



NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

VKP 17. 3. 2017

NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

Široká rodina receptorů, které se vážou na mnoho lipoidních hormonů a extracelulárních ligandů.

Působí jako transkripční faktory indukované ligandy, regulují expresi cílových genů účastní se vývoje, reprodukce a metabolismu.

NRs vážou se na steroidy, tyreoidní hormony (TH) vitaminy a metabolity FFA, cholesterolu a žlučových kyselin

„Orphan“ receptory jsou funkčně významné receptory, aniž je dosud znám jejich ligand. Mají role hlavně v intracelulárním metabolismu

NRs jsou farmakologickým cílem pro vývoj léků, zejména selektivních agonistů a antagonistů pro léčbu rakoviny a metabolických onemocnění.

U člověka se vyvíjejí také syndromy rezistence na danou léčbu, ve kterých hrají roli NRs, jejich izoformy i exprese fenotypů.

SUPERRODINA NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ

- × Společná struktura:
- × DNA vazná doména (DBD)
- × vazná doména pro ligand (LBD)
- × AP-1
- × AP-2
- × Typy nukleárních receptorů
 1. steroidní
 - × 2. nesteroidní (RXR heterodimer)
 - × 3. ERR

Endocrine Receptors

High-affinity hormonal ligands

ER α, β estrogen
AR testosterone
PR progesterone
GR glucocorticoid
MR mineralocorticoid

VDR vitamin D
EcR ecdysone
RAR α, β, γ retinoic acid
TR α, β thyroid hormone

Adopted Orphan Receptors

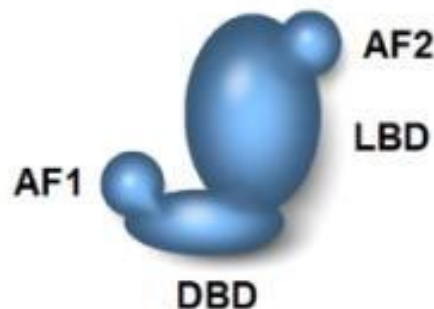
Low-affinity dietary ligands

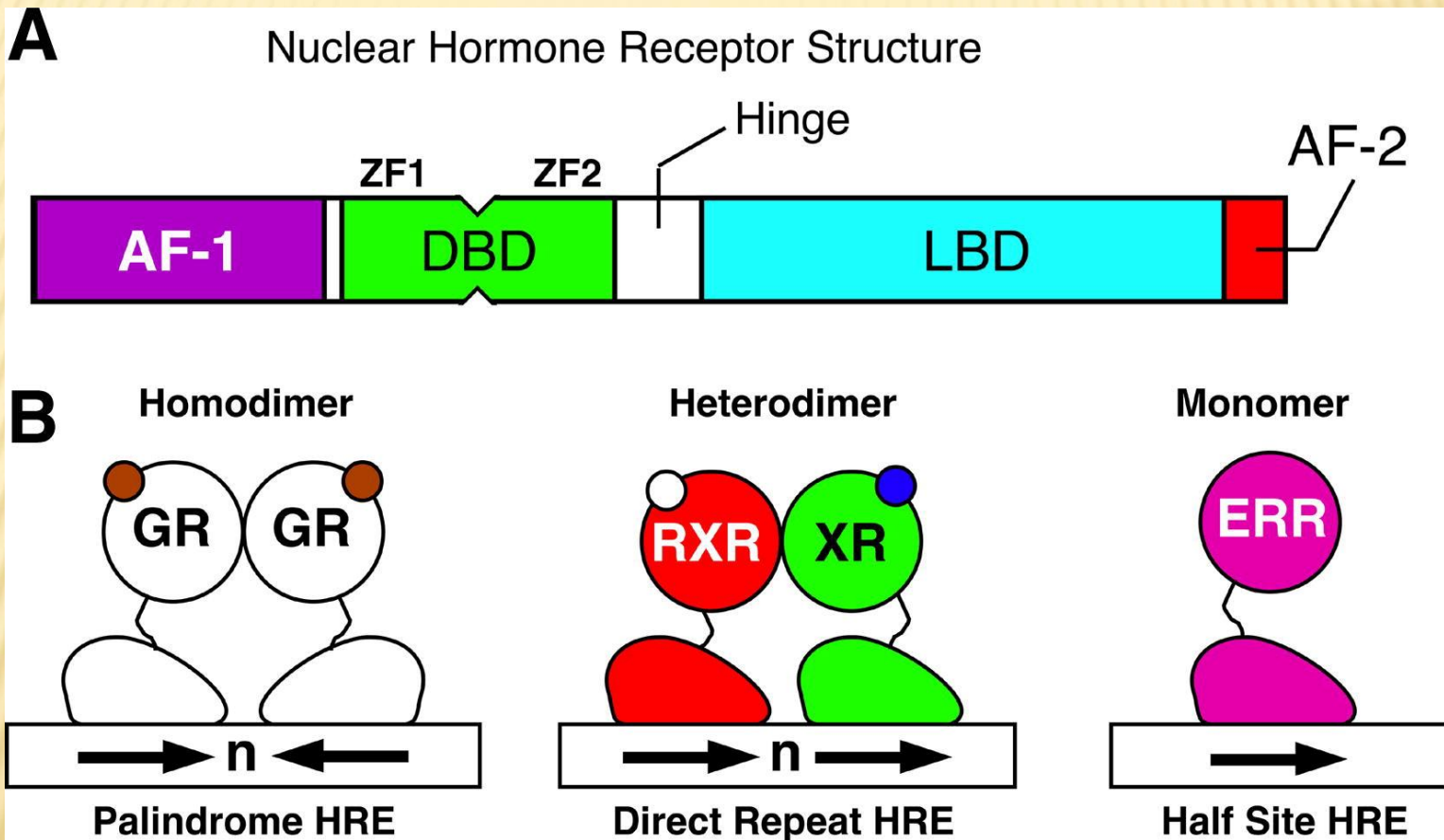
FXR bile acids
CAR xenobiotics
LXR α, β oxysterols
PXR/SXR xenobiotics
RXR α, β, γ 9-cis-RA
PPAR α, δ, γ fatty acids

Orphan Receptors

Unknown ligands

SF-1
SHP
TLX
PNR
LRH-1
DAX-1
GCNF
HNF-4 α, γ
TR 2,4
ERR α, β, γ
Rev-erb α, β
ROR α, β, γ
NGFI-B α, β, γ
COUP-TF α, β, γ





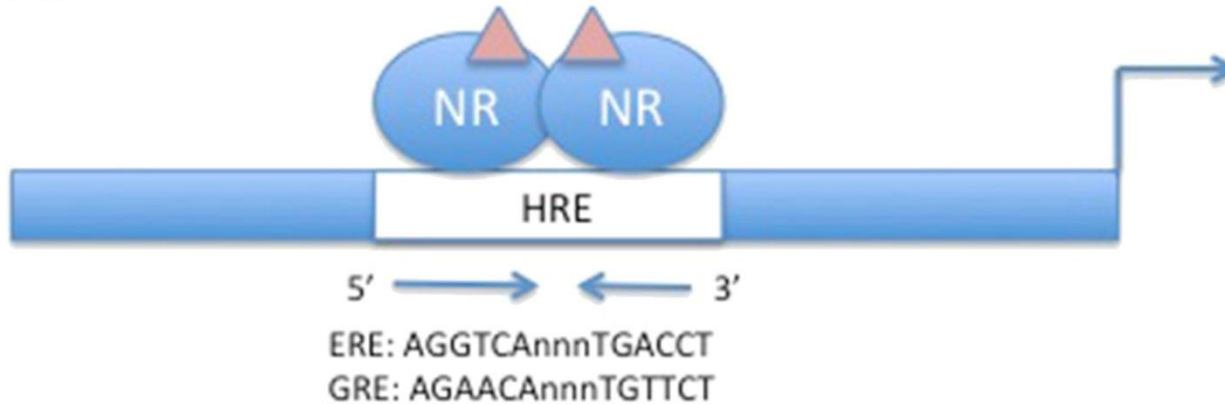
K PŘEDCHOZÍMU OBRÁZKU

- ✘ (A) Společná struktura domén NR s aktivací v N-terminální oblasti (AF-1), DNA vazné domény s (DBD) skládající se z dvou zinkových prstů (ZF), nekonzervované non-conserved závěsné oblasti (Hinge), domény pro vazbu ligand (LBD), a C-terminálního helixu AF-2.
- ✘ (B) Dimerizace a DNA vazné sekvence.
- ✘ From the left, homodimeric endocrine receptor (Palindrome HRE), RXR heterodimers (Direct Repeat HRE) and monomeric orphan receptor (Half Site HRE). Arrows: the consensus NR recognition sequence AGGTCA or a variant.

