*—1976.—65.—P. 71—78.
16. Ong D. E., Chytil F. Cellular retinol-binding protein from rat liver: Purification and characterization // *J. Biol. Chem.*—1978.—253.—P. 828—832.
17. Levin M. S., Locke B., Yang N. C., Li E., Gordon J. I. Comparison of ligand binding properties of two homologous rat apocellular retinol-binding proteins expressed in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.*—1988.—263.—P. 17715—17723.
18. Ross A. C., Takahshi Y. I., Goodman D. S. The binding protein for retinol from rat testis cytosol. Isolation and partial characterization // *J. Biol. Chem.*—1978.—253.—P. 6591—6598.
19. Ong D. E., Chytil F. Cellular retinoic acid-binding protein from rat testis: Purification and characterization // *J. Biol. Chem.*—1978.—253.—P. 4551—45.
20. Saari J. C., Futterman S., Bredberg L. Cellular retinol- and retinoic acid-binding proteins from bovine retina // *J. Biol. Chem.*—1978.—253.—P. 6432—6436.
21. Fex G., Johannesson G. Purification and partial characterization of a cellular retinol-binding protein from human liver // *Biochim. et biophys. acta.*—1982.—714.—P. 536—542.
22. Ong D. E. Purification and partial characterization of a cellular retinol-binding protein from human liver // *Cancer Res.*—1982.—42.—P. 1033—1037.
23. Colantuoni V., Cortese R., Nilsson M., Lundvall J., Bavik C. O., Eriksson U., Peterson P. A., Sundelin J. Cloning and sequencing of a full length cDNA corresponding to human cellular retinol-binding protein // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1985.—130.—P. 431—439.
24. Sundelin J., Anundi H., Tragardh L., Eriksson U., Lind P., Roune H., Peterson P. A., Rask L. The primary structure of rat liver cellular retinol-binding protein // *J. Biol. Chem.*—1985.—260.—P. 6488—6493.
25. Eriksson U., Das K., Busch C., Nordlinder H., Rask L., Sundelin J., Sallstrom J., Peterson P. A. Cellular retinol-binding protein. Qualification and distribution // *J. Biol. Chem.*—1984.—259.—P. 13464—13470.
26. Ong D. E. A novel retinol-binding protein from rat: Purification and partial characterization // *J. Biol. Chem.*—1984.—259.—P. 1476—1482.
27. Li E., Demmer L. A., Sweelers D. A., Ong D. E., Gordon J. I. Rat cellular retinol-binding protein type II: Use of cloned cDNA to define its primary structure, tissue-specific expression, and developmental regulation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83.—P. 5779—5783.
28. Schaefer W. H., Kakkad B., Crow J. A., Blair I. A., Ong D. E. Purification, primary structure characterization, and cellular distribution of two forms of cellular retinol-binding protein, type II from adult rat small intestine // *J. Biol. Chem.*—1989.—264.—P. 4212—4221.
29. Ong D. E., Kakkad B., MacDonald P. N. Acyl-CoA-independent esterification of retinol bound to CRBP-II by microsomes from rat small intestine // *J. Biol. Chem.*—1987.—262.—P. 2729—2736.
30. Li E., Qian S. J., Winter N. S., d'Avignon Avignon A., Levin M. S., Gordon J. I. Fluorine nuclear magnetic resonance analysis of the ligand-binding proteins of two homologous rat cellular retinol-binding proteins expressed in *E. coli* // *J. Biol. Chem.*—1991.—266.—P. 3622—3629.
31. Adachi N., Smith J. E., Sklan D., Goodman D. S. Radioimmunoassay studies of the tissue distribution and subcellular localization of cellular retinol-binding proteins in rats // *J. Biol. Chem.*—1981.—256.—P. 9471—9476.
32. Zetterstrom R. H., Lindqvist E., de Urquiza A. M., Tomac A., Eriksson U., Perlmann T., Olson L. Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid // *Eur. J. Neurosci.*—1999.—11, N 2.—P. 407—416.
33. Porter S. B., Fraker L. D., Chytil F., Ong D. E. Localization of cellular retinol-binding protein in several rat tissues // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1983.—80.—P. 6586—6590.
34. Kato M., Sung W. K., Kato K., Goodman D. S. Immunohistochemical studies on the localization of cellular retinol-binding protein in rat testis and epididymis // *Biol. Reprod.*—1985.—32, N 1.—P. 173—189.
35. Rajan N., Kidd G. L., Talmage D. A., Blaner W. S., Sahara A., Goodman D. S. Cellular retinoic acid-binding protein messenger RNA: Levels in rat tissues and localization in rat testis // *J. Lipid Res.*—1991.—32.—P. 1195—1204.
