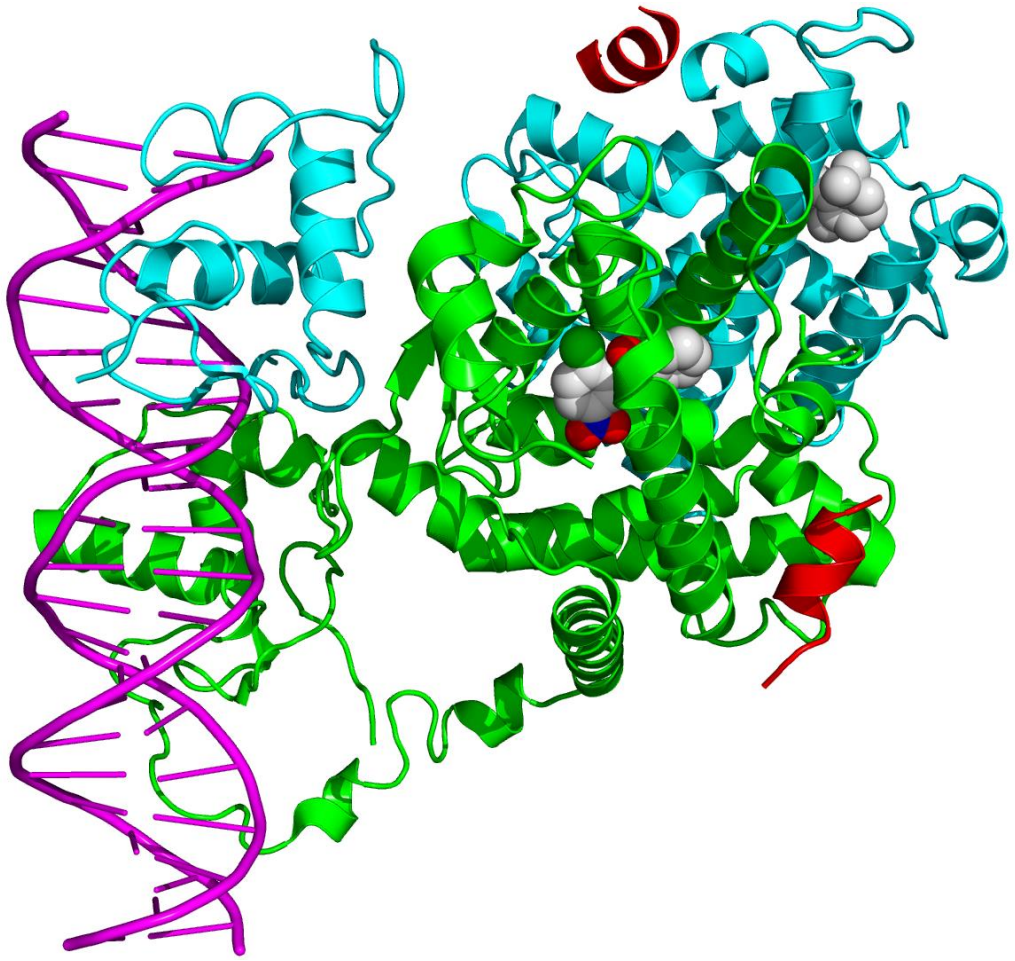
MUNI
SCI

Buněčná regulace intracelulárními receptory



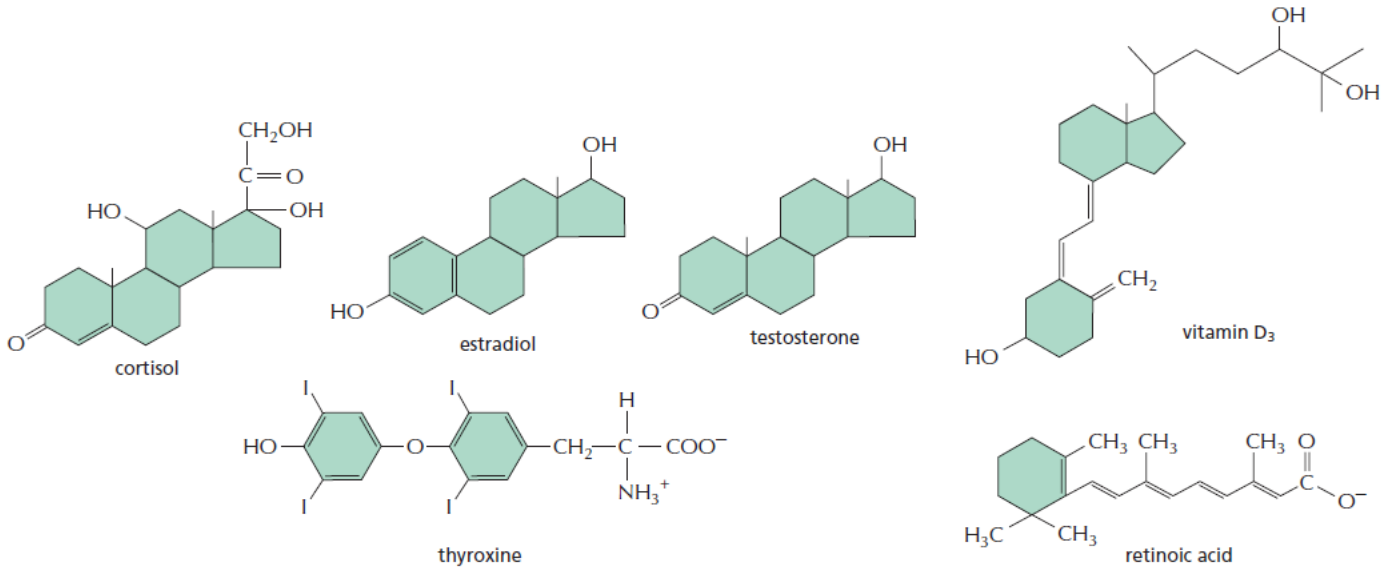
doc. RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.
Ústav experimentální biologie PřF MU

OSNOVA:

- Ligandy nukleárních receptorů
- Nukleární receptory
- Regulace buněčné odpovědi nukleárními receptory
- Signalizace oxidem dusnatým

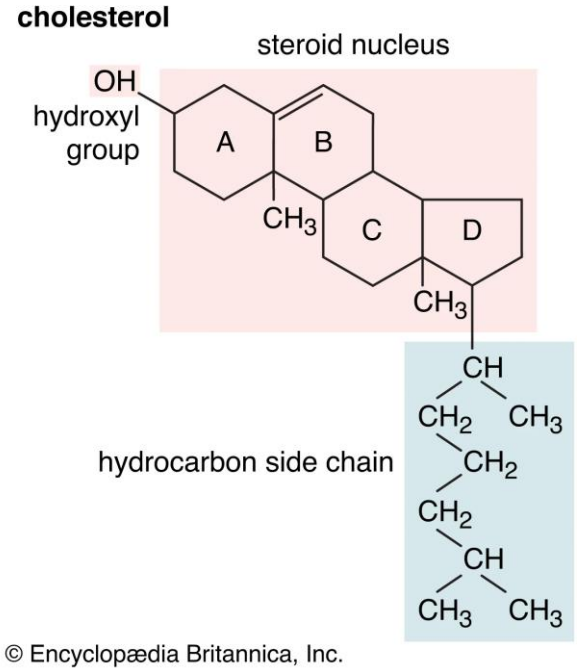
Ligandy nukleárních receptorů

- Malé hydrofobní/lipofilní molekuly – prochází přes plasmatickou membránu cílové buňky
- Vazba na intracytoplasmatické receptory - funkce transkripčních regulátorů
- Pomalá buněčná odpověď – na úrovni genové exprese
- Ligandy: steroidní hormony, tyroidní hormony, retinoidy, vitamín D – různá struktura a funkce
- Receptory: strukturálně příbuzné – superrodina nukleárních receptorů
- Poměrně velká část receptorů doposud nemá známé ligandy = „orphan“ receptory
- Ligandy nemusí být vždy extracelulární, ale i intracelulární
- Např. pro PPARs (peroxisome proliferation activated receptors) – ligandy jsou lipidové metabolity

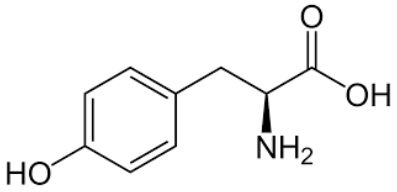


Steroidní hormony

- Původ z cholesterolu
- Kortizol – produkce kůrou nadledvin- fce při zátěži organismu - katabolismus
- Pohlavní steroidní hormony - testosteron, progesteron, estrogeny – testes/ovaria
- vitamín D – syntéza v kůži u obratlovců- konverze na aktivní formu v játrech/ledvinách - vstřebávání vápníku
- ekdyson - u hmyzu – aktivace epidermálních buněk -> svlékaní



© Encyclopædia Britannica, Inc.

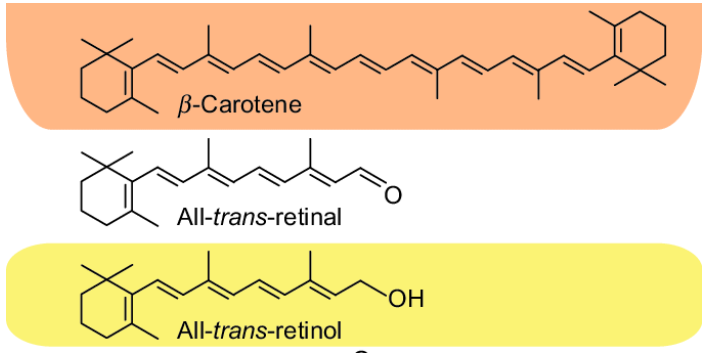


Tyroidní hormony

- Původ z tyrozinu: tyroxin (T4) a trijodthyronin (T3)
- Pro syntézu potřebují jód z krve
- Zvyšují intenzitu metabolismu

