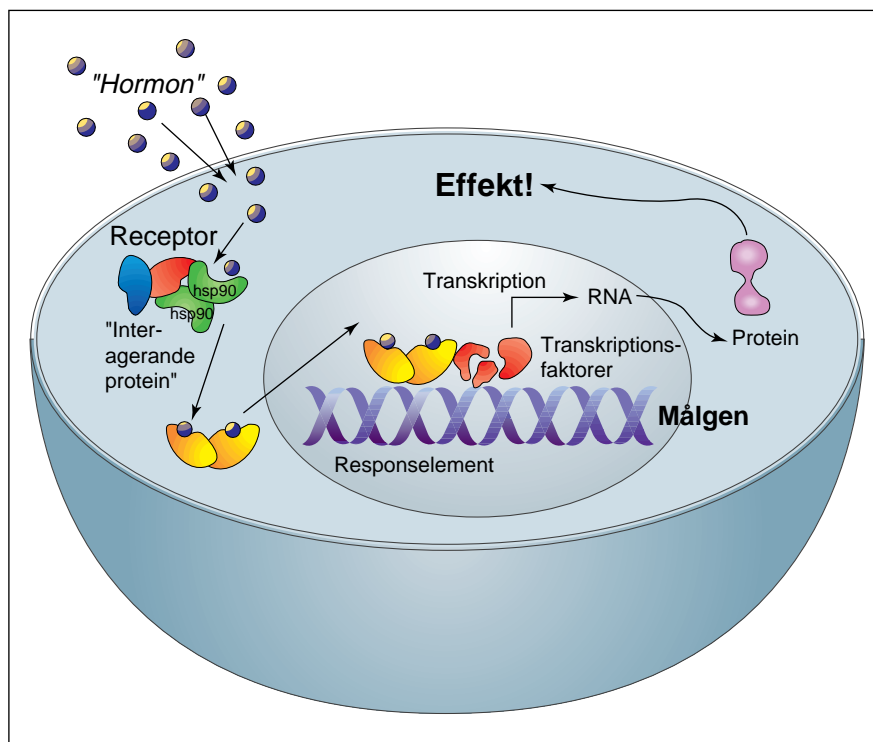


FUNKTION SÖKES FÖR "FÖRÄLDRALÖS" RECEPTOR

En växande grupp proteiner har visat sig ha samma strukturella uppbyggnad och verkningsätt som receptorerna för steroidhormoner, sköldkörtelhormon samt vitamin A och D. För de flesta av dessa proteiner har ingen funktion eller fysiologisk ligand kunnat identifieras, och de benämns därför ofta »orphan» (föräldralösa)-receptorer.

Många orphan-receptorer har uppenbarligen viktiga cellulära funktioner, t ex vid vävnadsdifferentiering eller som koregulatorer för steroidreceptorer med kända ligander.

Det är tänkbart att vissa av orphan-receptorerna kan fungera utan ligand, men ligander kommer troligen att kunna identifieras för de flesta orphan-receptorer.



Figur 1. Schematisk bild av verkningsättet för en »traditionell» kärnreceptor. Den icke aktiverade receptorn, eventuellt i komplex med andra proteiner, t ex hsp90, binder sin ligand. Detta leder till förändringar av proteinets konformation så att de associerade proteinerna lossnar och receptorn får högre affinitet för DNA. Som dimer med en annan receptormolekyl binder receptorn till responselementet i målgenens promotor, varvid transkriptionen av genen stimuleras.

Receptorerna för steroider har i många år tilldragit sig stort intresse inom den medicinska forskningen. Den traditionella bilden av dessa proteiner är att de utgör ligandberoende transkriptionsfaktorer, som reglerar uttrycket av olika målgener genom att binda till särskilda sk responselement, dvs DNA-sekvenser i promotorregionen hos målgenerna, och därigenom upp- eller nedreglera deras transkription (Figur 1). Steroidreceptorerna utgör en stor proteinfamilj, bl a innefattande receptorerna för binjurebarkshormon (glukokortikoider och mineralkortikoider), östrogen, progesteron, testosteron, tyroxin samt vitaminerna A och D. Många av steroidreceptorliganderna och deras

syntetiska analoger har stor klinisk betydelse, se Tabell I.