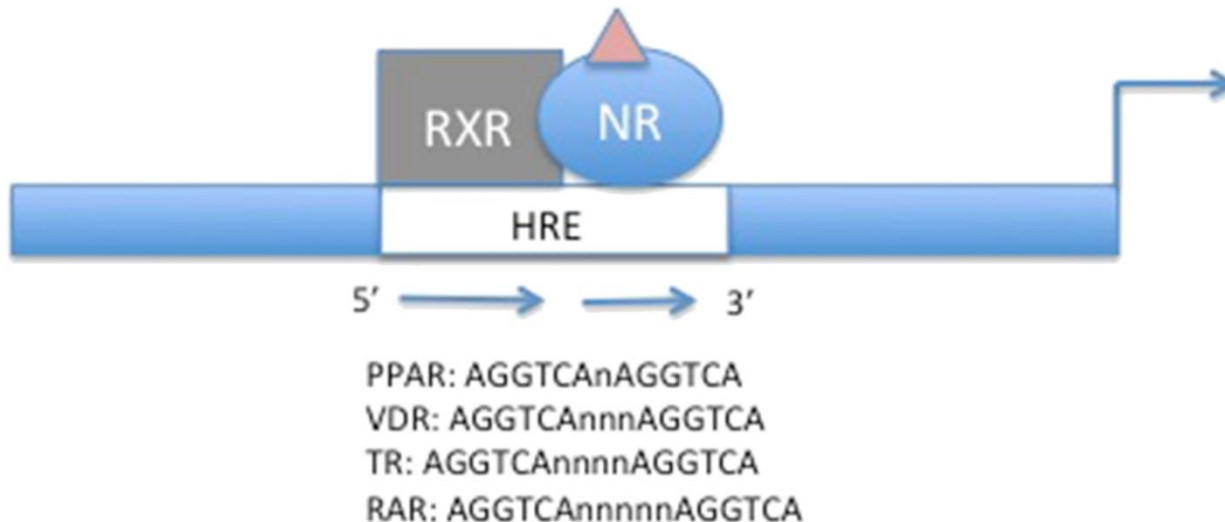
✘

✘

Type I NRs

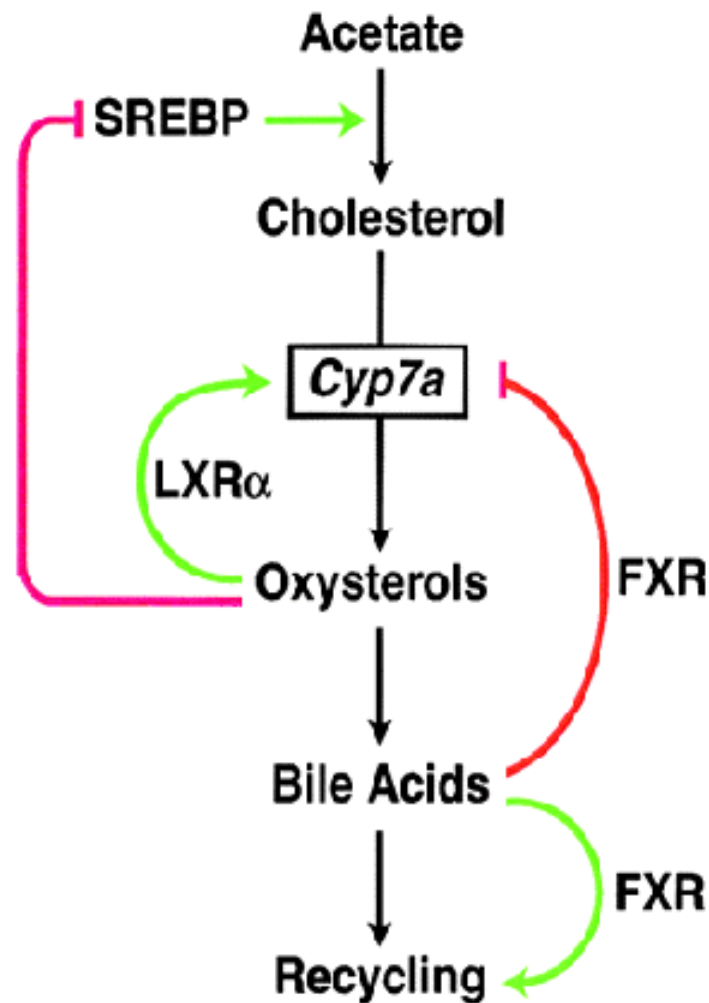


Type II NRs



Homodimerization of Type 1 NRs and heterodimerization of Type II NRs on hormone response elements (HREs). Symbols: red triangles-hormone; RXR: retinoid X receptor; NR: nuclear receptor; far right arrow denotes transcriptional activation; arrows below HRE indicate orientation of half site sequences that are shown below; and n: nucleotides in between half sites.

Regulatory Loops in Cholesterol Metabolism

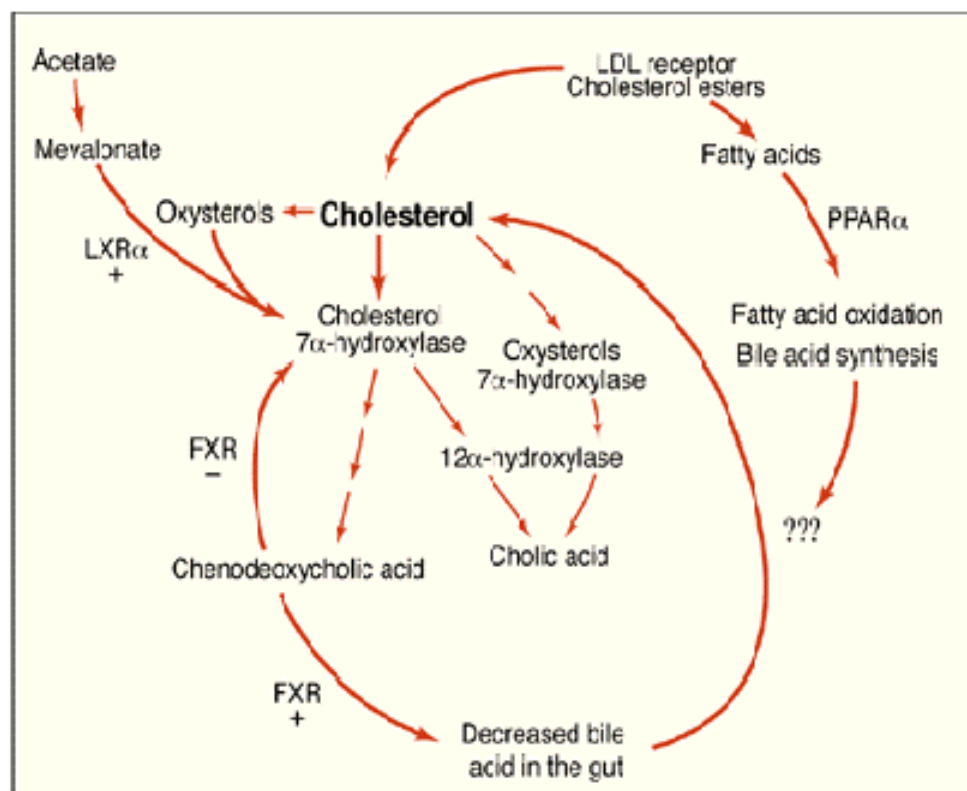


Black arrows indicate metabolic pathways involving cholesterol and bile acids.

The cholesterol 7α -hydroxylase target gene (*Cyp7a*) is boxed. Green arrows indicate positive regulation. Red brakes indicate negative regulation.

Bilious Biochemical Pathways

A number of nuclear receptors are involved in the biochemical pathways that regulate cholesterol homeostasis.