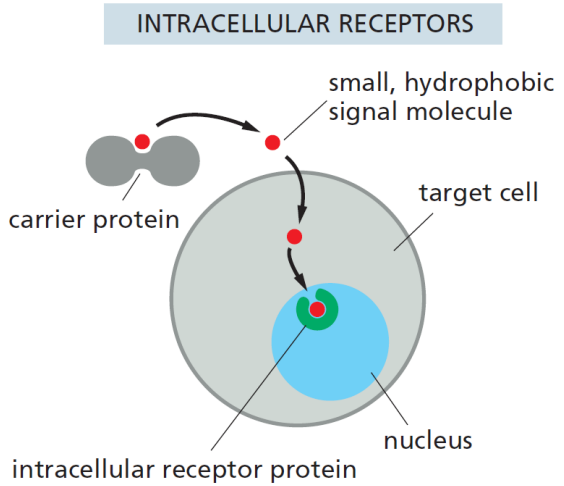
Retinoidy

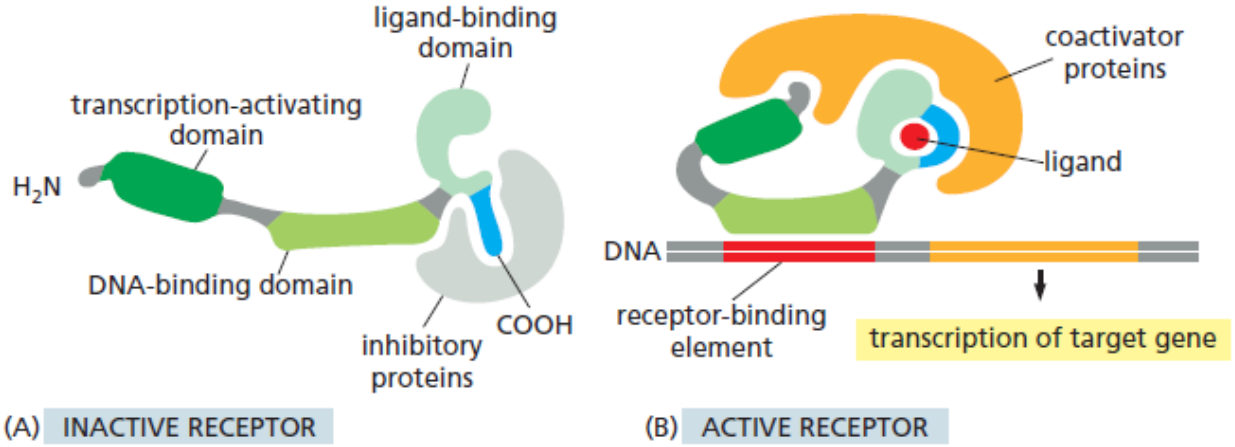
- Původ z vitaminu A (retinol)
- Morfogeny - vliv na vývoj obratlovců

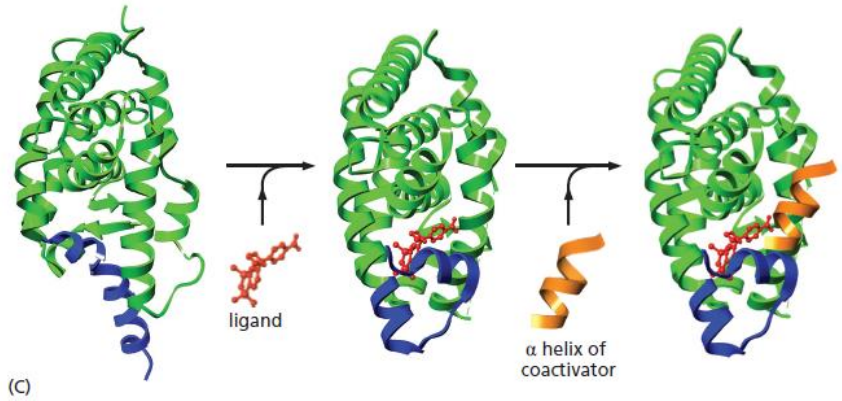


Nukleární receptory

- Ligandy samostatně špatně rozpustné – v krvi a extracelulárně vazba na přenašeče
- Nukleární receptory - po vazbě ligandu interagují s DNA
- Některé receptory „čekají“ na ligand v cytoplasmě jiné přímo na DNA
- Před vazbou ligandu v neaktivním stavu – vazba inhibičního komplexu
- Vazba ligandu změní konformaci receptoru – uvolnění inhibitorů- navázání koaktivátorů – aktivace transkripce
- Možná i inhibice transkripce nukleárním receptorem – po vazbě ligandu se z transkripčního aktivátoru stane transkripční represor

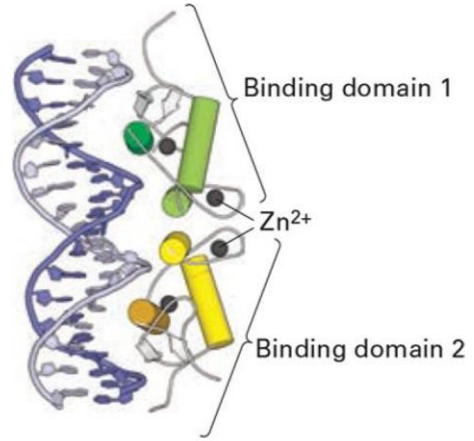






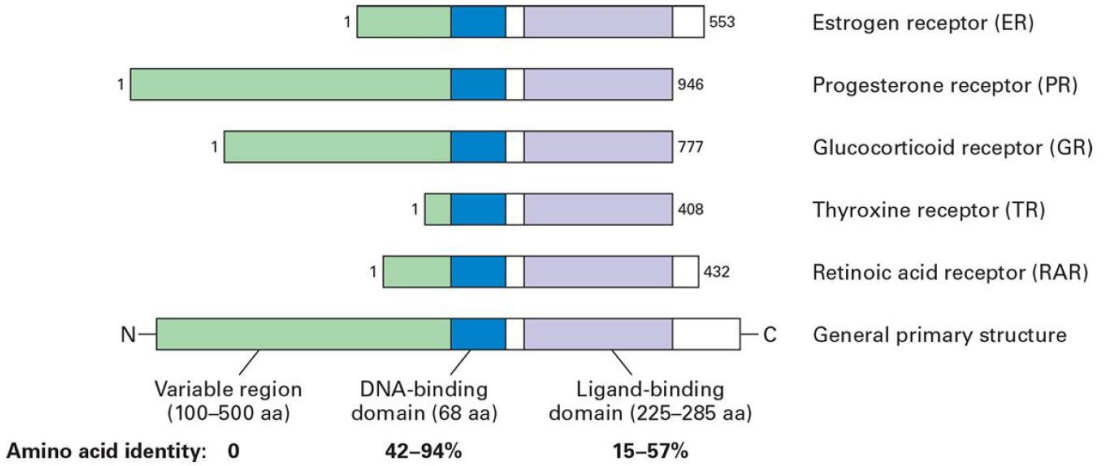
RAR - receptor pro kys. retinovou

NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

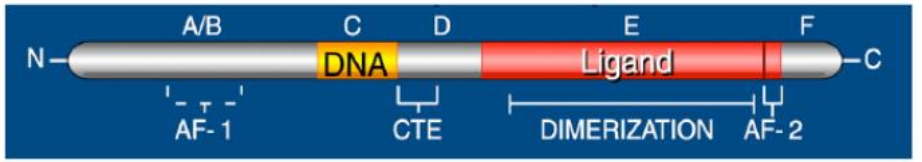


- Příbuznost na základě AMK sekvencí – 3 konzervované domény
- N-terminální region (100-500 AMK) – obvykle aktivační funkce
- DNA-vazebná doména – prostřední – opakování motivu zinkových prstů (obvykle 2x)
- Ligand-vazebná doména na C-konci – u některých receptorů funguje jako inhibiční doména (bez ligandu)

- Jaderné receptory nemají: rostliny, řasy, houby, prvoci
- *C. elegans* ≈ 270, u člověka > 50
- Bezobratlí: nemají receptory pro steroidní hormony (nadledvinkové ani pohlavní hormony)
- Vývoj receptorů pro steroidní hormony až od strunatců – regulace reprodukce, diferenciace, homeostáza, …



MODULÁRNÍ STRUKTURA NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ



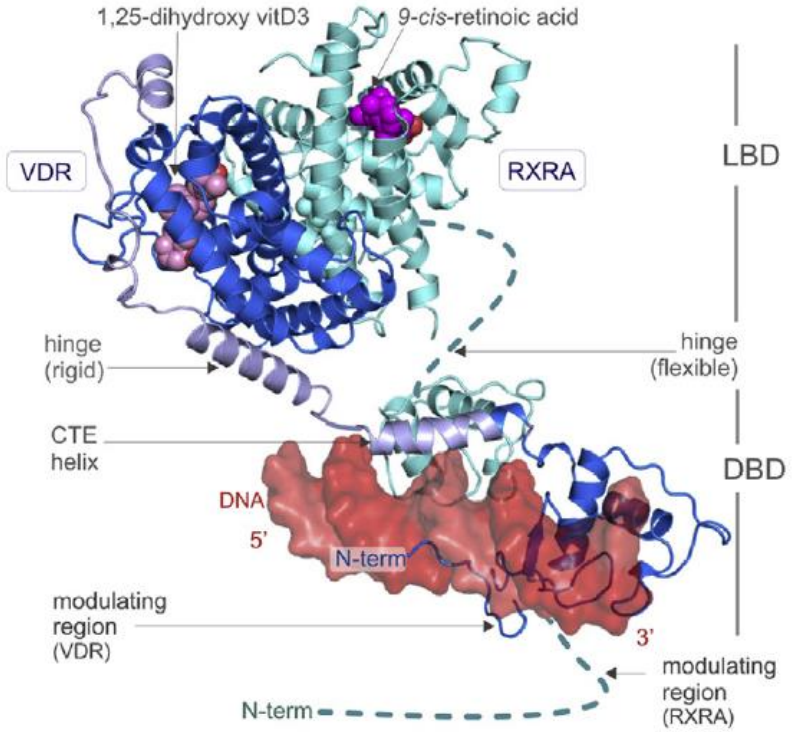
A/B region: - AF1 (activation function) doména - nezávislá na ligandu
- transkripčně aktivační funkce
- vysoká variabilita

C region: - DNA vazebná doména (DBD)
- motivy zinkových prstů (obvykle 2x)
- vysoce konzervovaná

D region: - pantová doména

E region: - ligand vazebná doména (LBD)
- dimerizační doména
- AF2 doména – závislá na ligandu
- transkripčně aktivační funkce

F region: - variabilní sekvence - funkce neznámá



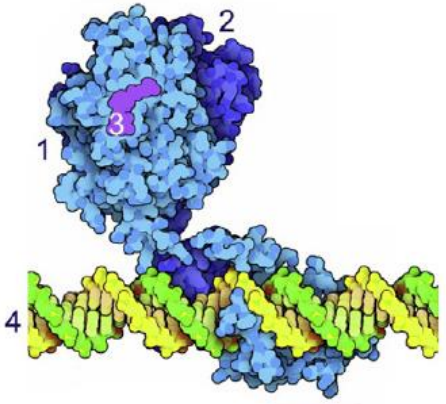
VDR-RXR heterodimer s ligandy

HETERODIMERICKÉ NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

- Pouze v jádře, bez ligandu potlačují transkripci vazbou na DNA
- Asociace s histon deacetylázovými komplexy –> deacetylace histonů
- Po vazbě ligandu – konformační změny –> navázání histon acetylačních komplexů –> acetylace histonů –> vazba dalších iniciačních komplexů + RNA polymerázy II