Under 1980-talet klonades de flesta av dessa receptorer, och de befanns ha en gemensam struktur, bestående av tre sinsemellan relativt fristående domäner (Figur 2) [1]. Den domän som är bäst konserverad mellan olika receptorer är den sk DNA-bindande domänen (DBD), som är belägen centralt i proteinet och som består av två sk zinkfingrar. Denna del av proteinet är huvudsakligen ansvarig för bindning till DNA, och är till minst 45 procent identisk hos alla kända receptorer. Den karboxiterminala delen av proteinet är ansvarig

för bindningen av respektive ligand, men innehåller också sekvenser ansvariga för dimerisering och transaktivering (dvs reglering av genuttrycket). Även vissa delar av denna domän är väl konserverade mellan olika receptorer. Den aminoterminala domänen, slutligen, varierar kraftigt i både längd och aminosyrasammansättning mellan olika receptorer.

Funktionen hos denna domän är inte så väl karakteriserad som för de båda andra, men den härbärgerar bl a transaktiveringsfunktioner. På senare år har man även kunnat konstatera att de olika domänernas funktioner delvis överlappar varandra. Bl a har man funnit att sekvenser i både de N-terminala och de ligandbindande domänerna kan påverka DNA-bindningsspecificiteten.

Orphan-receptorer snabbt växande proteinfamilj

Med hjälp av de olika, konserverade domänerna i de kända steroidhormonreceptorerna har under de senaste åttio åren ett mycket stort antal proteiner iso-