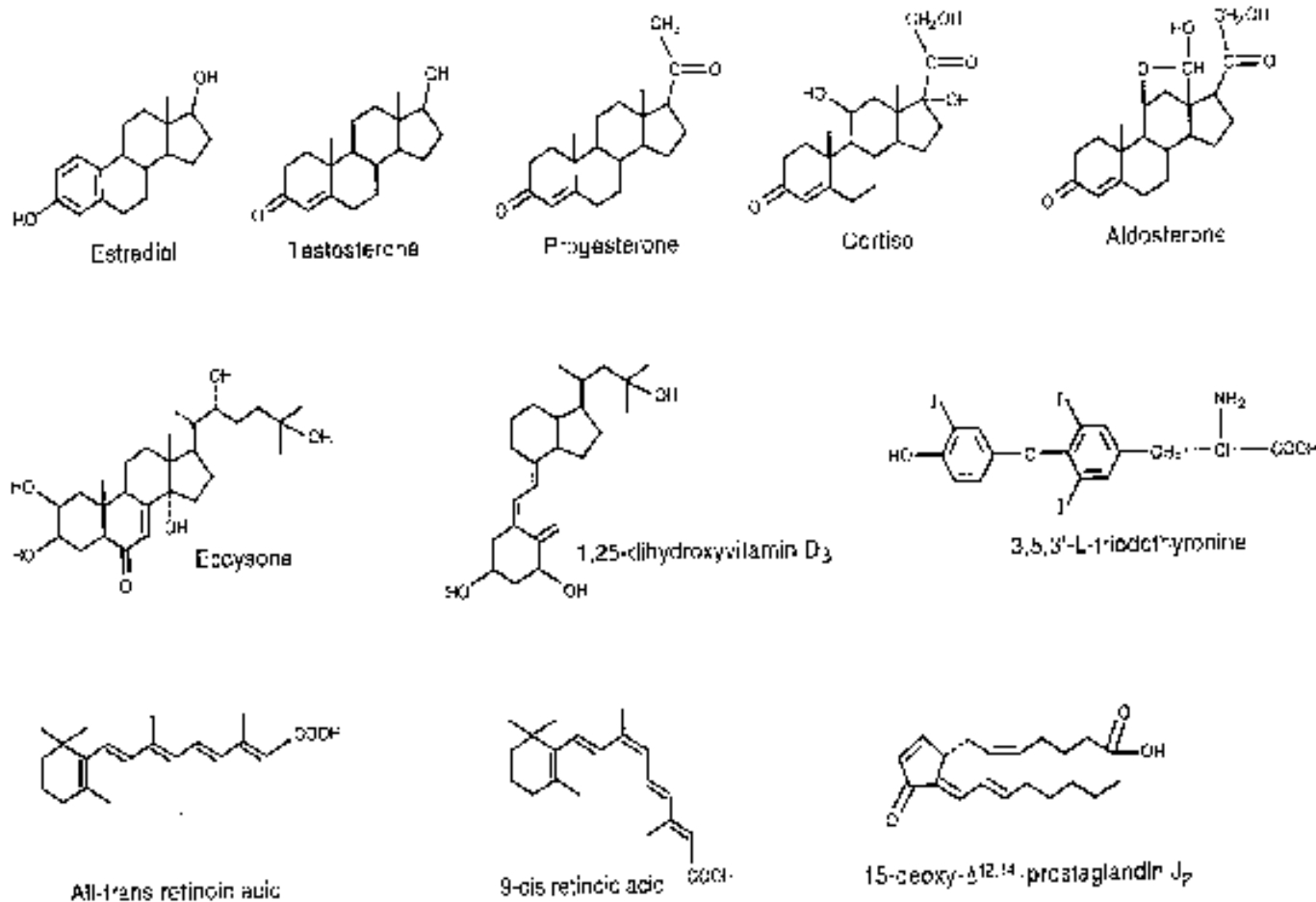


For example, FXR binds bile acids that are important in the disposal of cholesterol. When bound to bile acids, FXR switches off (-) production of cholesterol 7 α -hydroxylase (which is the rate-limiting step in bile acid synthesis) and switches on (+) synthesis of bile acid transporter proteins, leading to a decrease in bile acid in the gut and an increase in cholesterol levels in the blood. Another nuclear receptor, LXR α , which binds oxysterols, induces the synthesis of bile acids by up-regulating (+) cholesterol 7 α -hydroxylase. In addition to the classical pathway of bile acid synthesis, there is an alternative pathway in which oxysterol 7 α -hydroxylase is the rate-limiting enzyme.

SIGNÁLNÍ TRANSDUKCE

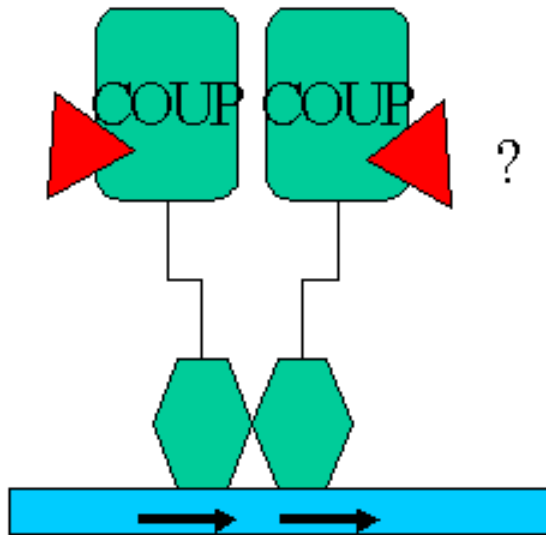
- × Ligandy jsou **hydrofilní** nebo **hydrofobní**
- × Receptor: **povrchový** nebo **intracelulární**
- × **lipofilní hormon**-váže se na intracelulární receptor-jádro-DNA a reguluje expresi
- × **hydrofilní liganda**-povrchový receptor
- × 1.kinázová signální cesta-kináza vstupuje do jádra (MAPK)
- × 2.kinázová cesta-uvolnění inhibičního proteinu-transkripční faktor vstupuje do jádra (NF- κ B)
- × 3.kináza-transkripční nebo regulační faktor vstupuje do jádra (JAK-STAT a Smad).