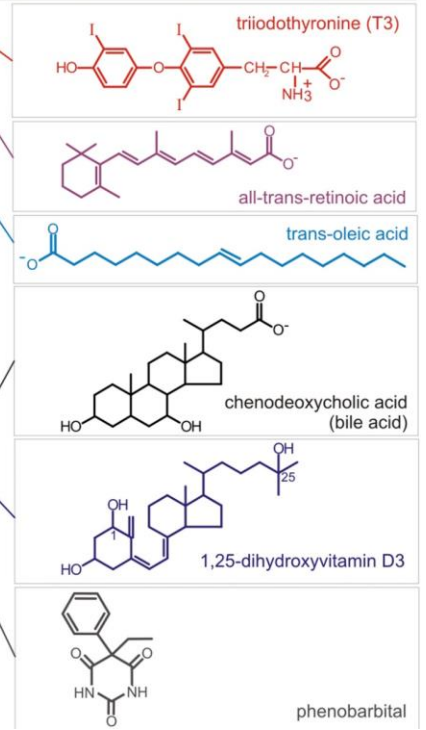
molecular structure of the vitamin D receptor complexed with the RXR

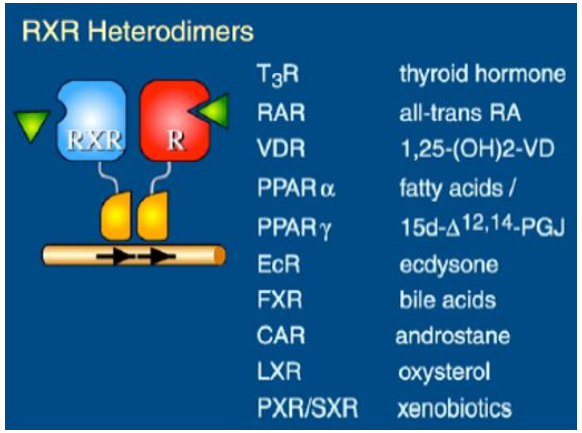
1 VDR
2 RXR
3 1,25-hydroxyvitamin D
4 DNA



type 1

nuclear receptor (dimer)	nomenclature	ligand (+ chemical structure)
thyroid hormone receptor (THR/THR or THR/RXRA)	THRA (NR1A1), α THRB (NR1A2), β	thyroid hormone thyroid hormone
retinoic acid receptor (RAR/RXR)	RARA (NR1B1), α RARB (NR1B2), β RARG (NR1B3), γ	retinoic acid retinoic acid retinoic acid
peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR/RXR)	PPARA (NR1C1), α PPARD (NR1C2), δ PPARG (NR1C3), γ	fatty acids, leukotriene B4 fatty acids, prostaglandin I_2 fatty acids, prostaglandin D_2
reverse-ErbA	NR1D1 NR1D2	orphan orphan
RAR-related orphan receptor	RORA (NR1F1), α RORB (NR1F2), β RORC (NR1F3), γ	cholesterol *all-trans*-retinoic acid *all-trans*-retinoic acid
liver X receptor (LXR/RXR)	NR1H2 (LXR-β) NR1H3 (LXR-α)	oxysterols oxysterols
farnesoid receptor (NR1H/RXR)	NR1H4 (FXRα) NR1H5 (FXRβ)	bile acids, fexaramine pseudogene
vitamin D receptor (VDR/RXR)	VDR (NR1I1)	1,25-dihydroxy vitamine D_3
pregnane receptor (NR1I2/RXR)	NR1I2 (PXR)	xenobiotics, pregnenolone
constitutive androstane receptor (NR1I3/RXR)	NR1I3 (CAR)	xenobiotics, phenobarbital

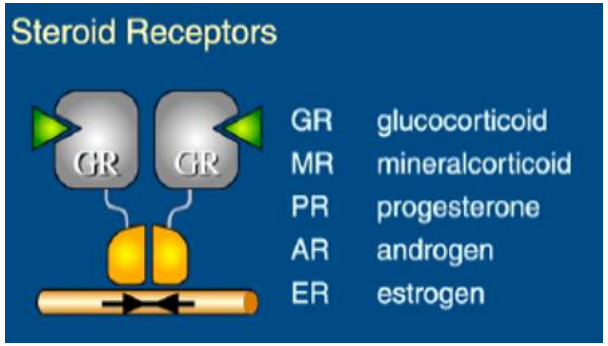


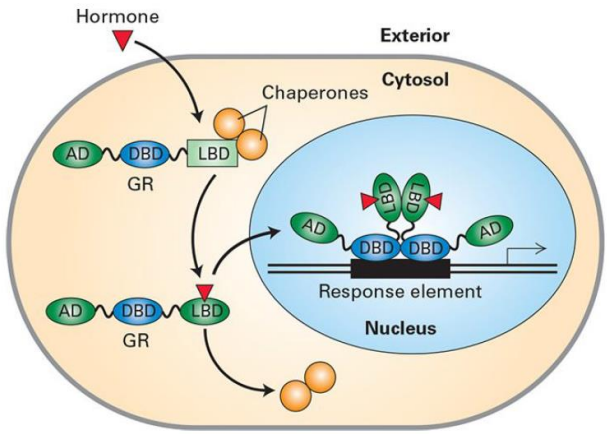


HOMODIMERICKÉ NUKLEÁRNÍ RECEPTORY

- Bez ligandu = lokalizace v cytoplasmě vs. vazba ligandu = translokace do jádra

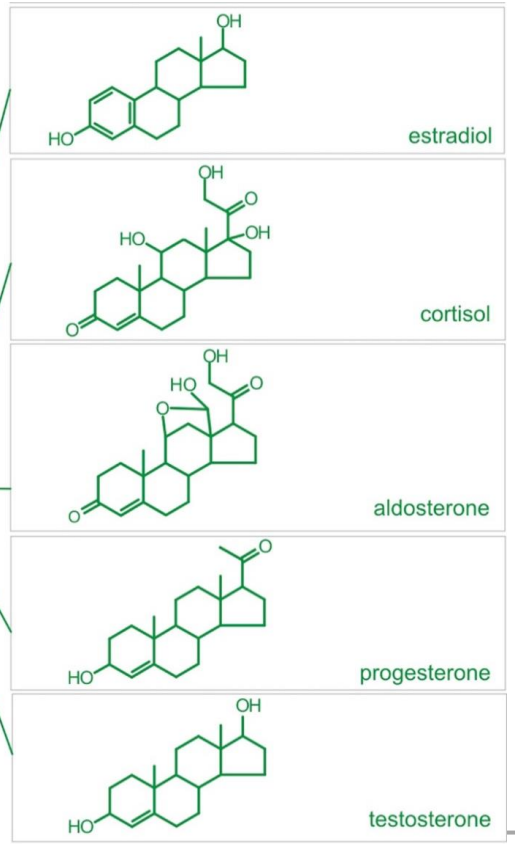
- Např. glukokortikoidový receptor (GR)
- Bez ligandu je LBD rozvolněná pomocí chaperonu Hsp70 = nelze translokovat
- Ligand uvolní Hsp70 naváže se Hsp90 –> správné sbalení = transport do jádra
- Lokalizace na responzivní element –> navázání histon acetylačních komplexů –> acetylace histonů –> vazba dalších iniciačních komplexů + RNA polymerázy II





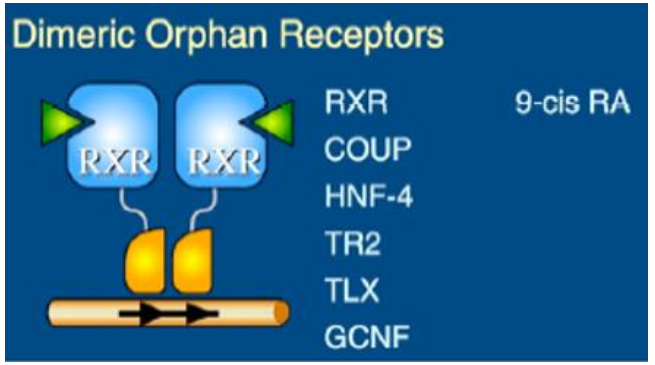
type 3

oestrogen receptor (ESR/ESR)	ESR1 (NR3A1) ESR2 (NR3A2)	oestradiol-17β, tamoxifen oestradiol-17β
oestrogen receptor-related receptor	ESRRA (NR3B1), α ESRRB (NR3B2), β ESRRG (NR3B3), γ	orphan diethylstilbestrol, 4-OH tamoxifen diethylstilbestrol, 4-OH tamoxifen
glucocortiocoid receptor (NR3C1/NR3C1 or /NR3C2)	NR3C1 (GR)	cortisol, dexamethasone aldosterone
mineral corticoid receptor (NR3C2/NR3C2 or /NR3C1)	NR3C2 (MR)	aldosterone, spirolactone, cortisol
progesterone receptor (PGR/PGR)	PGR (NR3C3)	progesterone, medroxyprogesterone
androgen receptor (AR/AR)	AR (NR3C4)	testosterone, flutamide



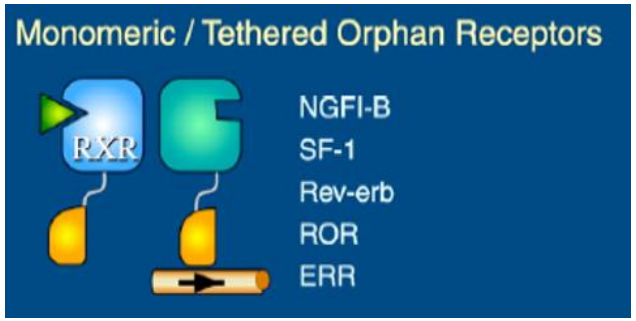
type 2

hepatocyte nuclear factor	HNF4A (NR2A1) HNG4G (NR2A2)	fatty acyl-CoA (linked with diabetes) orphan
retinoid X receptor (RXR/RXR and heterodimer with numerous partners)	RXRA (NR2B1), α RXRB (NR2B2), β RXRG (NR2B3), γ	*9-cis*-retinoic acid *9-cis*-retinoic acid all-trans-retinoic acid
testis receptor	NR2C1 (Tr1) NR2C2 (Tr2)	orphan orphan
tailless	NR2E1 (TLL)	orphan
photoreceptor-specific NR	NR2E2 (PNR)	orphan
chicken ovalbumin upstream promotor	NR2F1 (COUP-TF1) NR2F2 (COUP-TF2)	orphan orphan
ErbA2-related	NR2F6 (EAR2)	orphan



type 0, 4, 5 ,6

NGF-induced factor B	NR4A1 (NGFIB)	orphan
Nur-related factor	NR4A2 (NURR1)	orphan (linked withParkinsonism)
neuron-derived orphan	NR4A3 (NOR1)	orpha
steroidogenic factor-1 (monomer)	NR5A1 (SF1)	orphan
liver receptor homologous	NR5A2 (LRH1)	phospholipid, dilauroyl-PC
germ cell nuclear factor	NR6A1 (GCNF)	orphan
DSS-AHC chromosome X	NR0B1 (DAX1)	orphan
short heterodimeric partner	NR0B2 (SHP)	orphan