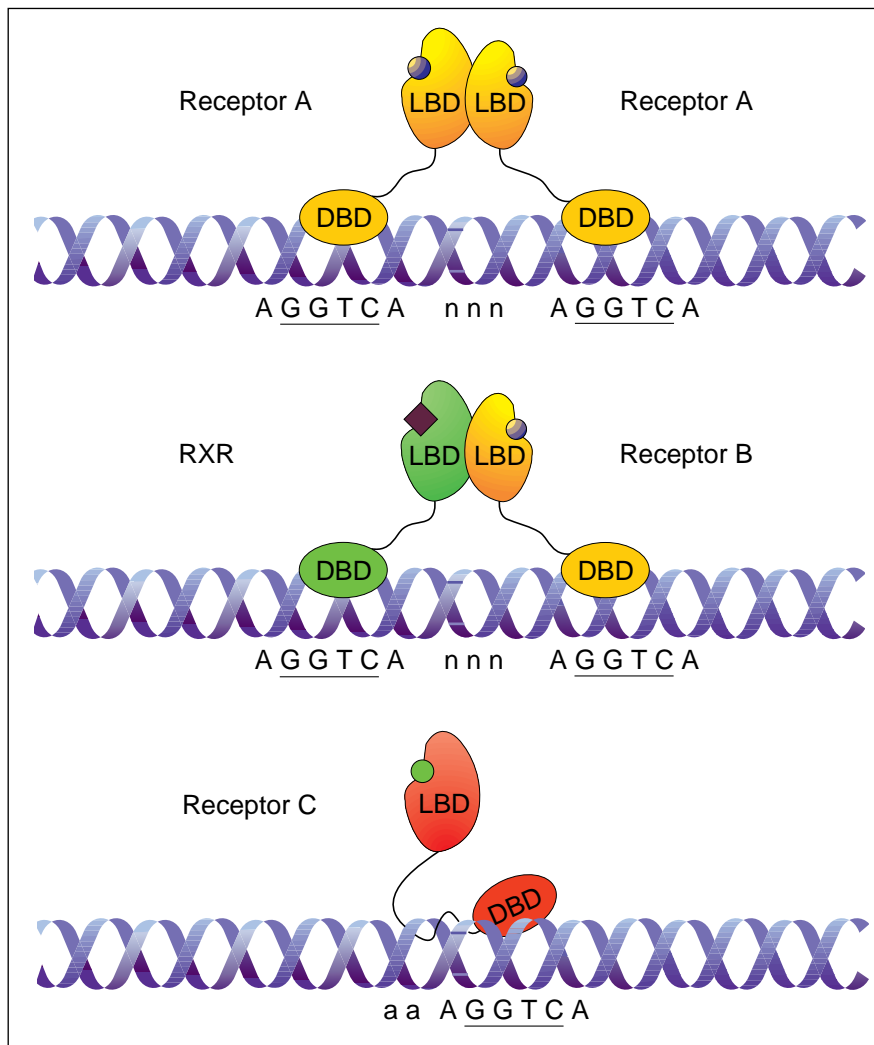
Författare

EVA ENMARK

forskare vid Centrum för bioteknik, institutionen för biovetenskaper

JAN-ÅKE GUSTAFSSON

professor i medicinsk näringslära; båda vid Novum, Karolinska institutet, Huddinge.



Figur 2. Principstruktur för en kärnreceptor med ungefärlig lokalisering av olika funktioner. Den DNA-bindande domänen syns i förstörd form i den nedre delen av figuren. Ej ifyllda cirkelar betecknar positioner där tre eller flera olika aminosyror kan förekomma.

växande proteinfamiljerna och har nu mer än 60 kända medlemmar [2]. Fler än 75 procent av alla medlemmar av kärnreceptorsuperfamiljen (som denna proteinfamilj numera oftast kallas) utgörs av orphan-receptorer [2].

Den ursprungliga steroidreceptorn?

Man kan förmoda att orphan-receptorerna uppträdde vid ett tidigare skede under evolutionen än de »klassiska» steroidreceptorerna. Detta påstående

lerats, vilka tillhör samma proteinfamilj som steroidreceptorerna, men för vilka ingen ligand eller fysiologisk funktion är känd.

Dessa nya receptorer benämns »orphan»(föräldralösa)-receptorer. Denna grupp representerar en av de snabbast

grundas på att många orphan-receptorer även påträffats i insekter, nematoder och andra icke-vertebrater. För samtliga grupper av orphans har homologer påträffats i t ex bananflugan *Drosophila melanogaster* (Tabell II). Tack vare de goda kunskaper som finns om *Drosophila* mutanterna och deras fenotyp har på så vis i många fall viktiga leddrädar erhållits beträffande funktionen hos dessa receptorer.

Receptorerna för progesteron, kortikoider och testosteron har däremot endast påträffats i däggdjur. Vitamin A- och östrogenreceptorerna tycks här inte en mellanställning, då de även isolerats från fiskar och fåglar. Som en kuriositet kan nämnas att ett protein med avlägsen likhet med kärnreceptorerna nyligen har identifierats från växtriket. Uppenbart är att den karakteristiska receptorstrukturen utgjort ett framgångsrikt tema under utvecklingen av nya DNA-bindande proteiner.

Ett annat skäl till förmodandet att orphan-receptorerna eventuellt utgör en mer »primitiv» typ av proteiner är att vissa av dem tycks kunna aktivera transkription utan bindning till en specifik ligand eller kunna binda till DNA som monomer i stället för dimer (se nedan).