Structure of Known Ligands for Nuclear Hormone Receptors

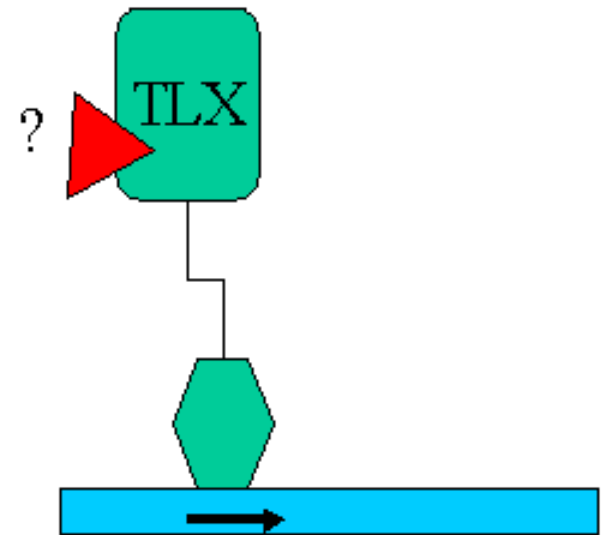


Orphan Receptors

Homodimeric Orphan Receptors



Monomeric Orphan Receptor



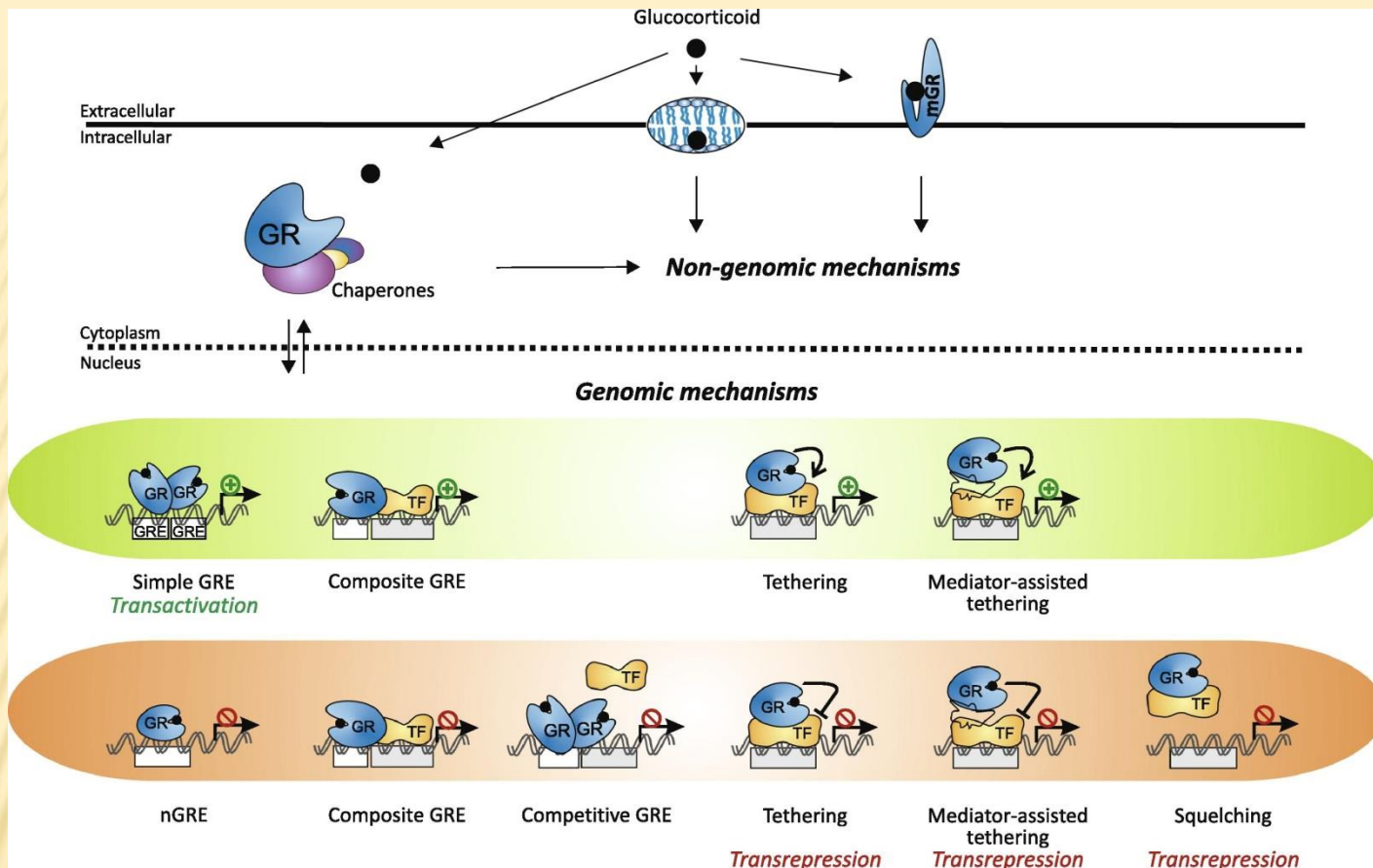
LXR- liver X-receptor
FXR-farnesoid X receptor

KONTROLA CHOLESTEROLOVÉHO KATABOLISMU NUKLEÁRNÍMI RECEPTORY TYPU „ORPHAN“

- ✘ Chenodeoxycholát, žlučová kyselina derivovaná z cholesterolu, vstupuje do interakce s FXR a suprimuje transkripci genu pro Cyp7a, jehož produkt katalyzuje rychlost limitující krok v syntéze žlučových kyselin z cholesterolu.
- ✘ FXR aktivovaný ligandem také indukuje transkripci IBABP, genu kódujícího transportní protein, který podporuje zpětné vychytávání žlučových kyselin v tenkém střevě.
- ✘ Metabolity cholesterolu regulují syntézu ŽK v játrech prostřednictvím zpětnovazebné suprese Cyp 7a a jejich transport přes střevo indukcí IBABP.

GLUKOKORTIKOIDY

- ✘ GR jsou schopny regulovat expresi genů procesem zvaným **transaktivace**. Cílem jsou geny typické pro metabolismus cukrů a tuků, např. glukózo-6-fosfatáza a PEPCK v játrech a FAS, ACC, SCD-1, SCD-2, SCD-3, GPAT3, GPAT4 v adipocytech.
- ✘ Zvýšená exprese odpovídajících produktů enzymatických genů ovlivňuje organismus a při exogenním podávání glukokortikoidů se rozvíjí tzv. '**metabolic side effect profile**' .
- ✘ Mnoho genů , které jsou upregulovány pod vlivem glukokortikoidů, mají jasně protizánětlivé účinky, např. GILZ a DUSP1 (MKP-1).



Aktivované glukokortikoidní receptory (GR) pracují několika mechanismy. Glukokortikoidy mohou působit membránovou modulací nezávislou na GR nebo pomocí na membránu vázaných nebo cytoplasmatické GR tzv. *negenomické efekty*. Cytoplasmatický GR mění po ligaci konformaci, zbavuje se části chaperonového komplexu a je naveden do jádra. Zde ligandy obsazené GR realizují transkripční pozitivní nebo negativní efekty cestou genomových mechanismů.

Abbreviations: GR, glucocorticoid receptor; GRE, glucocorticoid response element; mGR, membrane glucocorticoid receptor; TF, transcription factor.

GLUKOKORTIKOIDY-MECHANISMUS PŮSOBENÍ

- ✘ Alternativním mechanismem, kterým může glukokortikoidní receptor inhibovat genovou expresi, je **transreprese**. Ten je založen na interakci proteinů, „tethering“. GR přitom ovlivňuje genovou expresi interakcí s jiným transkripčním faktorem nebo faktory, aniž sám vstupuje do kontaktu s DNA.
- ✘ Transreprese představuje hlavní mechanismus, kterým GR inhibuje aktivitu transkripčních faktorů regulovaných imunitním systémem, jako jsou NF-κB, AP-1, CREB, NF-AT, STAT6, IRF3, STAT3, GATA-3 a t-Bet.

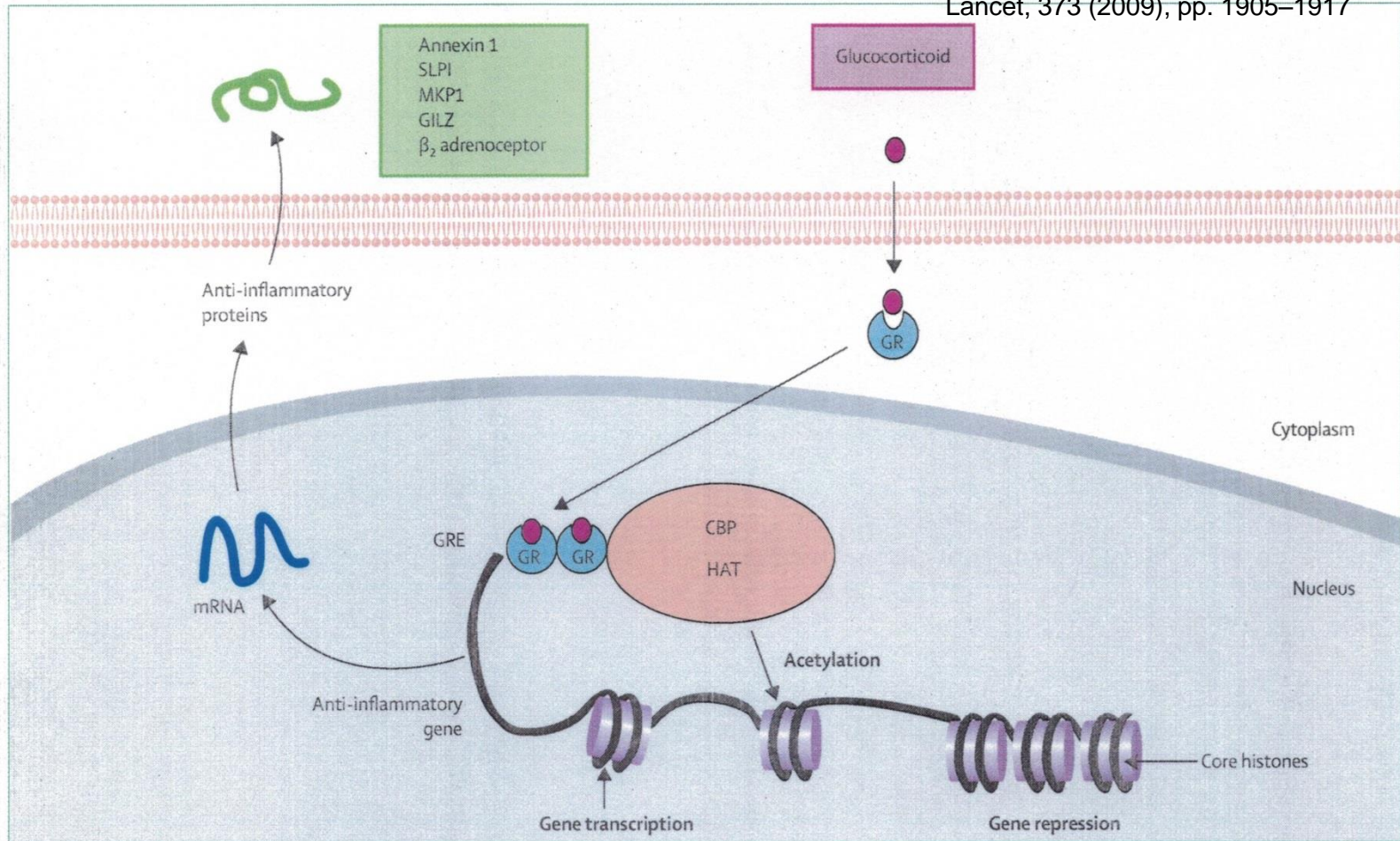


Figure 2: Glucocorticoid activation of anti-inflammatory gene expression

After ligand binding, activated glucocorticoid receptors (GRs) translocate to the nucleus where they bind to glucocorticoid response elements (GREs) in the promoter region of glucocorticoid-responsive genes and also directly or indirectly to transcriptional coactivator molecules such as cyclic AMP response element binding protein (CBP). Coactivator molecules have intrinsic histone acetyltransferase (HAT) activity and cause acetylation of core histones, resulting in the activation of anti-inflammatory genes. GILZ=glucocorticoid-induced leucine zipper protein. MKP1=mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. SLPI=secretory leucoprotease inhibitor.