RESPONZIVNÍ ELEMENTY

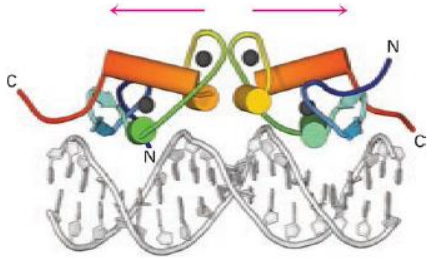
- Místa na DNA se specifickou sekvencí – vazba nukleárních receptorů
- Často dva repeaty – 6bp

Homodimerní receptory – vazba na invertované repeaty, předpoklad vazby symetrického dimeru

- GRE - glucocorticoid receptor response element
- ERE - estrogen receptor response element

Heterodimerické nukleární receptory - obsahují RXR podjednotku + další, vazba na přímý repeat

- RXR-VDR – odpověď na vitamín D_3 – vazba na přímý repeat s mezerou 3 bp = VDRE (vitamin D response element)
- RXR-TR – odpověď na tyroidní hormony - vazba na stejný repeat s mezerou 4 bp = TRE (thyroid hormone response element)
- RXR-RAR – odpověď na kyselinu retinovou - vazba na stejný repeat s mezerou 5 bp = RARE (retinoic acid response element)



(a)

GRE 5′ AGAACA(N)$_3$TGTTCT 3′
3′ TCTTGT(N)$_3$ACAAGA 5′

(b)

ERE 5′ AGGTCA(N)$_3$TGACCT 3′
3′ TCCAGT(N)$_3$ACTGGA 5′

(c)

VDRE 5′ AGGTCA(N)$_3$AGGTCA 3′
3′ TCCAGT(N)$_3$TCCAGT 5′

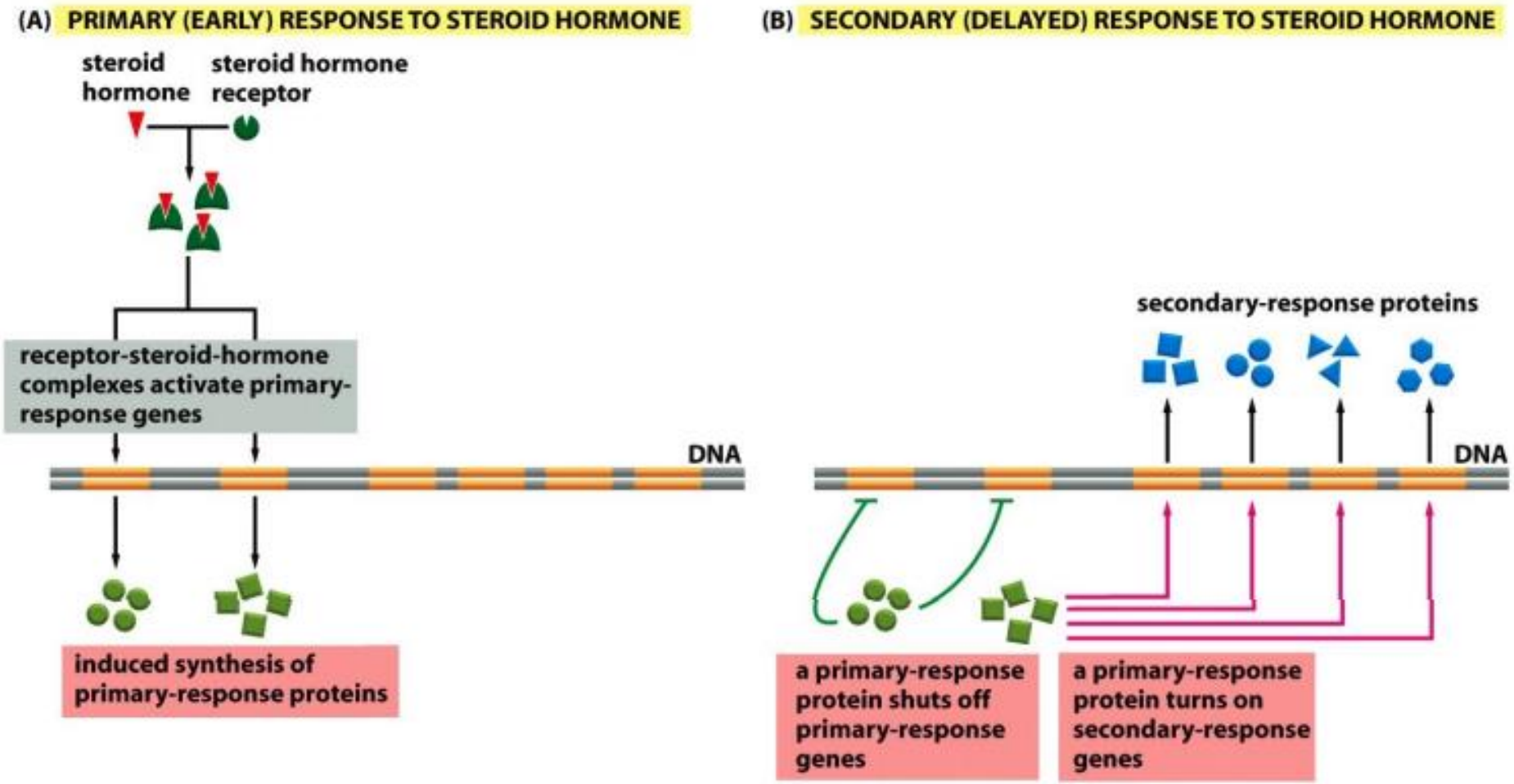
(d)

TRE 5′ AGGTCA(N)$_4$AGGTCA 3′
3′ TCCAGT(N)$_4$TCCAGT 5′

(e)

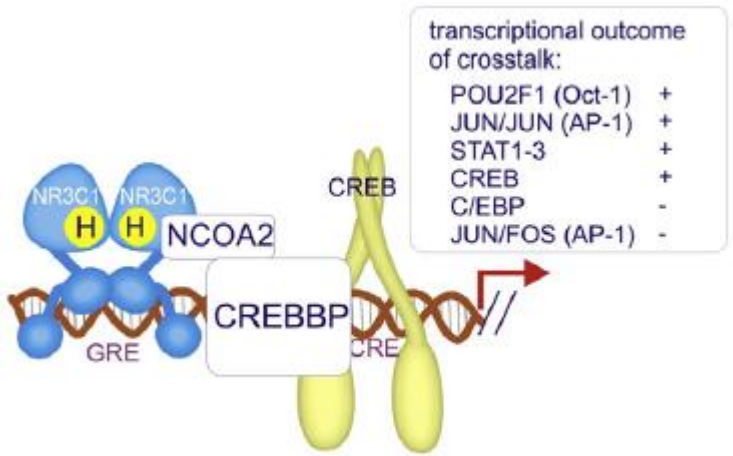
RARE 5′ AGGTCA(N)$_5$AGGTCA 3′
3′ TCCAGT(N)$_5$TCCAGT 5′

DLOUHODOBÁ BUNĚČNÁ ODPOVĚĎ PO AKTIVACI NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ

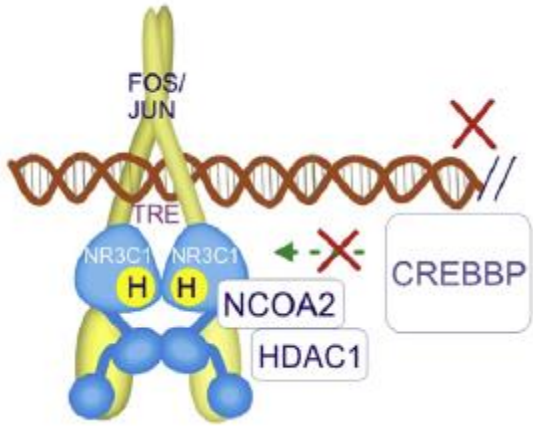


NUKLEÁRNÍ RECEPTORY INTERAGUJÍ S DALŠÍMI TRANSKRIPČNÍMI FAKTORY

- Nukleární receptory neovlivňují transkripci samostatně – vždy v komplexu
- Tkáňová specifita - nasednutí na DNA závisí na typu buněk – specifická přístupnost jednotlivých úseků DNA
- V jednom promotoru – více responzivních elementů současně
- Výsledek transkripce závisí na kooperaci – pozitivní vs. negativní
- Transaktivace – vazba jednoho transkripčního regulátoru usnadní vazbu dalšího
- Transreprese – některé nukleární receptory nemusí mít responsivní element v promotoru – i tak ovlivňují transkripci – vazba na jiné TFs- inhibují jejich funkci



Transaktivace CREB glukokortikoidovým receptorem

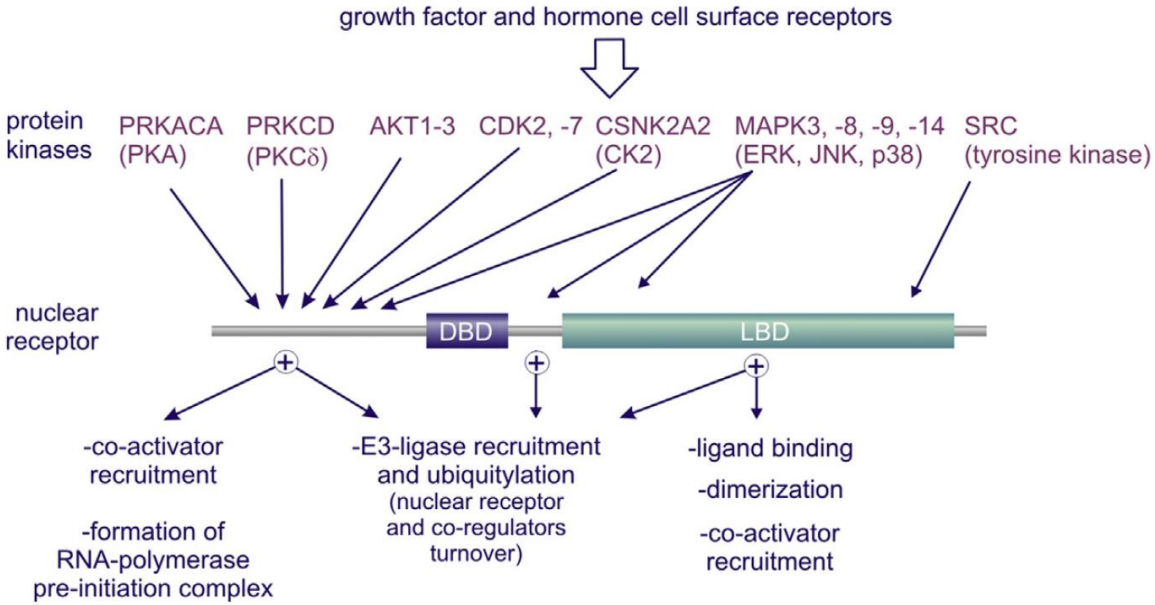


Transreprese JUN/FOS glukokortikoidovým receptorem

FOSFORYLACE NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ

- Nukleární receptory obsahují potenciální místa fosforylace = cíle kináz

- Následky fosforylací:
  - ✓ Umožnění dimerizace a vazbu ligandu
  - ✓ Umožnění interakce s RNA polymerázou II a s proteiny koaktivačního komplexu
  - ✓ Navázání ubiquitinligázy = destrukce receptoru v proteazomu