Isoformer och varianter ökar mångfalden

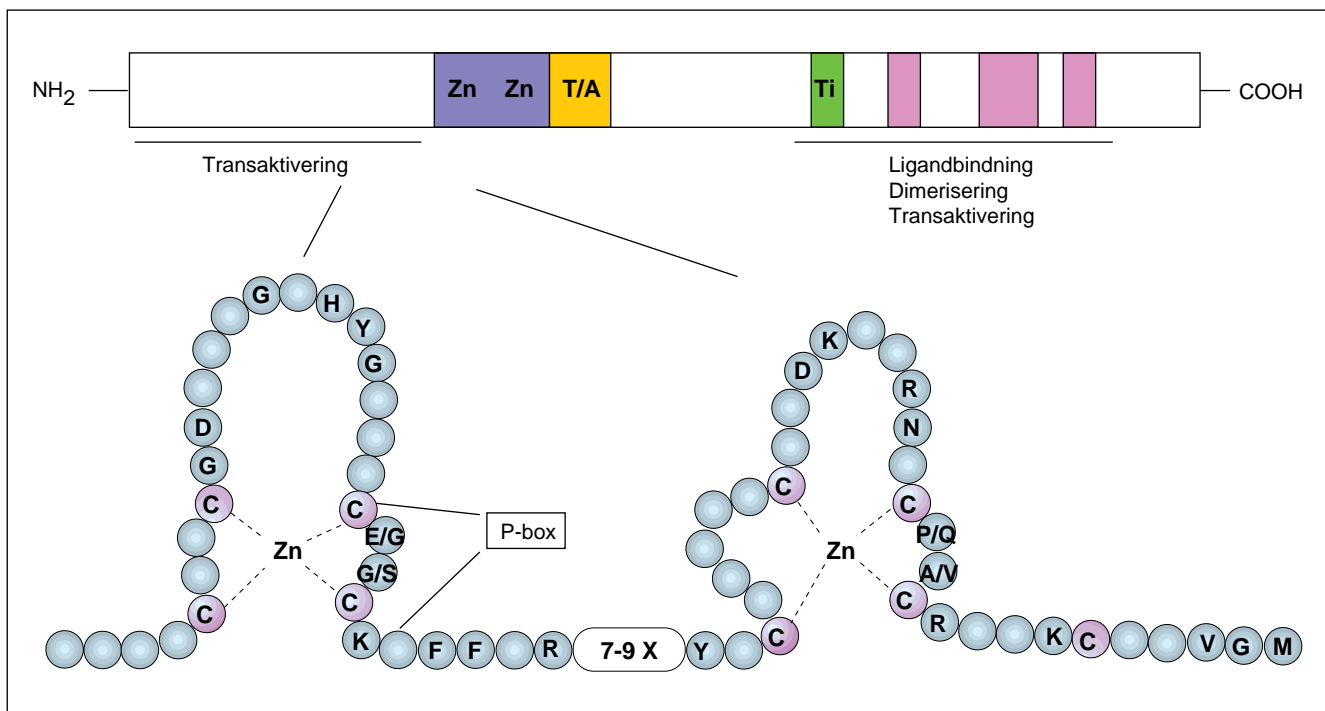
Multipla, snarlika kopior av samma gen är ett vanligt fenomen inom multifamiljer. Detta innebär ett slags garanti för organismen att funktionen av proteinet upprätthålls trots mutationer i en av »kopiorna». Detta fenomen är mycket utbrett hos orphan-receptorerna. För de flesta orphan-receptorer har två eller tre snarlika gener, kallade isoformer, isolerats. I vissa fall har isoformerna skilda mönster för vävnadsuttryck, och funktionerna för isoformerna

Tabell II. *Drosophila*-homologer till några orphan-receptorer hos däggdjur.

Mammal receptor	<i>Drosophila</i>	Funktion
COUP-TF	Seven-up	Kontrollerar fotoreceptor-utveckling
NGFI-B	DHR38	Ej känd
Tlx	Tailless	Embryonal segmentering
SF-1	Ftz-F1	Embryonal segmentering
ROR	DHR3	Ecdyson-inducerad
RevErbA	E75A	Ecdyson-inducerad
OR1	EcR	Ecdyson-receptor
TR4	E78E/F	Inhiberar ecdysonreceptorn
HNF4	dHNF4	Embryonal utveckling

Tabell I. Nukleära receptorer av betydelse inom medicinen.

Receptor	Läkemedel	Terapi vid/funktion
Östrogenreceptorn	Nolvadex	Bröstcancer
Androgenreceptorn	Cyproteronacetat	Prostatacancer
Glukokortikoidreceptorn	Dexametason	Anti-inflammatorisk
Progesteronreceptorn	RU486	Abortinducerande
Mineralkortikoidreceptorn	Spironolakton	Högt blodtryck
Vitamin D3-receptorn	Ergokalciferol	Rakitis
Tyreoidhormonreceptorn	Tyroxin	Hypotyroidism
Retinsyreceptorn	Retinoider	Psoriasis/Hudcancer
PPAR (peroxisome proliferator activated receptor)	Lipidsänkande	Hjärt- och kärlsjukdomar
PPAR	Tiazolidindion	Diabetes



Figur 3. Schematisk bild över DNA-bindning för orphan-receptorer vilka binder a. som homodimer, b. som RXR heterodimer och c. som monomer. DBD= DNA-bindande domän. LBD= ligandbindande domän.