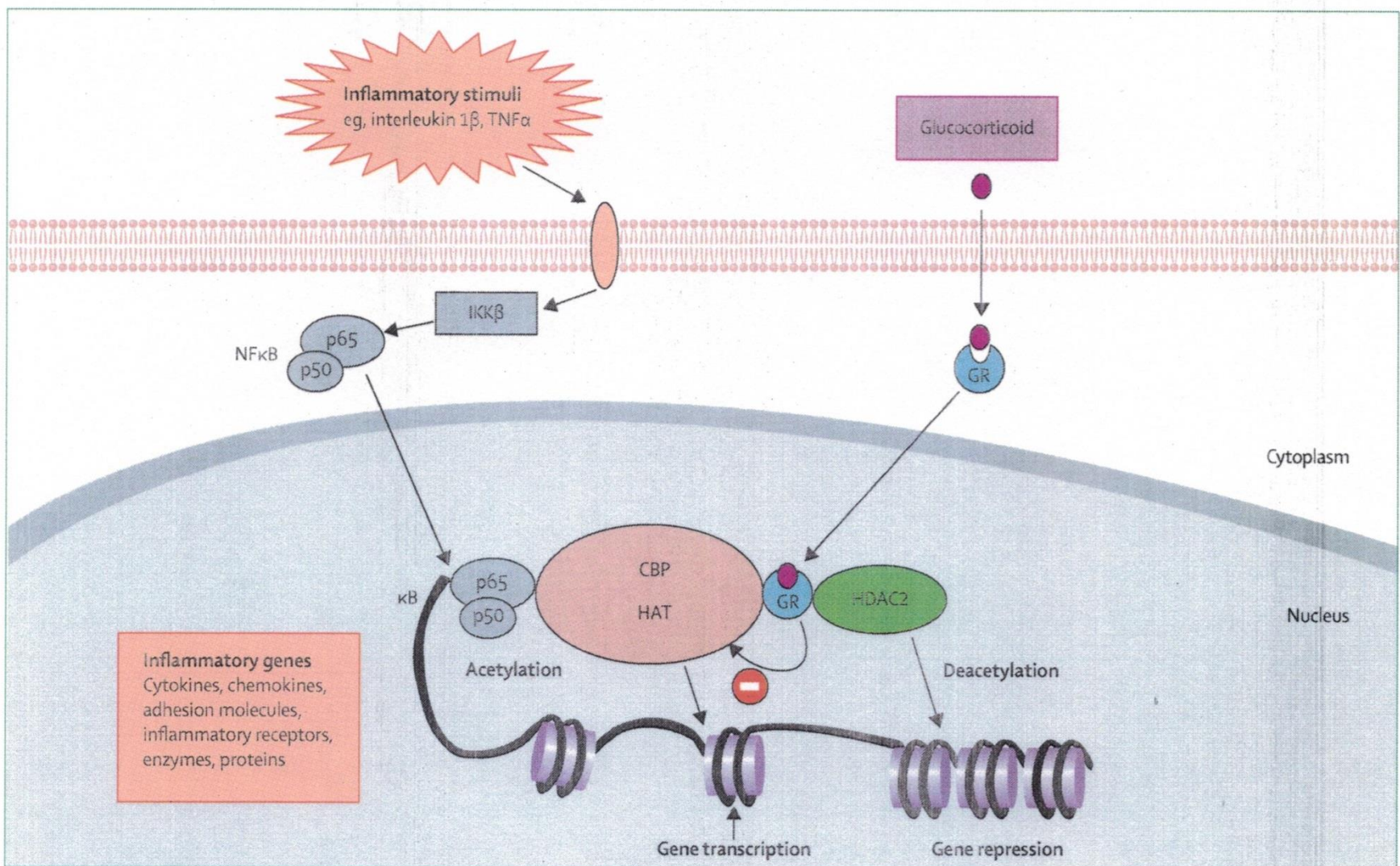


Figure 3: Glucocorticoid suppression of activated inflammatory genes

Inflammatory stimuli activate inhibitor of nuclear factor κ B (NF κ B) kinase (IKK β), which therefore activates NF κ B. A dimer of p50 and p65 NF κ B proteins translocates to the nucleus and binds to specific κ B recognition sites on the promoter regions of inflammatory genes and also to coactivators, such as cyclic AMP response element binding protein (CBP). The coactivators cause acetylation of core histones, activating gene expression of inflammatory proteins. Activated glucocorticoid receptors (GRs) bind to coactivators in the nucleus to inhibit histone acetyltransferase (HAT) activity directly. GRs also recruit histone deacetylase 2 (HDAC2), leading to suppression of the activated inflammatory genes. TNF α =tumour necrosis factor α .

Panel 1: Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance

- Familial glucocorticoid resistance
- Glucocorticoid receptor modification
 - Phosphorylation (see figure 4)
 - Nitrosylation
 - Ubiquitination
- Increased glucocorticoid receptor- β expression
- Increased proinflammatory transcription factors
 - AP1, JNK
 - STAT5, JAK3
- Defective histone acetylation
 - Reduced acetylation of lysine 5 on histone 4
 - Reduced histone deacetylase 2
 - Increased oxidative stress
 - Increased phosphoinositide-3-kinase- δ activation
- Increased P-glycoprotein
 - Increased efflux of steroids

AP1=activator protein 1. ERK=extracellular signal-regulated kinase.

JNK=c-Jun N-terminal kinase. MAP=mitogen-activated protein. MIF=macrophage migration inhibitory factor. STAT=signal transduction-activated transcription factor.