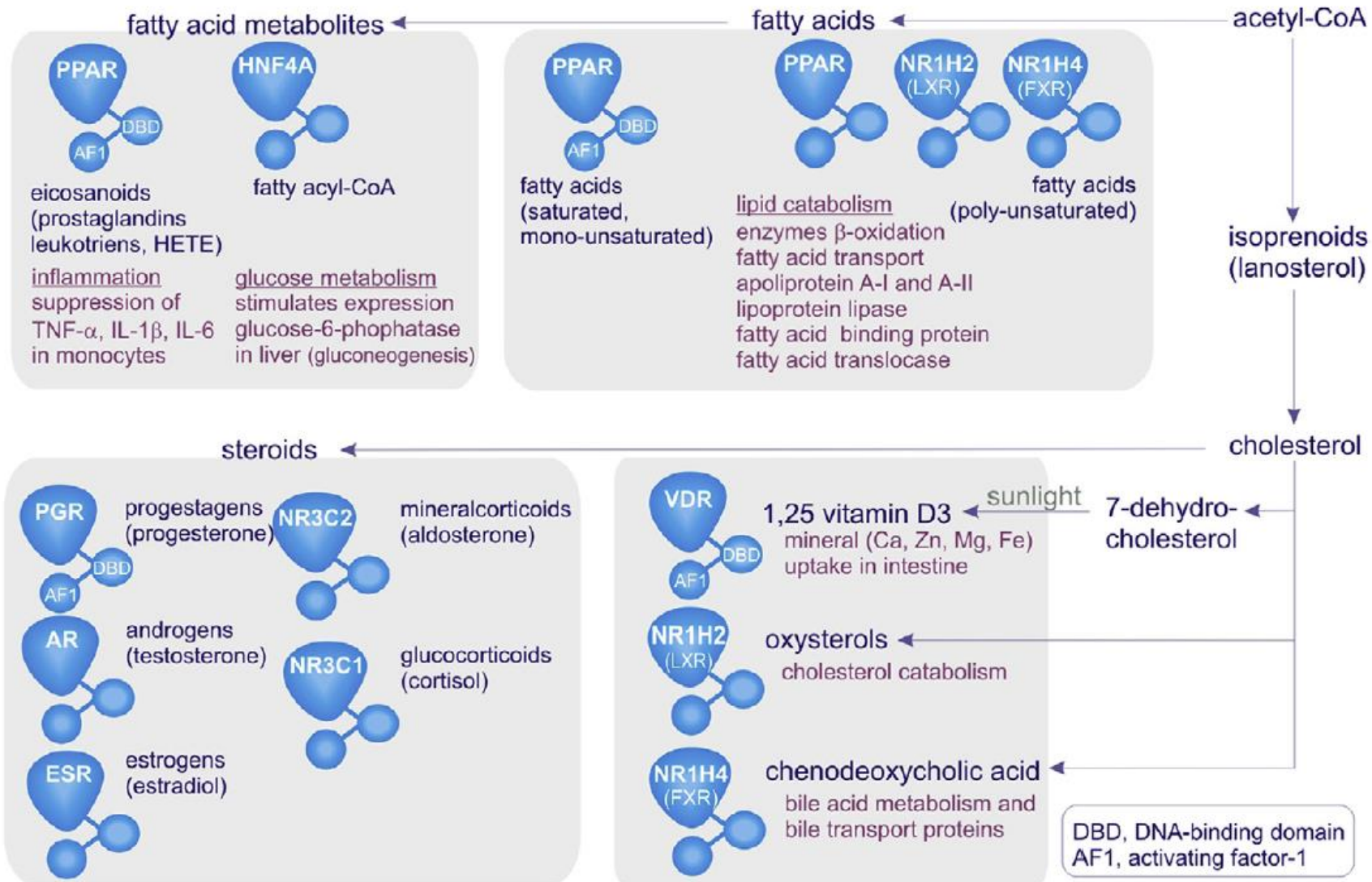


- Často vazba na AF1 doménu tj. aktivační doména nezávislá na ligandu

  např. u myši bez ovarií (estrogenu) popsáno, že EGFR aktivuje MAPK dráhu –> nukleární estrogenový receptor je aktivován i bez ligandu, exprese cílových proteinů estrogenového receptoru

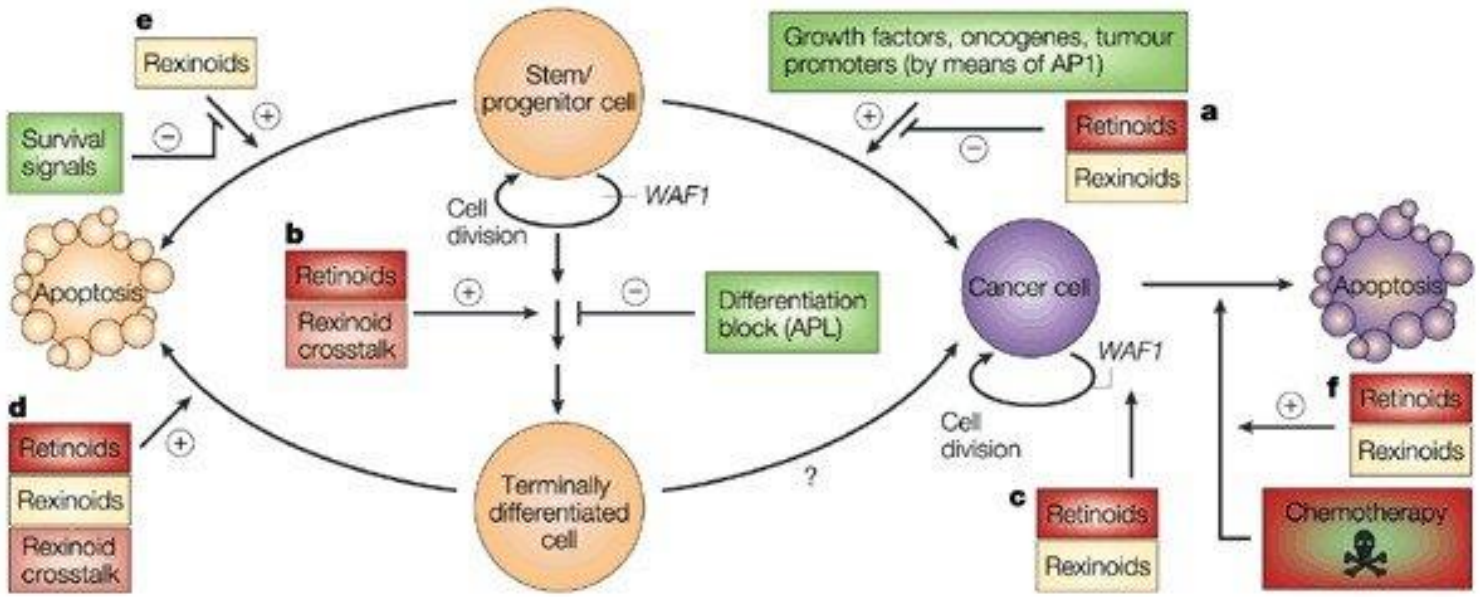
Regulace buněčné odpovědi nukleárními receptory

ROLE NUKLEÁRNÍCH RECEPTORŮ V LIPIDOVÉM METABOLISMU



ROLE RETINOIDŮ A REXINOIDŮ VE VZTAHU K TUMORIGENEZI

a) Blok mitogenní signalizace na úrovni TF
b) Indukce diferenciace
c) Blok buněčného cyklu v G1
d) Indukce postmaturační apoptózy
e) Indukce apoptózy nediferencovaných buněk
f) Indukce apoptózy v kooperaci s chemoterapií



Nature Reviews | Cancer

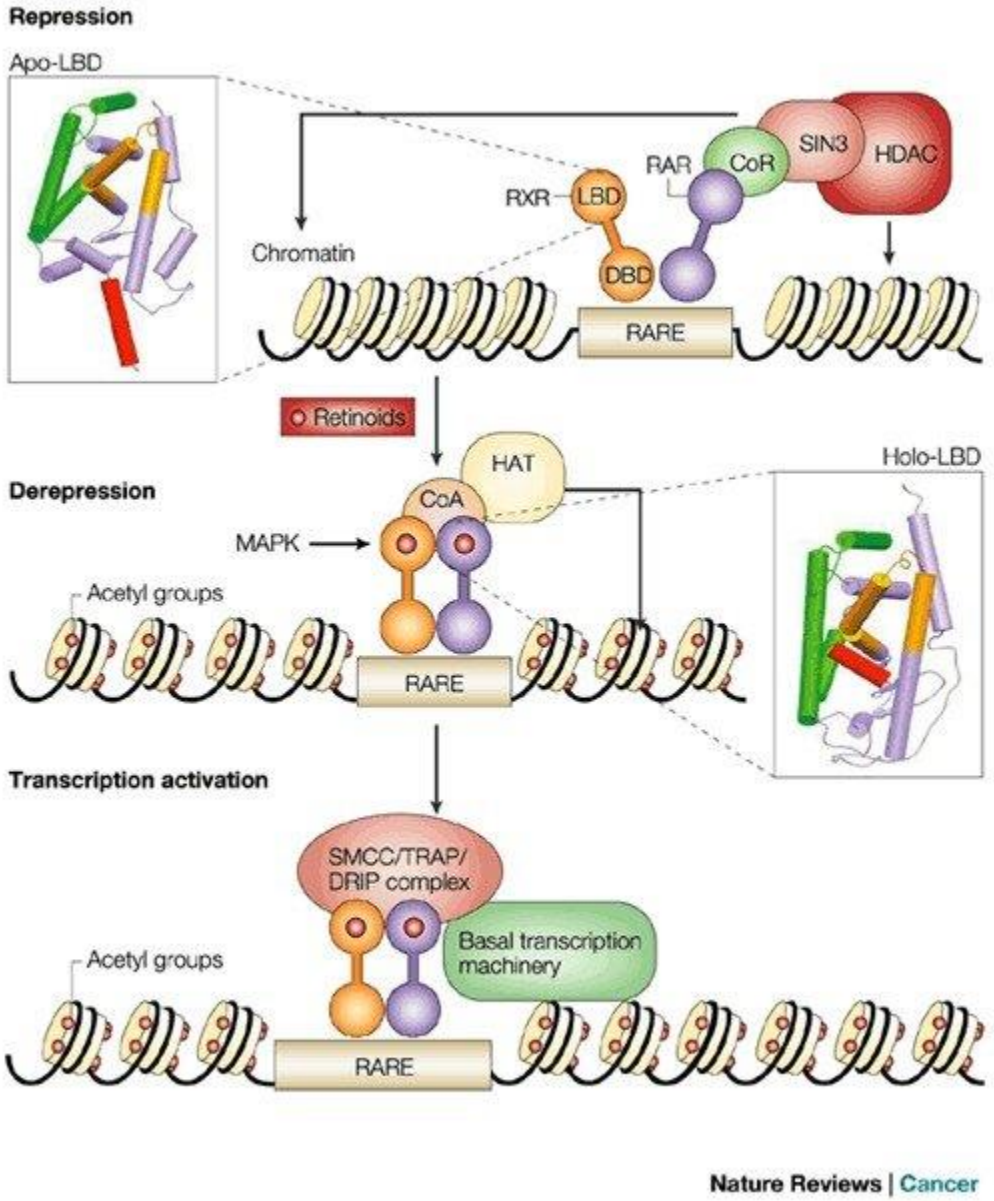
MECHANISMUS TRANSKRIPČNÍ REPRESE A AKTIVACE RAR-RXR HETERODIMERŮ

Bez ligandu

- na RAR-RXR navázaný korepresorový komplex (CoR)
- + histondeacetyláza (HDAC)
- HDAC – odstraňuje acetyly z histonů –> kondenzace chromatinu –> silencing