överlappar uppenbarligen inte varandra fullständigt.

Ett annat vanligt fenomen är receptorvarianter, skapade genom olika splitsning av ett primärt transkript (mRNA) eller med användande av olika promotorer (genregulatoriska element) i samma gen. I flera fall har dessa varianter befunnits ha olika egenskaper. Ett elegant exempel är paret SF1/ELP (steroidogenic factor 1/embryonic long terminal repeat-binding protein). Dessa två proteiner transkriberas från samma gen, men genom differentiell splitsning har de skilda amino- och karboxiterminala ändar. Genom detta har de olika DNA-bindningsaffinitet, där ELP binder med lägre affinitet, och olika expressionsmönster. ELP uttrycks företrädesvis i embryonala vävnader medan SF1 reglerar manlig sexuell differentiering och uttrycks företrädesvis i binjuror och gonader. Ett annat exempel är ROR-gruppen av orphan-receptorer, där inte mindre än fyra olika varianter isolerats. Dessa varianter har olika aminoterminal domän och har befunnits ha olika DNA-bindningsegenskaper.

Monomer och heterodimer ger variation i DNA-bindning

Den klassiska modellen för hur en kärnreceptor aktiverar sin målgen, beskriven i Figur 1, involverar en homodimer, vilken binder till en palindromisk sekvens. I många avseenden har orphan-receptorerna visat sig bryta mot

detta mönster (Figur 3). De flesta orphan-receptorer binder till en direkt repeterad sekvens, nämligen AGGTCA n AGGTCA, där n kan vara noll till fem nukleotider.

Detta system av besläktade responselement för vilka orphan-receptorerna har olika bindningspreferens har ibland kallats 1, 2, 3-regeln [3]. Flera receptorer kan binda till samma responselement och därigenom finreglera transkriptionen av samma målgen. Det har t ex visats att orphan-receptorerna COUP-TF och SF1 konkurrerar om bindning till samma responselement. Sekvenser som flankerar det basala responselementet samt mellan de båda repeterade elementen har också visat sig kunna påverka DNA-bindningen. 1, 2, 3-regeln ska därför bara ses som en utgångspunkt och inte som en strikt »regel».

Många orphan-receptorer har också visat sig binda optimalt till DNA i form av en heterodimer med RXR, en annan medlem av kärnreceptorfamiljen. RXR är något av en universell partner till andra receptorer och över tio kärnreceptorer har visat sig bilda sådana heterodimerer [4]. RXR är också en receptor för 9-cis-retinsyra, och kan även bilda homodimerer.

Slutligen har många orphan-receptorer visat sig binda till DNA i form av en monomer. För dessa receptorer har aminosyrasekvenser nedströms om DBD, kallade A/T-boxar, visat sig vara nödvändiga för DNA-bindningen. Responselementen för dessa receptorer har oftast visat sig vara en icke-repeterad sekvens, där sekvenser uppströms

om sekvensmotivet AGGTCA ger specificitet [5].