36. Levin M. S., Li E., Ong D. E., Gordon J. I. Comparison of the tissue-specific expression and developmental regulation of two closely linked rodent genes encoding cytosolic retinol-binding proteins // *J. Biol. Chem.*—1987.—262.—P. 7118—7124.
37. Fex G., Johannesson G. Radioimmunological determination of cellular retinol-binding protein in human tissue extracts // *Cancer Res.*—1984.—44.—P. 3029—3032.
38. Ong D. E., Page D. L. Quantitation of cellular retinol-binding protein in human organs // *Amer. J. Clin. Nutr.*—1986.—44.—P. 425—430.
39. Kato M., Kato K., Goodman D. S. Immunocytochemical studies on the localization of plasma and of cellular retinol-binding proteins and of transthyretin (prealbumin) in rat liver and kidney // *J. Cell. Biol.*—1984.—98.—P. 1696—1704.
40. Blomhoff R., Rasmussen M., Nilsson A., Norum K. R., Berg T., Blaner W. S., Kato M., Mertz J. R., Goodman D. S., Eriksson U., Peterson P. A. Hepatic retinol metabolism. Distribution of retinoids enzymes and binding proteins in isolated rat liver cells // *J. Biol. Chem.*—1985.—260.—P. 13560—13565.
41. Blaner W. S., Dixon J. L., Moriwaki H., Martino R. A., Stein O., Goodman D. S. Studies on the *in vivo* transfer of retinoids from parenchymal to stellate cells in rat liver // *Eur. J. Biochem.*—1987.—164.—P. 301—307.
42. Hendriks H. F., Blaner W. S., Wennekers H. M., Piantedosi R., Brouwer A., DeLeeuw A. M., Goodman D. S., Knook D. L. Distributions of retinoids, retinoid-binding proteins and related parameters in different types of liver cells isolated from young and old rats // *Eur. J. Biochem.*—1988.—171.—P. 237—244.
43. Andersen K. B., Nilsson A., Blomhoff H. K., Oyen T. B., Gabrielsen O. S., Norum K. R., Blomhoff R. Direct mobilization of retinol from hepatic perisinusoidal stellate cells to plasma // *J. Biol. Chem.*—1992.—267.—P. 1340—1344.
44. Porter S. B., Ong D. E., Chytil F., Orgebin-Crist M.-C. Localization of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic acid-binding protein in the rat testis and epididymis // *J. Androl.*—1985.—6.—P. 197—212.
45. Garrett S. H., Garrett J. E., Douglass J. *In situ* histochemical analysis of region-specific gene expression in the adult rat epididymis // *Mol. Reprod. Dev.*—1991.—30.—P. 1—17.
46. Ong D. E., Chytil F. Presence of novel retinoic acid-binding proteins in the lumen of rat epididymis // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1988.—267.—P. 474—478.
47. Brooks D. E. Androgen-regulated epididymal secretory proteins associated with post-testicular sperm development // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1987.—513.—P. 179—194.
48. Brooks D. E. The major androgen-regulated secretory proteins

- of the rat epididymis bear sequence homology with members of the alpha 2u-globulin superfamily // *Biochem. Int.*—1987.—14.—P. 235—240.
49. Huggenvik J., Griswold M. D. Retinol-binding protein in rat testicular cells // *J. Reprod. Fert.*—1981.—61.—P. 403—408.
 50. Hollander D. Intestinal absorption of vitamins A, E, D, and K // *J. Lab. Clin. Med.*—1981.—97.—P. 449—462.
 51. Ong D. E., Page D. L. Cellular retinol-binding protein (type two) is present in human small intestine // *J. Lipid. Res.*—1987.—28.—P. 739—745.
 52. Finlay J. A., DeLuca H. F. Purification and properties of an 18-kilodalton, 1,25-dihydroxyvitamin D₃-modulated protein from embryonic chick intestine // *Biochemistry.*—1988.—27.—P. 3381—3387.
 53. Inagami S., Ong D. E. Purification and partial characterization of cellular retinol-binding protein, type two, from human small intestine // *J. Nutr.*—1992.—122.—P. 450—456.
 54. Finlay J. A., Strom M., Ong D. E., DeLuca H. F. Regulation of cellular retinol-binding protein type II by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ // *Biochemistry.*—1990.—29.—P. 4914—4921.
 55. Crow A., Ong D. E. Cell-specific immunohistochemical localization of a cellular retinol-binding protein (type two) in the small intestine of rat // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—82.—P. 4707—4711.
 56. Whitney D., Massaro G. D., Massaro D., Clerch L. B. Gene expression of cellular retinoid-binding proteins: modulation by retinoic acid and dexamethasone in postnatal rat lung // *Pediatr. Res.*—1999.—45, N 1.—P. 2—7.