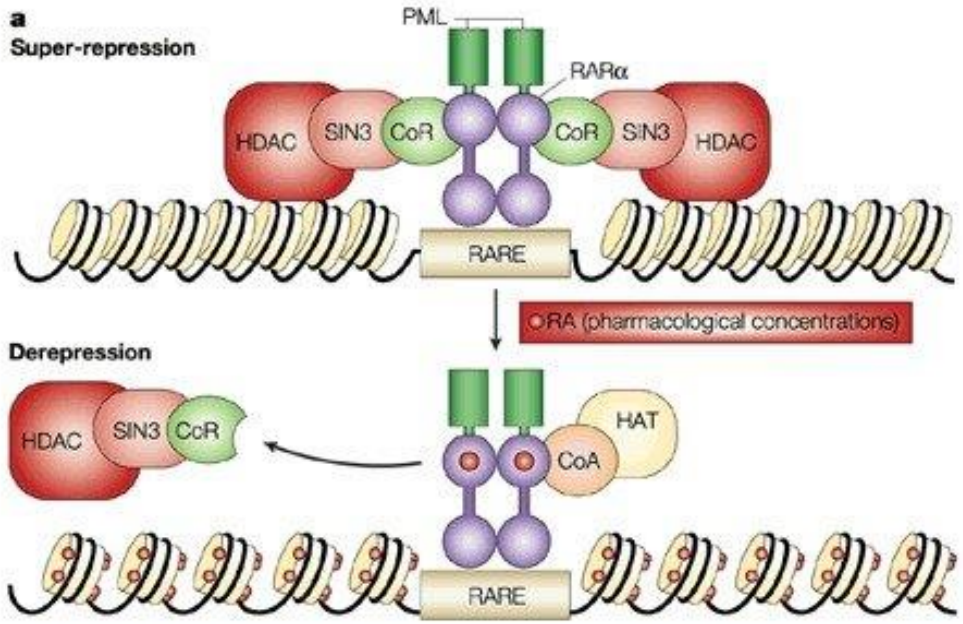
S ligandem

- Konformační změna v LBD
- Uvolnění korepresoru –> navázání koaktivátoru (CoA)
- Možná fosforylace receptorů MAPK dráhou
- Navázání histon acetyltransferáz (HATs) – acetylace histonů- dekondenzace chromatinu
- Navázání dalších stabilizačních komplexů a polymerázy II



FUNKCE RETINOIDŮ U AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKEMIE

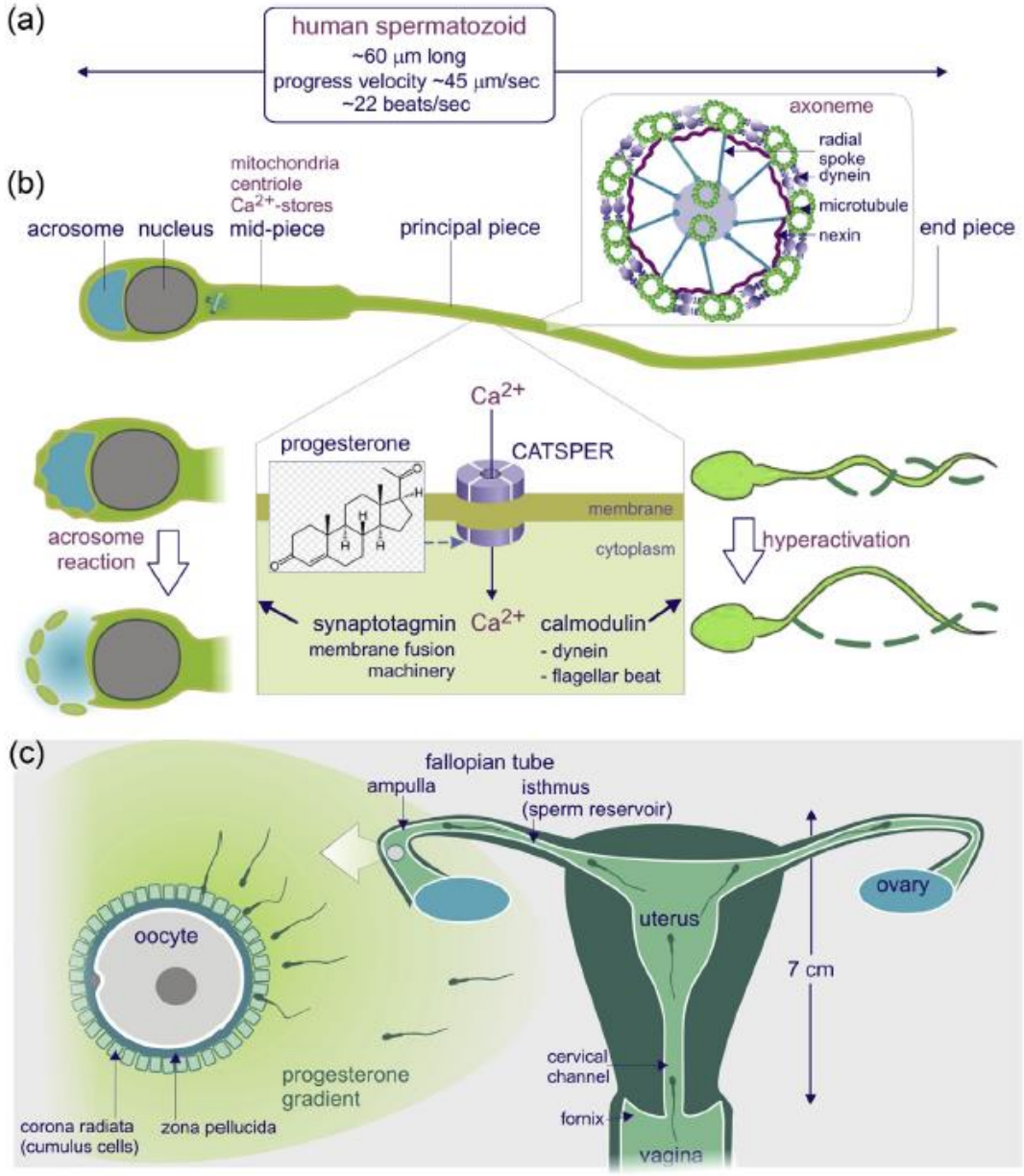
- APL – typická translokace t(15;17), vznik fúze proteinů PML-RAR
- PML-RAR snadno dimerizuje nebo oligomerizuje
- Snadno navazuje HDACs – super-represe cílových genů
- Pouze terapeutická koncentrace retinoidů uvolní represory
- Navázání koaktivátorů a histon acetyltransferáz
- Diferenciační terapie



ROLE STEROIDNÍCH HORMONŮ V KAPACITACI SPERMIÍ

- Kapacitace je nutná pro schopnost spermie proniknout do oocytu
- Schopnost hyperaktivace (rychlý asymetrický pohyb bičíku) a akrozomální reakce (vylití hydrolytických enzymů z akrozomu)

- CATSPER = iontový Ca^{2+} kanál na bičíku
- aktivovaný progesteronem z folikulárních buněk a zvýšeným pH (eflux HCO_3^-)
- Otevření kanálu –> intracelulární zvýšení Ca^{2+}
- Vlna uvolnění Ca^{2+} v cytoplasmě až k akrozomu
- Fúze membrány, rozpad akrozomu
- Změna motility bičíku