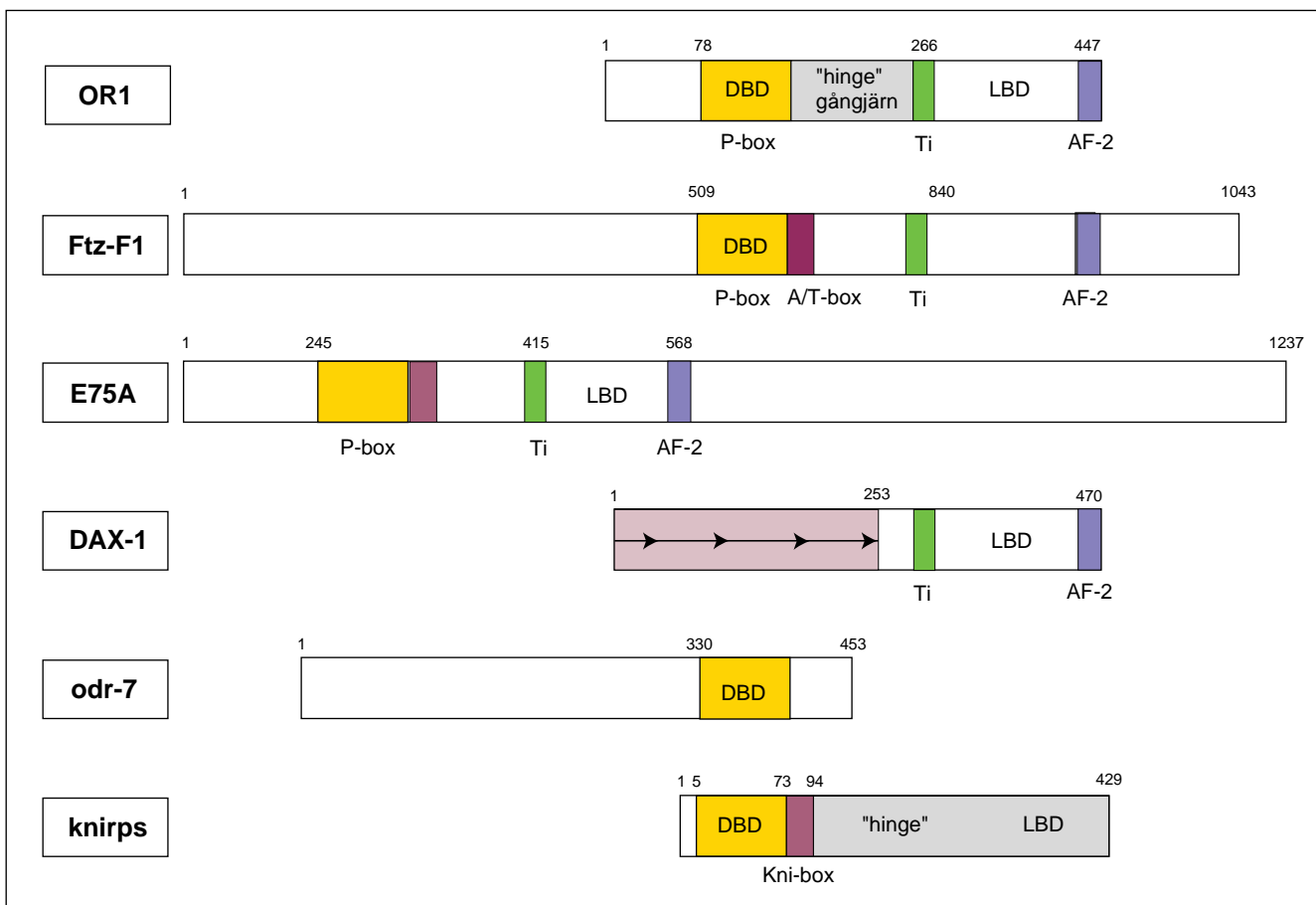
Ledtrådar om fysiologisk roll

Många orphan-receptorer tycks ha en viktig roll som modulatorer av andra receptors effekt. Detta kan tänkas ske via flera olika mekanismer, t ex via bindning till ett gemensamt DNA-element eller genom bildande av heterodimerer med RXR, varigenom mycket av det tillgängliga RXR-proteinet titreras ut.

Olika expressionsmönster avseende tid och/eller lokalisering kan också ge information om funktionen hos orphan-receptorerna. Många orphan-receptorer uttrycks under specifika stadier av vävnadsdifferentieringen. De flesta exemplen kommer från *Drosophila*, där flera orphan-receptorer utgör s k segmenteringsgener, vilka avgör polariteten hos de olika larvsegmenten vid utvecklingen av *Drosophila*embryot. Ett par exempel finns också beskrivna från däggdjur, framför allt i samband med utvecklingen av centrala nervsystemet (tlx) och reproduktionssystemet (GCNF).

Andra orphan-receptorer uttrycks mer eller mindre specifikt i olika vävnader hos den vuxna organismen. HNF4, t ex, är framför allt uttryckt i lever och styr transkriptionen av leverspecifika proteiner. En isoform av en given receptor kan också uttryckas mycket specifikt i ett smalt vävnadsregister, t ex RZR β , som bara återfinns i tallkottkörteln.