Barnes and Adcock, 2009

P.J. Barnes, I.M. Adcock

Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases

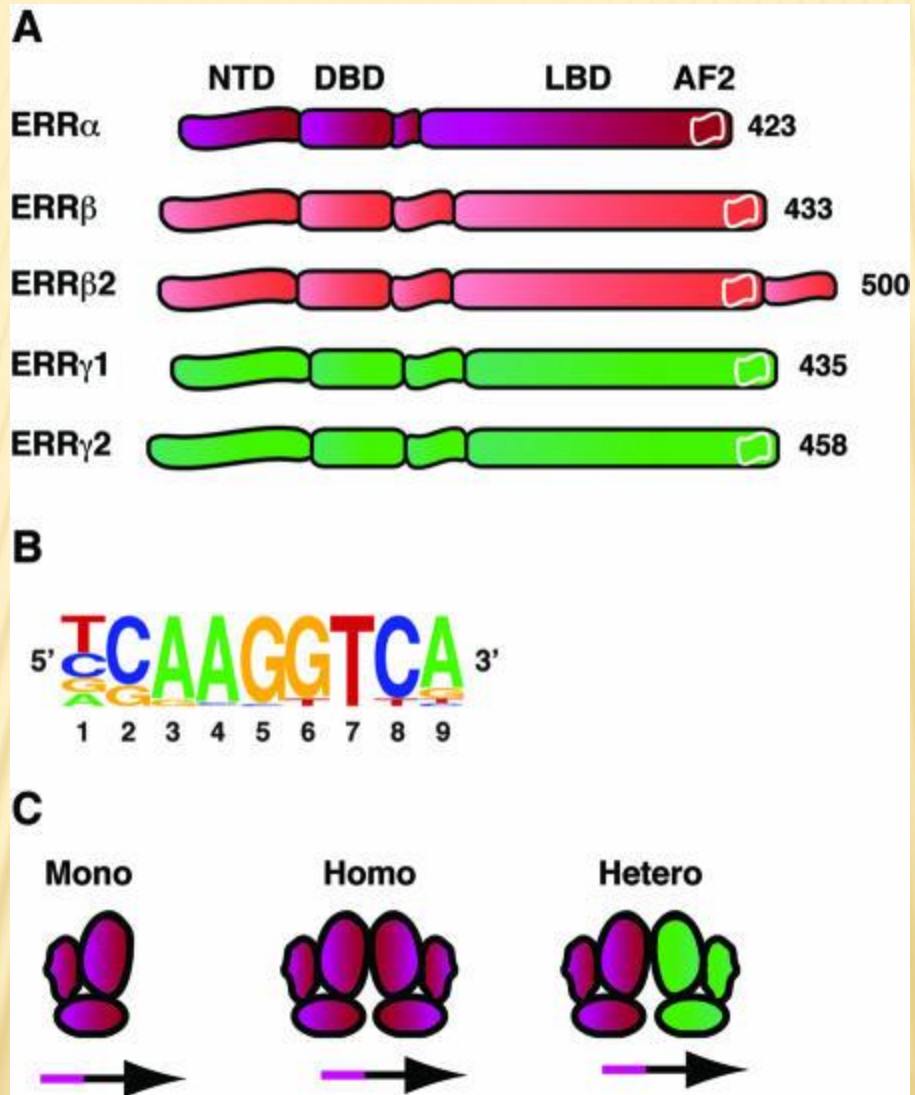
Lancet, 373 (2009), pp. 1905–1917

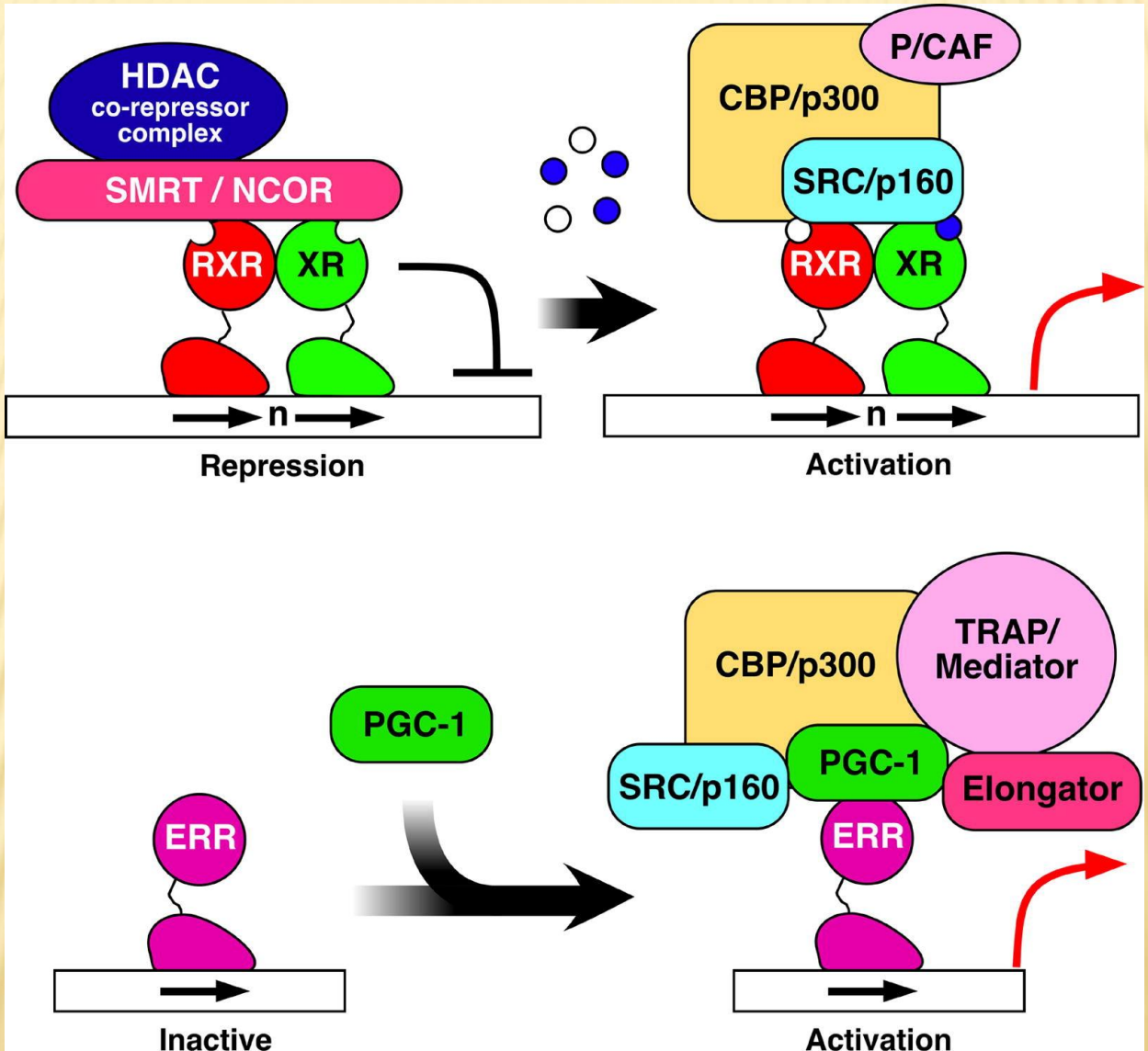
ESTROGENY

- ✘ Estrogens have physiological functions in almost all tissues in the body in both males and females.
- ✘ Estrogens, including the most abundant estrogen 17β -estradiol (E2), interact with estrogen receptors (ER) alpha and beta ($ER\alpha$ and $ER\beta$). $ER\beta$ is less well characterized.
- ✘ $ER\alpha$ and $ER\beta$ are highly conserved in the DNA binding domain (95%) and ligand binding domain (60%), but the NH₂-terminal domains, including the transcriptional activation domain AF-1, are only 20% conserved.

TYPICKÁ CESTA AKTIVACE NR

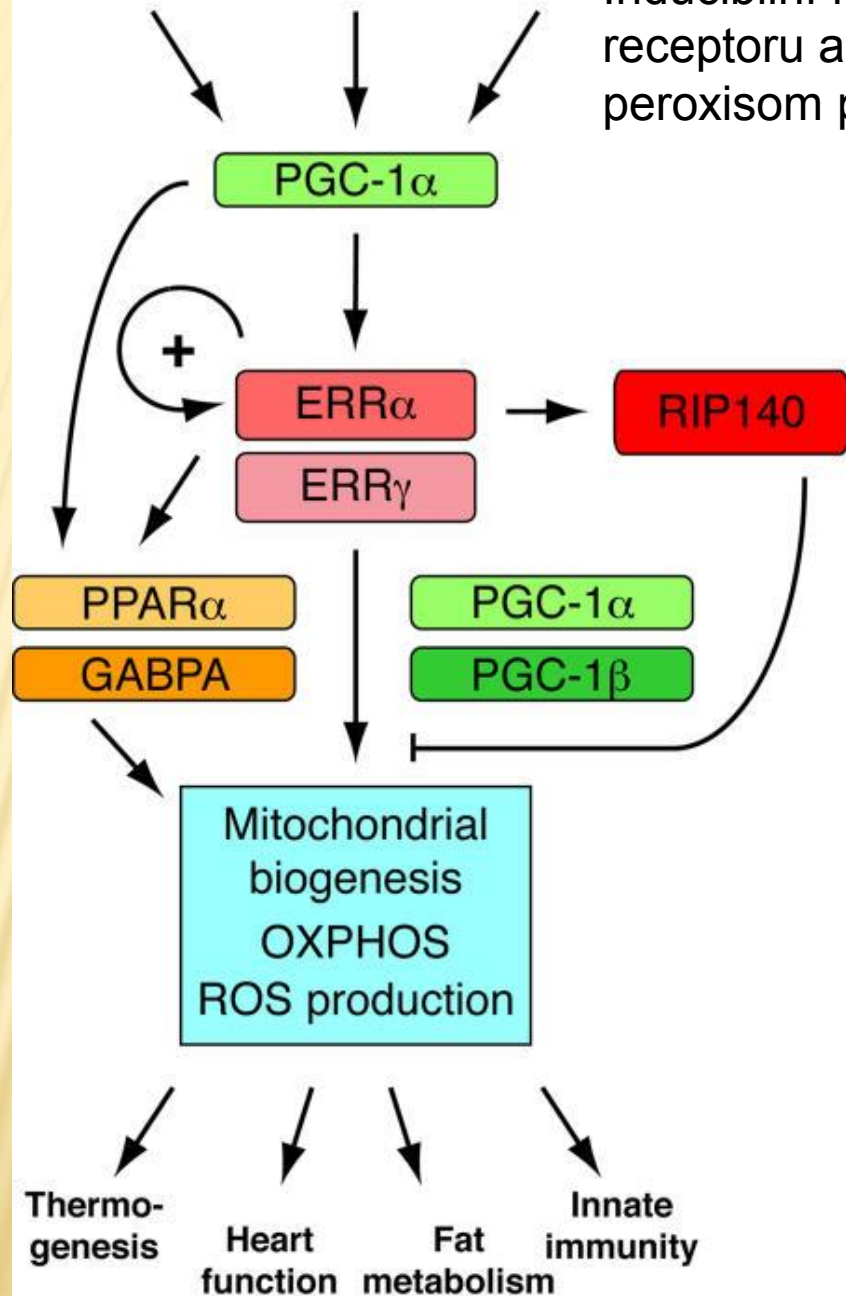
- ✘ v nepřítomnosti ligandu tvoří NR represivní komplex s HDAC (histon deacetylázy) přes korepresor SMRT nebo NCOR.
- ✘ Vazba ligandu indukuje disociaci korepresorů a povolání koaktivátorů včetně HAT (histon acetyltransferázy) a komplexů remodelujících chromatin.
- ✘ Některé NR jsou aktivovány na ligandu nezávislou vazbou koaktivátoru PGC-1 (= inducibilní koaktivátor 1 alfa receptoru aktivovaného peroxisom proliferátorem)
- ✘ a následným povoláváním dalších koaktivátorových komplexů