 57. Ong D. E., Lucas P. C., Kakkad B., Quick T. C. Ontogeny of two vitamin A-metabolizing enzymes and two retinol-binding proteins present in the small intestine of rat // *J. Lipid. Res.*—1991.—31.—P. 1521—1527.
 58. Sporn M. B., Roberts A. B., Goodman D. S. The retinoids: Biology, chemistry, and medicine.—New York: Raven press, 1994.—670 p.
 59. Bavik C. O., Peterson P. A., Eriksson U. Retinol-binding protein mediates uptake of retinol to cultured human keratinocytes // *Exp. Cell Res.*—1995.—216.—P. 358—362.
 60. Dew S. E., Ong D. E. Specificity of the retinol transporter of the rat small intestine brush border // *Biochemistry.*—1994.—33.—P. 12340—12345.
 61. Hollander D., Muralidhara K. S. Vitamin A₁ intestinal absorption *in vivo*: influence of luminal factors on transport // *Amer. J. Physiol.*—1977.—232.—P. E471—477.
 62. Fex G., Johannesson G. Retinol transfer across and between phospholipid bilayer membranes // *Biochim. et biophys. acta.*—1988.—944.—P. 249—255.
 63. Herr F. M., Ong D. E. Differential interaction of lecithin-retinol acyltransferase with cellular retinol binding proteins // *Biochemistry.*—1992.—31.—P. 6748—9—6755.
 64. Noy N., Blaner W. S. Interactions of retinol with binding proteins: studies with rat cellular retinol-binding protein and with rat retinol-binding protein // *Biochemistry.*—1991.—30.—P. 6380—6386.
 65. Li E., Norris A. W. Structure/function of cytoplasmic vitamin A-binding proteins // *Annu. Rev. Nutr.*—1996.—16.—P. 205—234.
 66. Ong D. E. Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins // *Nutr. Rev.*—1994.—52, N 2.—P. S24—S31.
 67. Napoli J. L. Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: roles of CRBP and CRABP in retinoic acid homeostasis // *J. Nutr.*—1993.—123.—P. 362—366.
 68. Napoli J. L., Boerman M. H. E. M., Chai X., Zhai Y., Posch K. Enzymes and binding proteins affecting retinoic acid concentrations // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*—1995.—53.—P. 497—502.
 69. Ong D. E., Newcomer M. E., Chytil F. Cellular retinoid-binding proteins // *Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine.*—New York: Raven press, 1994.—2.—P. 283—317.
 70. Szuts E. Z., Harosi P. I. Solubility of retinoids in water // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1991.—287.—P. 297—304.
 71. Penzes P., Napoli J. L. Holo-cellular retinol-binding protein: distinction of ligand-binding affinity from efficiency as substrate in retinal biosynthesis // *Biochemistry.*—1999.—38, N 7.—P. 2088—2093.
 72. Burns L. L., Dalessio P. M., Ropson I. J. Folding mechanism of three structurally similar beta-sheet proteins // *Proteins.*—1998.—33, N 1.—P. 107—118.
 73. Blomhoff R., Green M. H., Green J. B., Berg T., Norum K. R. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport and storage // *Physiol. Rev.*—1991.—71.—P. 951—990.
 74. Napoli J. L., Posch K. P., Fiorella P. D., Boerman M. H. E. M. Physiologic occurrence, biosynthesis and metabolism of retinoic acid: evidence for roles of CRBP and CRABP in the pathway of retinoic acid homeostasis // *Biomed. Pharmacother.*—1991.—45.—P. 131—145.
 75. Kakkad B. P., Ong D. E. Reduction of retinaldehyde bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine // *J. Biol. Chem.*—1988.—263.—P. 12916—12919.
 76. Blomhoff R., Green M. H., Berg T., Norum K. R. Transport and storage of vitamin A // *Science.*—1990.—250.—P. 399—404.
 77. Levin M. S. Intestinal absorption and metabolism of vitamin A // *Physiology of the Gastrointestinal Tract.*—New York: Raven press, 1994.—3.—P. 1957—1978.
 78. Ong D. E., MacDonald P. N., Gubitosi A. M. Esterification of retinol in liver: possible participation by cellular retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein II // *J. Biol. Chem.*—1988.—263.—P. 5789—5796.
 79. Randolph R. K., Winkler K. E., Ross A. C. Fatty acyl CoA-dependent and -independent retinol esterification by rat liver and lactating mammary gland microsomes // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1991.—288.—P. 500—508.
 80. Yost R. W., Harrison E. H., Ross A. C. Esterification by rat liver microsomes of retinol bound to cellular retinol-binding protein // *J. Biol. Chem.*—1988.—263.—P. 18693—18701.