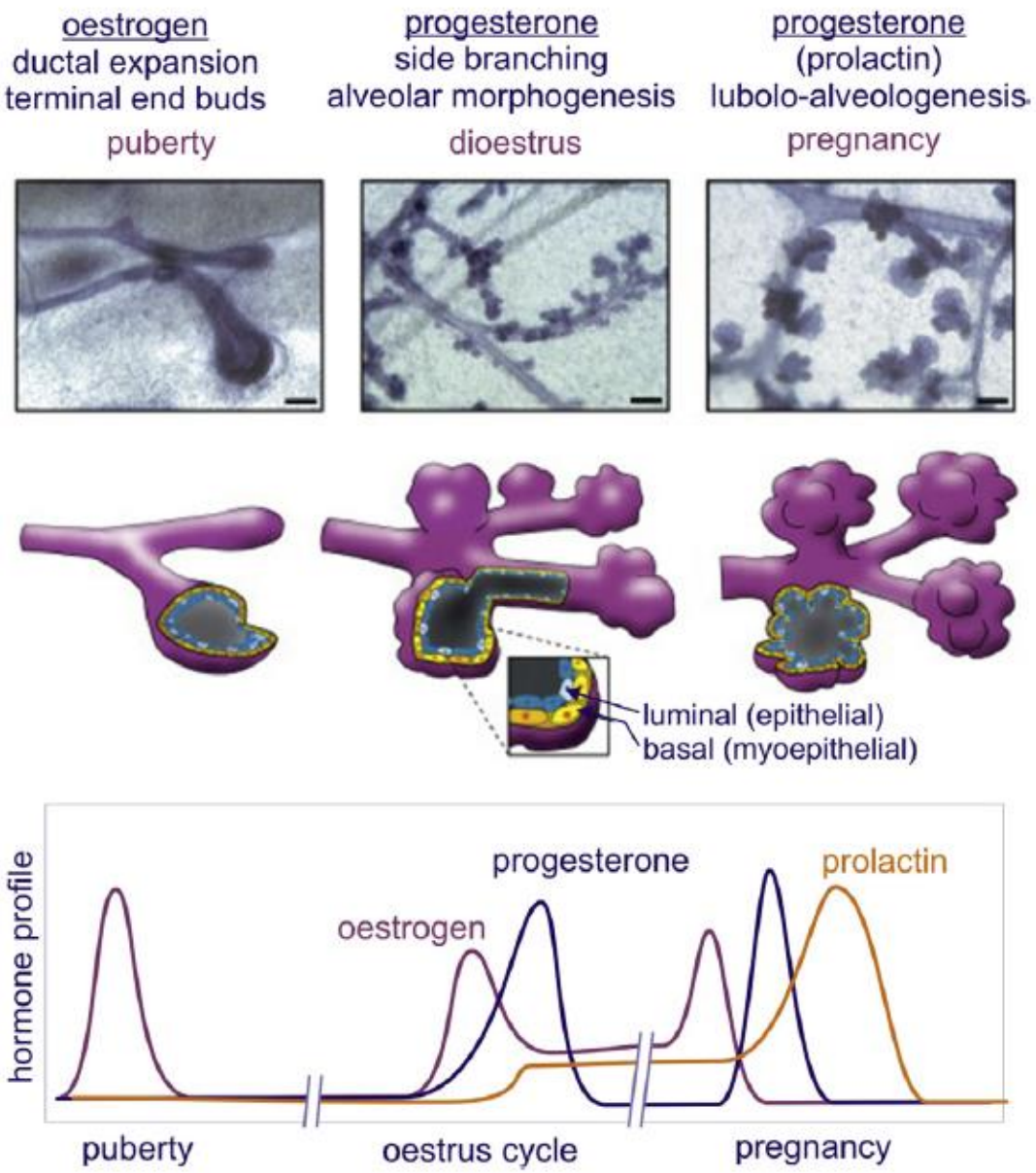


ROLE STEROIDNÍCH HORMONŮ V REGULACI MLÉČNÉ ŽLÁZY

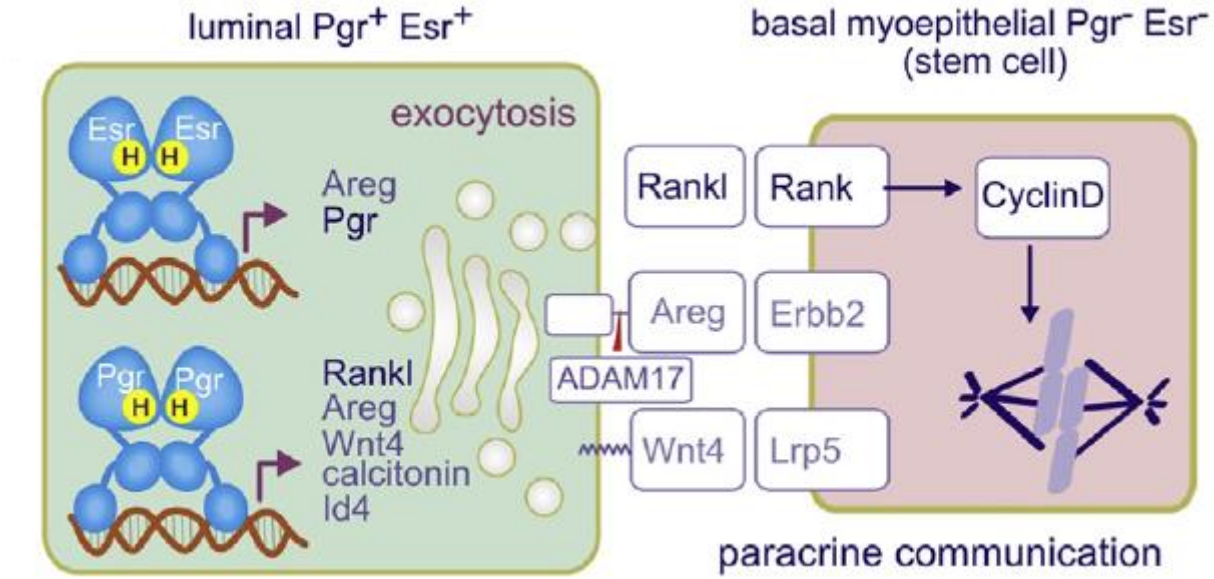
- Estrogeny a progesteron: přechodná produkce během menstruačního cyklu (žluté tělísko) a trvale během těhotenství (placenta) – zabránění ovulace
- Vliv na vývoj mléčné žlázy, produkci mléka a zachování endometria

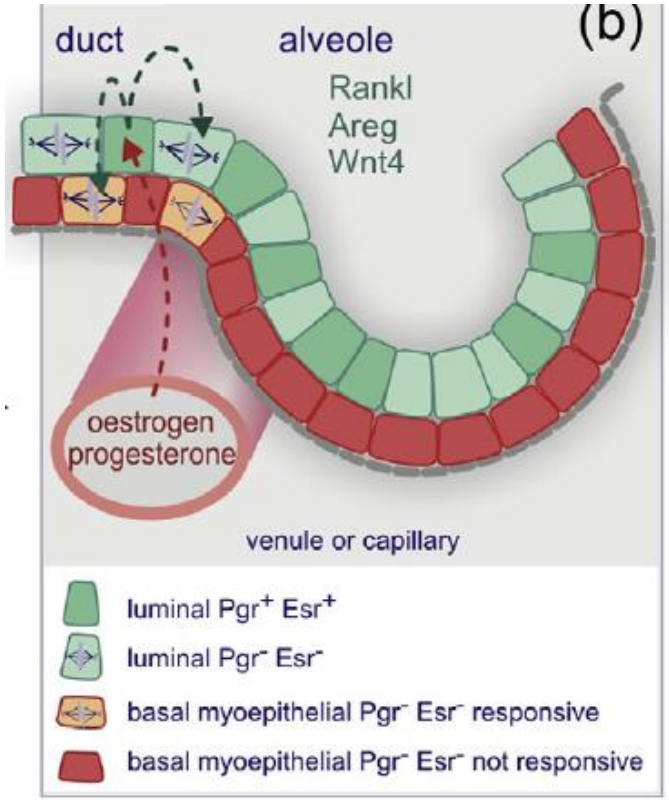
Mléčná žláza:

- Tvořena kanálky zakončenými laloky a lalůčky
- Kmenové buňky diferencují do bazální a luminální vrstvy
- Během opakovaných estrálních/menstruačních cyklů proliferace a diferenciace buněk a bez následného těhotenství involuce



- Během těhotenství: dlouhodobá expanze buněk, prodlužování kanálků (estrogen) a větvení a nové lobuly (progesteron)
- Kmenové buňky – negativní pro oba receptory – proliferace a diferenciace
- Neproliferativní buňky luminálního epitelu – exprese progesteronových i estrogenových receptorů
- Estrogen a progesteron u nich spustí expresi jiných růstových faktorů (amphiregulin, Wnt4, RANKL..)
- Kmenové buňky mají pro ně receptory (ErbB2, Lrp5, RANK) – proliferace
- Vznik progenitorů a diferenciace do bazálních a luminálních buněk

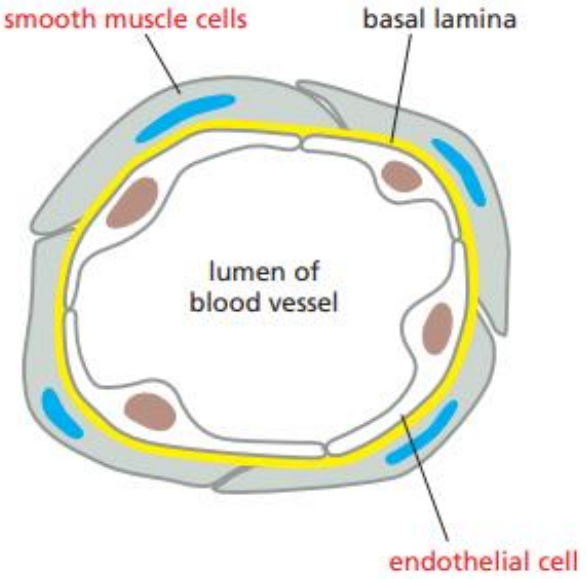


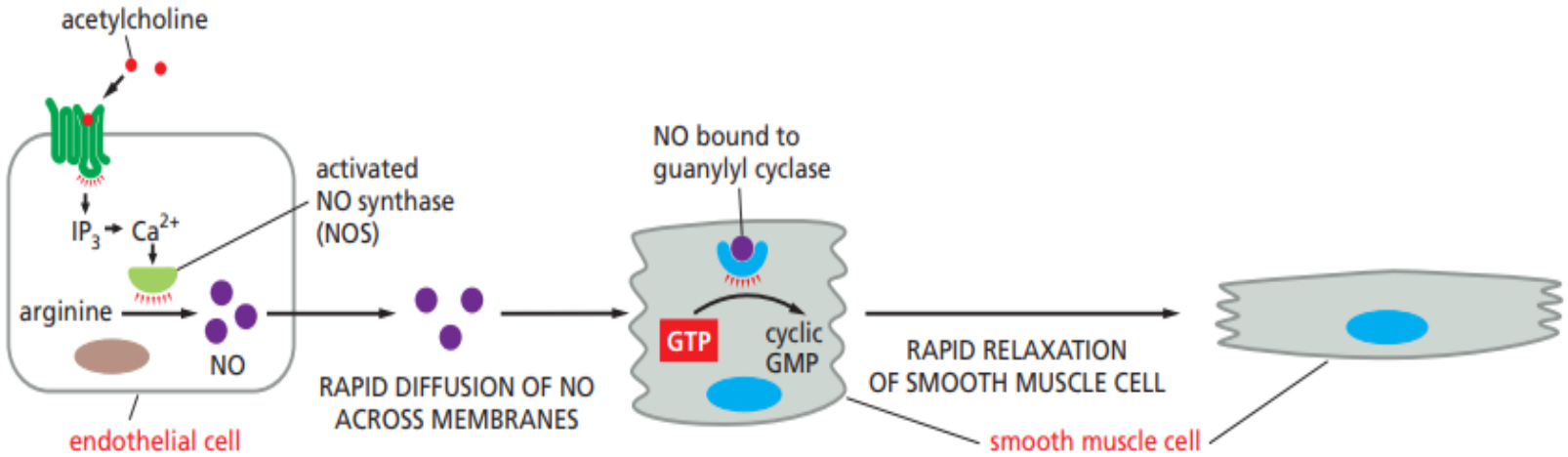


Signalizace pomocí oxidu dusnatého

SIGNALIZACE POMOCÍ OXIDU DUSNATÉHO (NO)