Physiological stimuli
(e.g. exercise, fasting, cold)

Inducibilní koaktivátor 1 alfa
receptoru aktivovaného
peroxisom proliferátorem



Thermo-
genesis

Heart
function

Fat
metabolism

Innate
immunity

ESTROGENY A KOST

- E2 je schopen nejenom
- **reprimovat proosteoklastické cytokiny**, ale indukuje také
- **apoptózu v kosti**, což vede k resorpci osteoklastů. Mechanisticky E2, *via* aktivace $E\alpha$ indukuje transkripci Fas ligandu (FasL) na osteoblastech. FasL je odštěpen z povrchu buňky pomocí MMP3 a solubilní FasL indukuje apoptózu osteoklastů.
- **reguluje poměr RANKL/(OPG)**. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) je podstatným cytokinem v diferenciaci osteoklastů. RANKL pathway je možno inhibovat pomocí OPG. Poměr RANKL:OPG ratio je kritický pro osteoklastogenezi. E2 zvyšuje transkripci OPG a ovlivňuje umístění RANKL na povrchu osteoblastů.
- E2 má **proosteoblastický efekt (antiapoptóza osteoblastů –BCL2)**.
- E2 také **indukuje transkripci alkalické fosfatázy, markeru osteoblastické diferenciaci**.

SEZNAM ZNÁMÝCH FUNKCÍ ERR A JEJICH ASOCIOVANÝCH GENŮ

Tissue	Isoform	Function	Prototype target genes
Bone	α	Formation, differentiation	OPN
Breast cancer	α, γ	Prognostic markers, interfere with E2 response	Aromatase; TFF1
Brown adipose	α	Adaptive thermogenesis, mitochondrial biogenesis	IDH3A, CPT-1b
Cartilage	α	Formation and maintenance	Sox9
Heart	α, γ	Bioenergetics, contraction	Atp5b, Ant1, Ckmt2 Casq2, Ldb3, Teap
Inner ear	β	Epithelial cell fate, inner ear fluid homeostasis	KCNQ1, Sc126a4
Intestine	α	Fat transport and absorption	ApoA4
Liver	α	Suppressing gluconeogenesis	PEPCK
Macrophages	α	ROS production, innate immunity	Aco2
Placenta	β	Trophoblast differentiation	?
Skeletal muscle	α	Mitochondria biogenesis, OXPHOS	Cycs, GABPA, ESRRB
White adipose	α	Lipid metabolism	Fasn, Acadm

ANDROGENY

- Testosteron může být konvertován do biologicky aktivnější formy dihydrotestosteron (DHT) 5α reductázou a na estradiol aromatázou. Testosteron a DHT realizují svůj účinek via AR.
- AR (androgenní receptory) se v různém rozsahu exprimuje ve tkáních, jako je kost, sval, prostata, tuková tkáň, kardiovaskulární, imunní, nervové a hematopoetické tkáni a samozřejmě ve tkáni reprodukční.

ANDROGENNÍ RECEPTOR

- ✘ Gen pro AR je lokalizován na chromosomu X q11–12. Celý receptor (full-length receptor (FL-AR)) se skládá z 8 exonů. Byly objeveny také konstitutivně aktivní AR varianty (AR-Vs), které obsahují domény NTD a DBD, ale nikoliv LBD. Protože konvenční androgen deprivace inhibuje androgen dependentní aktivaci AR (ovlivňované z LBD), přítomnost AR-Vs umožňuje buňkám rakoviny prostaty této léčbě odolávat. Zatím identifikováno cca 20 různých AR-Vs.

ANDROGENNÍ RECEPTOR

- ✘ Obsahuje konzervovanou DNA-binding doménu (DBD), Ligand-Binding doménu (LBD), a N'-terminální doménu (NTD) a hinge region, která obsahuje nukleární lokalizační sekvenci.
- ✘ Doména AR-LBD je cílem terapie cílící na AR, buď přímo (antiandrogeny vážící LBD) nebo nepřímo redukcí hladin cirkulujících a tkáňových androgenů (analogy LHRH/GnRH a inhibitory CYP17). AR-LBD je epicentrem několika mutací, které jsou zodpovědné za **rezistenci na endokrinní léčbu u rakoviny prostaty.**

POLYMORFISMY A VZÁCNÉ ALELY NR

- ✘ Mutace v zárodečných buňkách způsobují **dědičné syndromy rezistence na hormony**, často spojené s **kompensační zvýšenou sérovou hladinou příslušných hormonů** v případě mutací „**loss of function**“.
- ✘ Mutace byly u člověka popsány v **AR, ER, GR, MR, PPAR, TR a VDR**.
- ✘ Mnohé mutace se objevují v **LBD** a způsobují redukci vazby ligandu na receptor.
- ✘ Funkčně důležité mutace typu „**frameshift**“

POLYMORFISMY A VZÁCNÉ ALELY NR

- ✘ U pacientů s hereditární rezistencí na vitamin D (růstová retardace, křivice, alopecie) mohou mutace ve VDR způsobit defekty **ve vazbě na DNA, ve vazbě ligandu, v heterodimerizaci s RXR v interakci koaktivátorů.**
- ✘ Jsou **resistentní na 1, 25 vitamin D3** a reagují často až na extrémně vysoké dávky. Většinou autosomálně recesivní dědičnost.