 81. Boerman M. H. E. M., Napoli J. L. Cholate-independent retinyl ester hydrolysis: stimulation by apo-cellular retinol-binding protein // *J. Biol. Chem.*—1991.—266.—P. 22273—22278.
 82. Ottonello S., Petrucco S., Maraini G. Vitamin A uptake from retinol-binding protein in a cell-free system from pigment epithelial cells of bovine retina // *J. Biol. Chem.*—1987.—262.—P. 3975—3981.
 83. Kim C. I., Leo M. A., Lieber C. S. Retinol forms retinoic acid via retinal // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1992.—294.—P. 388—393.
 84. Ottonello S., Scita G., Mantovani G., Cavazzini D., Rossi G. L. Retinol bound to cellular retinol-binding protein is a substrate for cytosolic retinoic acid synthesis // *J. Biol. Chem.*—1993.—268.—P. 27133—27142.
 85. Posch K. C., Boerman M. H. E. M., Burns R. D., Napoli J. L. Holocellular retinol binding protein as a substrate for microsomal retinal synthesis // *Biochemistry.*—1991.—30.—P. 6224—6230.
 86. Boerman M. H. E. M., Napoli J. L. Characterization of a microsomal retinol dehydrogenase: a short-chain alcohol dehydrogenase with integral and peripheral membrane forms that

- interacts with holo-CRBP (type I) // *Biochemistry*.—1995.—34.—P. 7027—7037.
87. Chai X., Boerman M. H. E. M., Zhai Y., Napoli J. L. Cloning of a cDNA for liver microsomal retinol dehydrogenase // *J. Biol. Chem.*—1995.—270.—P. 3900—3904.
 88. Bhat P. V., Samaha H. Kinetic properties of the human liver cytosolic aldehyde dehydrogenase for retinal isomers // *Biochem. Pharmacol.*—1999.—57, N 2.—P. 195—197.
 89. Yamamoto M., Drager U. C., Ong D. E., McCaffery P. Retinoid-binding proteins in the cerebellum and choroid plexus and their relationship to regionalized retinoic acid synthesis and degradation // *Eur. J. Biochem.*—1998.—257, N 2.—P. 344—350.
 90. Lamb A. L., Wang X., Napoli J. L., Newcomer M. E. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of retinal dehydrogenase type II // *Acta crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*—1998.—54, pt 4.—P. 639—642.
 91. Posch K. C., Burns R. D., Napoli J. L. Biosynthesis of all-trans-retinoic acid from retinal // *J. Biol. Chem.*—1992.—267.—P. 19676—19682.
 92. Kedishvili N. Y., Gough W. H., Davis W. I., Persons S., Li T. K., Bosron W. F. Effect of cellular retinol-binding protein on retinol oxidation by human class IV retinol/alcohol dehydrogenase and inhibition by ethanol // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1998.—249.—P. 191—196.
 93. Gough W. H., Van Ooteghem S., Sint T., Kedishvili N. Y. cDNA cloning and characterization of a new human microsomal NAD⁺-dependent dehydrogenase that oxidizes all-trans-retinol and alpha-hydroxysteroids // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 19778—19785.
 94. Said H. M., Ong D., Redha R. Intestinal uptake of retinol in suckling rats: Characteristics and ontogeny // *Pediatr. Res.*—1988.—24.—P. 481—485.
 95. Чернухина Л. А., Халмуратов А. Г., Блажевич М. А. Взаимодействие комплекса ретинол—кРСБ с аппаратом Гольджи слизистых клеток железистого желудка кур // *Укр. біохім. журн.*—1988.—60.—С. 29—33.
 96. Takase S., Ong D. E., Chytil F. CRBP allows specific interaction of retinol with the nucleus *in vitro* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1979.—76.—P. 2204—2208.
 97. Takase S., Ong D. E., Chytil F. Transfer of retinoic acid from its complex with cellular retinoic acid-binding protein to the nucleus // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1986.—247.—P. 328—334.
 98. Barkai U., Sherman M. I. Analysis of the interactions between retinoid-binding proteins and embryonal carcinoma cells // *J. Cell. Biol.*—1987.—104.—P. 671—678.
 99. Liao G., Ong D. E., Chytil F. Interaction of the retinol-cellular retinol-binding protein complex with isolated nuclei and nuclear components // *J. Cell. Biol.*—1981.—92.—P. 63—68.
 100. Четыркин С. В., Чернухина Л. А., Донченко Г. В. Транспорт ретинола в клеточное ядро *in vitro* // *Укр. біохім. журн.*—1998.—70.—С. 15—21.
 101. Boylan J. F., Gudas L. J. Overexpression of the cellular retinoic acid-binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in P9 teratocarcinoma cells // *J. Cell. Biol.*—1991.—112.—P. 965—972.

УДК 577.161.1+577.112
Поступила в редакцию 17.05.99