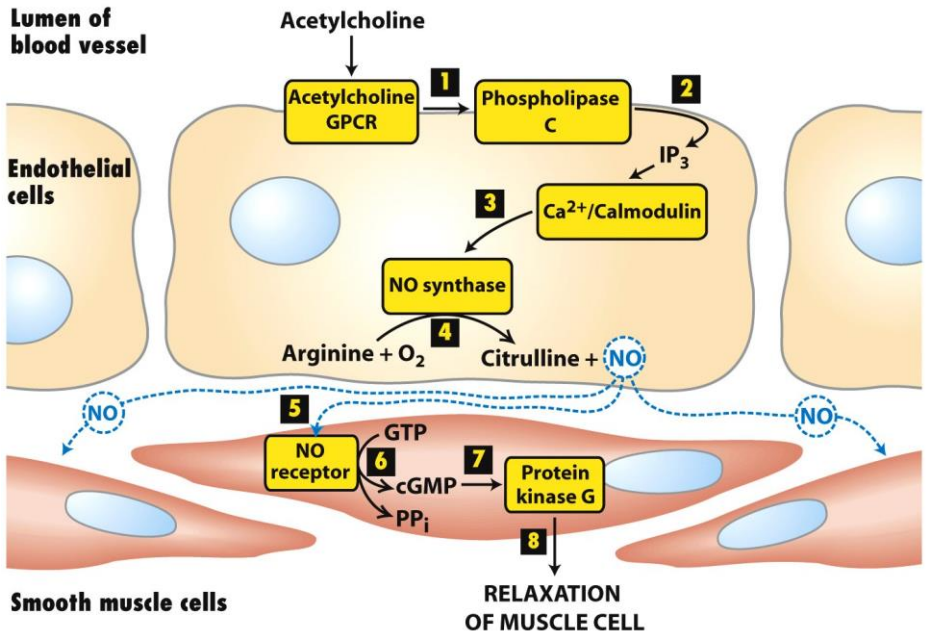
- Plyn: volně prochází plasmatickou membránou
- Lokální a krátkodobé působení (poločas 2-30s)
- Po reakci s H_2O a O_2 vznik dusičnanů a dusitanů
- Difuze z endotelových buněk do hladkého svalstva -> relaxace
- Dilatace cév (např. zásobující srdce) -> zvýšené zásobení krví





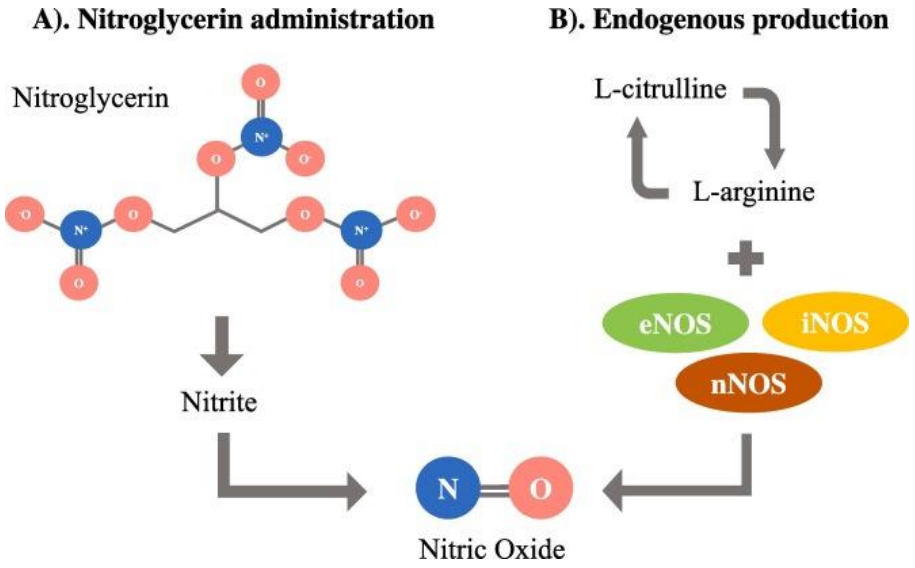
SIGNALIZACE POMOCÍ OXIDU DUSNATÉHO (NO)

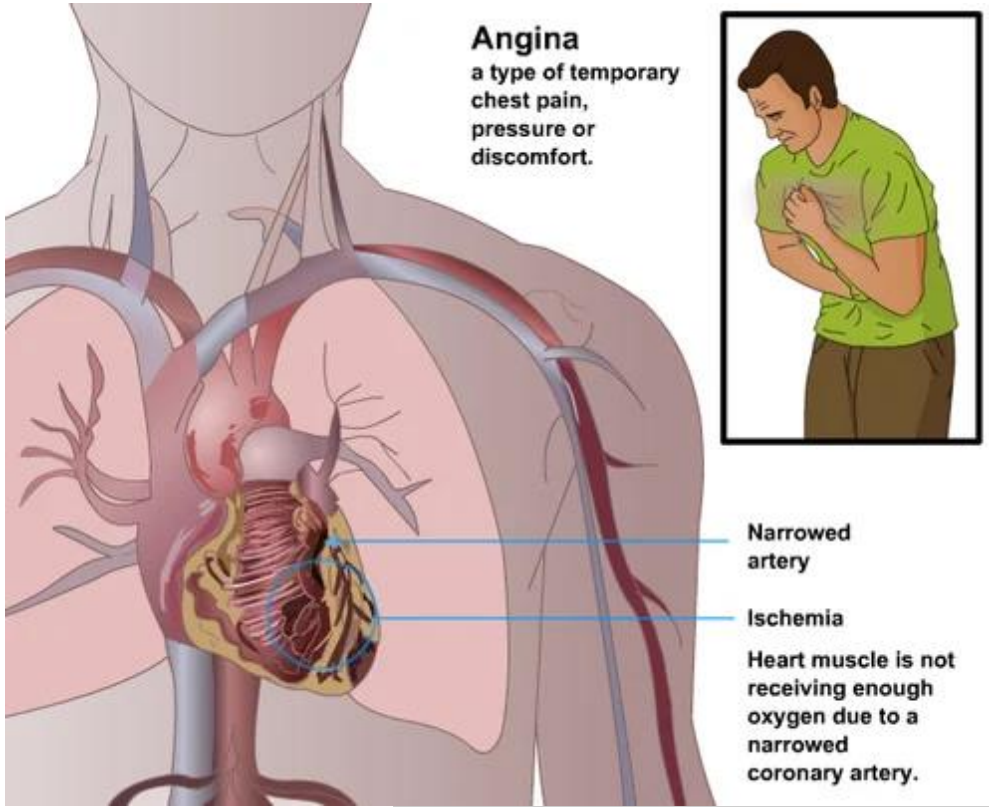
- Aktivace endotelií acetylcholinem -> fosfolipáza C -> IP_3-> Ca^{2+}/kalmodulin -> NO syntáza -> NO
- Vznik NO z O_2 a argininu
- Difuze do svalových buněk – vazba na NO receptor –> změna konformace
- Přímá aktivace cílových enzymů – guanylátcykláza –> tvorba cGMP
- cGMP aktivuje efektory –> pokles vápníku –> omezená fce aktin/myozinových struktur
- Nemění genovou expresi = rychlá odezva

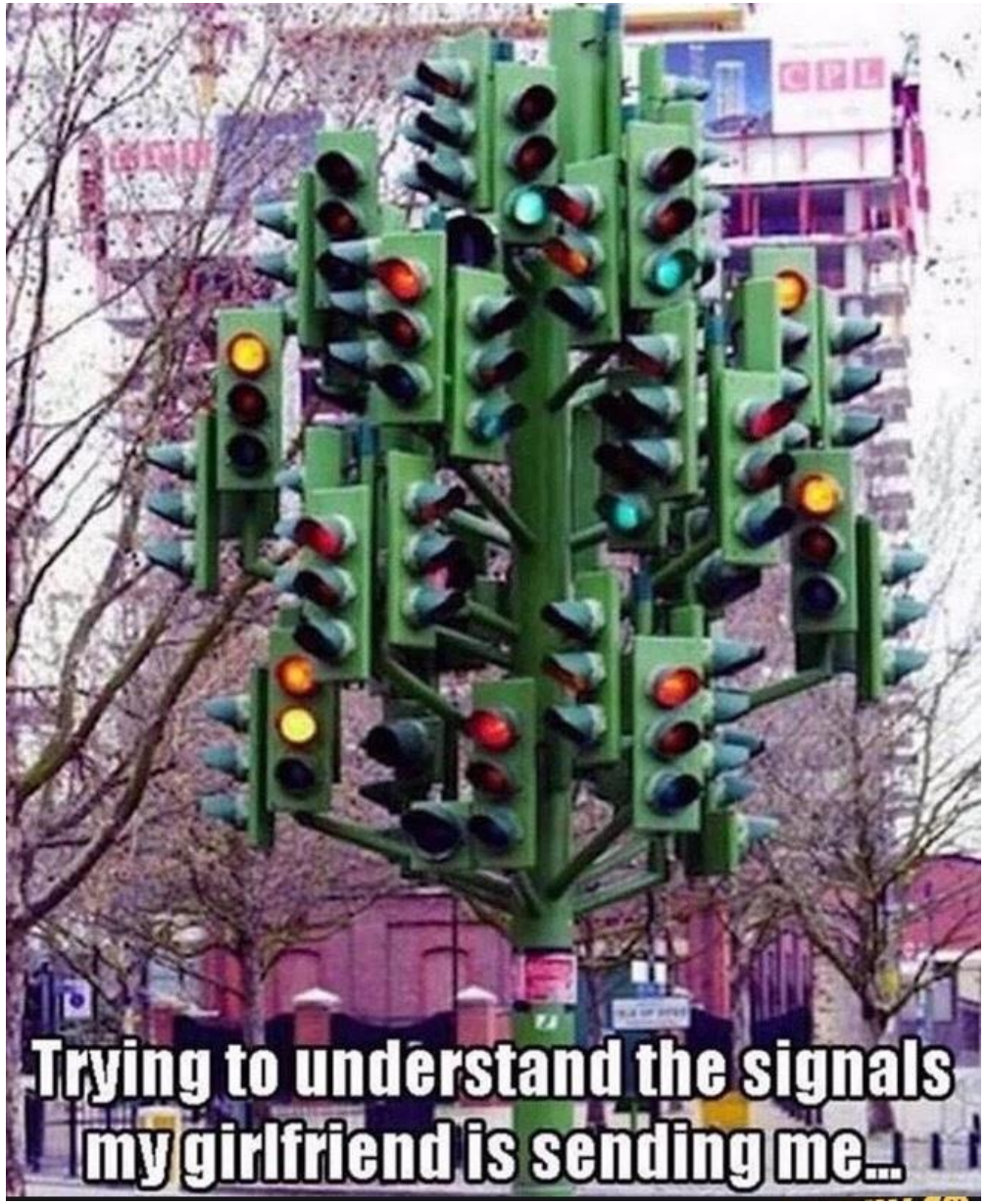


SIGNALIZACE POMOCÍ OXIDU DUSNATÉHO (NO)

- NO –> relaxace svalových buněk
- Využití v medicíně: při infarktu nebo angině pectoris
- Aplikace nitroglycerinu – metabolizace na NO
- Uvolňuje krevní cévy a snižuje zátěž srdce






Trying to understand the signals
my girlfriend is sending me...