NR-MECHANISMUS AKCE

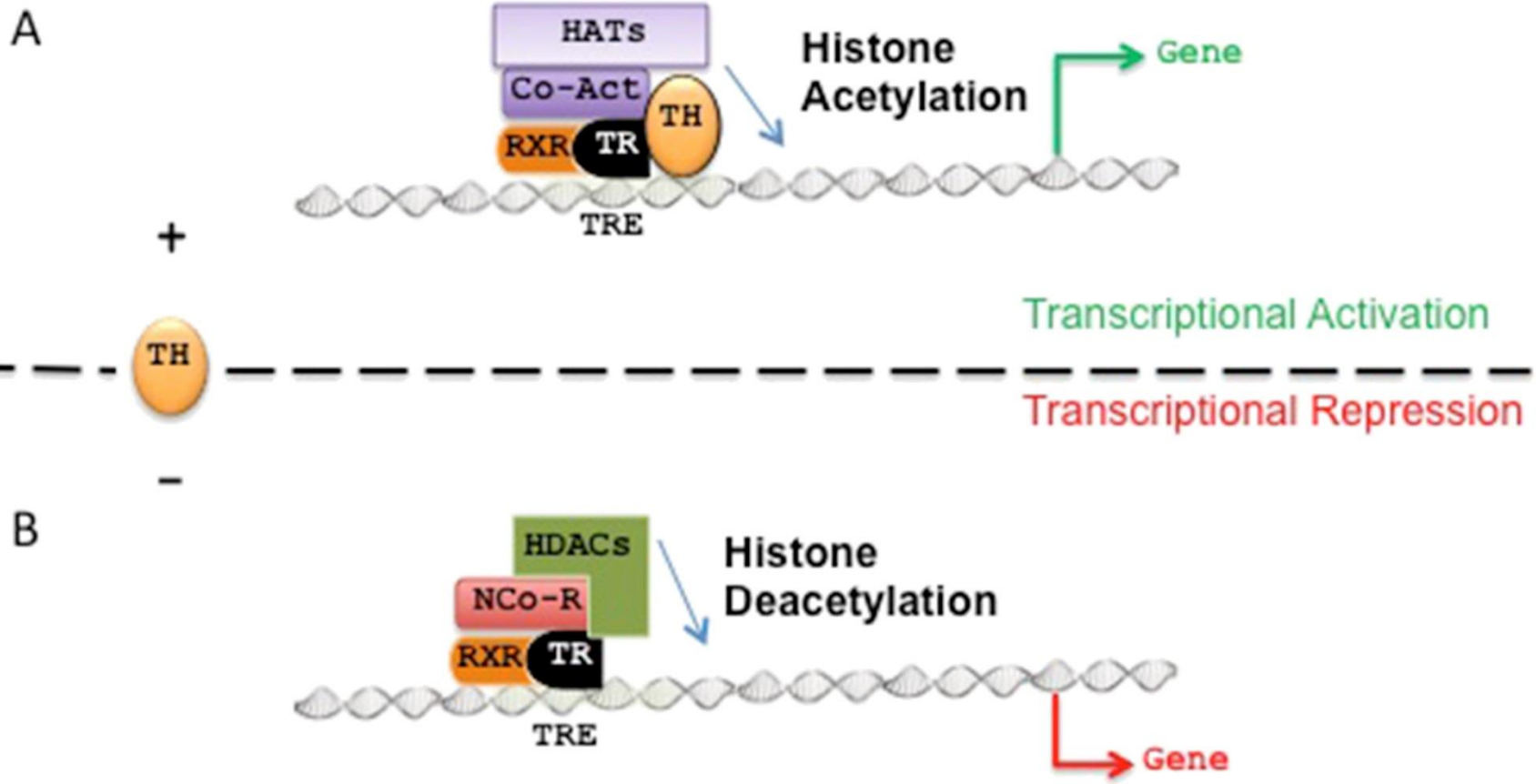
- ✘ Některé NR typu II nevážou hormony, ale intracelulární metabolity.
- ✘ **PPAR α** se váže na MK a stimuluje jejich β -oxidaci.
- ✘ Na **PPAR α** se vážou fibráty a snižují sérové triglyceridy.
- ✘ **PPAR γ** se váže na prostaglandin PGJ2 a zvyšuje citlivost tukové tkáně na inzulín.
- ✘ Thiazolidinediony jsou agonisty PPAR γ a jsou používány v léčbě DM typu II. PPAR γ agonisté mají také protizánětlivé a protinádorové účinky.

NR - MECHANISMUS AKCE

- ✘ **LXRs** („liver“) se vážou na cholesterol a metabolity podobné cholesterolu. Stimulují syntézu MK a podporují reverzní transport cholesterolu stimulací vstupu cholesterolu do makrofágů, syntézou žlučových kyselin a poklesem střevní absorpce cholesterolu. Specifičtí agonisté LXR mají potenciál **v antiaterosklerotické léčbě**.
- ✘ **FXRs** („farnesoid“) byly „de-orphaned“, když byly jako ligandy identifikovány žlučové kyseliny. FXR mohou snižovat syntézu MK aktivací SHP („short heterodimer partner“ pro LXR), který inhibuje transkripci navozenou LXR. To vede k down regulaci SREBP1c jako klíčového stimulanty syntézy MK. FXR také snižuje produkci žlučových kyselin down-regulací CYP7A (konvertuje cholesterol na žlučovou kyselinu). Agonisté FXR **k léčbě cholestatické žloutenky**.
- ✘ **ERR α** upreguluje PPAR α a gen pro „middle chain acyl coenzyme A dehydrogenase“, což vede ke stimulaci oxidace MK a synergii s PGC1 α pro zvýšení oxidativní fosforylace stimulací oxidázy MK a enzymů dýchacího řetězce. Podporuje také stimulaci nukleárního respiračního faktoru 1 (NRF1) prostřednictvím PGC1 α stimulací mitochondriální ATP syntetázy. PGC1 α je považována za proteinovou ligandu ERR α . Vyvíjejí se syntetické **ligandy slibné pro léčbu inzulínové rezistence**.

NR - MECHANISMUS AKCE

- ✘ **Tyroxin** hraje kritickou roli v produkci triglyceridů a cholesterolu, v celkové spotřebě kyslíku i v metabolismu cukrů a tuků.
- ✘ Nedostatek nebo nadbytek TH má hluboké metabolické efekty. Je možné, že tkáňově specifické rozdíly v koncentraci TH, dané různým membránovým vychytáváním TH pomocí TH transportérů nebo různou deiodinázovou aktivitou může vést k závažným metabolickým změnám na celulární i systémové úrovni.



Molecular mechanism of TR-mediated transcription on target gene promoters. In the absence of ligand, TR binds to the HRE and recruits co-repressors such as SMRT or NCoR as well as HDAC 3, resulting in histone deacetylation and transcriptional repression (B). In the presence of ligand, the co-repressor dissociates from ligand-bound TR and co-activator complexes are recruited. This leads to histone acetylation, chromatin opening near the HRE and proximal promoter region, and transcriptional activation (A). Many Type II NRs have similar mechanisms of action as TR. Type I NRs are bound to HSPs in the absence of ligand and do not exert transcriptional activation. Mediator complex, which directly links to the liganded TR on the HRE and the basal transcriptional machinery, then is recruited by TRs to the HRE after histone modifications by HATs. Abbreviations: TH: Thyroid hormone (T_3); TR: Thyroid hormone receptor; TRE: Thyroid hormone response element; RXR: Retinoid X Receptor; Co-Act: Co-activator; HATs: Histone acetyl transferase complex; NCoR: Nuclear Co-repressor; and HDAC: Histone deacetylase.

NR - MECHANISMUS AKCE

- ✘ **CAR** (androstane receptor) a **PXR** (nuclear receptors pregnane X receptor) fungují jako senzory xenobiotických látek a indukují expresi enzymů zodpovědných za metabolismus a exkreci těchto látek. Cílovými geny pro CAR jsou členové podrodin CYP2B, CYP2C a CYP3A, sulfotransferázy a glutathion-S-transferáza.
- ✘ Hlavními cíli pro PXR jsou CYP3A4, glutathione-S-transferáza a effluxní proteiny, jako je OATP2 a MDR1. CAR a PXR tak hrají podstatné role na úrovni detoxikace.

NR - MECHANISMUS AKCE

- ✘ V našem prostředí se vyskytují přirozené i umělé látky, které jsou schopny vstupovat do interakce s NR. **Fytohormony** jsou metabolity rostlin nebo vitaminy s obvykle agonistickými efekty na NR. **Flavonoidy** (sója, obilná zrna) mají slabý estrogení vliv, jiné látky jsou naopak antiestrogení. Tyto látky mohou mít efekt v době **těhotenství nebo kojení a mohou měnit riziko rozvoje karcinomu prsu.**
- ✘ Existují také umělé látky, které mohou působit jako **“endocrine simulators”** nebo **“endocrine disruptors”**. Často vznikají během průmyslové výroby. Např. některé organochloridové **pesticidy** mají antiandrogenní vlastnosti a mohou se vázat na AR (zvyšující se mužská infertility). **Polychlorované bifenyly (PCBs)** a **polybromované difenyl étery (PBDEs)** mohou blokovat aktivitu tyroxinu vazbou na TR deficitem v prenatálním a časně postnatálním období. Syntetický estrogen, **diethylstilbestrol (DES)** byl předepsán cca 5 miliónům těhotných žen jako prevence spontánních abortů v 70. letech 20. století. Ukázalo se, že dcery z těchto těhotenství měly abnormální vývoj reprodukčního systému během puberty a byla u nich zvýšena incidence vaginální rakoviny. DES vázaný na ER zřejmě indukoval aberantní dlouhodobou metylaci DNA, která se manifestovala o mnoho let později. **Endokrinní stimulatory a disruptory tak představují velký problém pro veřejné zdravotnictví, protože nemáme dostatečné informace o jejich kvantitě a mnohé zůstávají nerozpoznány.**

DĚKUJI VÁM ZA POZORNOST