Slutligen finns det receptorer som induceras kraftigt av olika stimuli, t ex tillväxtfaktorer. NGFI-B identifierades



Figur 4. Struktur hos några »atypiska» orphan-receptorer. DAX-1 saknar traditionell DNA-bindande domän, odr-7 saknar ligandbindande domän, E75A har en extremt lång karboxiterminal »svans» utgörande mer än halva proteinet, liksom Ftz-F1, vilken också har sekvenser (markerade A/T-box) utanför DBD som bidrar till DNA-bindningen. Knirps slutligen har mycket ringa, knappt synlig likhet med övriga receptorer, speciellt i den ligandbindande domänen.

ursprungligen på basis av denna kraftiga ökning vid behandling med NGF (nerve growth factor).

Variationer på temat de avlägsna kusinerna

Huvuddelen av de orphan-receptorer som isolerats under senare år har en struktur som starkt påminner om de »klassiska» steroidreceptorerna (Figur 2). Några proteiner med en avvikande struktur har dock isolerats. Mest intressanta av dessa är två proteiner kallade DAX-1 och odr-7, vilka isolerats från människa respektive nematoden *Caenorhabditis elegans*. Dessa två receptorer innehåller nämligen endast ligand- respektive DNA-bindande domän av »kärnreceptortyp» (Figur 4). Funktionellt är dessa två proteiner också mycket intressanta. Brist på DAX-1 [6] har visat sig vara den avgörande faktorn för utveckling av sjukdomarna DSS (dosage sensitive sex reversal) och AHC (adrenal hypoplasia congenita). AHC är

en sällsynt, ofta letal störning av binjurens funktion, vilken resulterar i underproduktion av bl a glukokortikoider, mineralokortikoider och androgener. Den ansvariga genen bakom denna sjukdom har sedan tidigare lokaliserats till X-kromosomen, och via detaljerade mutationsstudier kunde DAX-1-genen slutligen identifieras. Detta protein saknar helt den DNA-bindande domän som karakteriserar övriga kärnreceptorer. I stället har den en unik »domän» bestående av fem kopior av en leucin- och cysteinrik sekvens, som föreslagits kunna mediera specifik DNA-bindning.

Odr-7 [7] å andra sidan har visat sig vara av betydelse för luktsinnet hos nematoder. Odr-7 har vidare den i särklass mest divergenta DNA-bindande domänen av alla kända kärnreceptorer (undantaget DAX-1). Inga studier har ännu presenterats angående DNA-bindningsegenskaperna hos odr-7. Odr-7 saknar helt ligandbindande domän, och dess funktion regleras följaktligen via andra mekanismer än ligandaktivering.

På jakt efter en ligand

En radikal skillnad i isoleringen av orphan-receptorer jämfört med isoleringen av de »klassiska» steroidreceptorerna är att de senare oftast isoleras utifrån sin hormonbindande förmåga medan orphan-receptorerna vanligen isoleras utgående från sekvenshomolo-

gi, oftast i den DNA-bindande domänen. Det har visat sig svårare än väntat att hitta ligander för orphan-receptorerna, och endast för ett fåtal har sådana identifierats. Vissa ligander eller aktiverande substanser som hittills identifierats leder emellertid till intressanta reflektioner. För RXR (9-cis-retinsyrareceptorn), har det t ex nyligen visats att en metabolit av klorofyll, fytansyra (som finns i blodet), kan aktivera denna receptor [C Weinberger, Stockholm, pers medd, 1995]. För PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) har vi själva visat att den kan aktiveras av fettsyror, t ex linolensyra och arakidonsyra [8]. Detta kan peka på att kostkomponenter är ligander även för en del andra orphan-receptorer. En uppenbar ligandkandidat är t ex vitamin E, där rapporter indikerat förekomsten av ett nukleärt bindarprotein med hög affinitet, dvs eventuellt en receptor.

Tänkbara ligander skulle också kunna återfinnas bland metaboliter av t ex kolesterol, vilka på så sätt skulle kunna fungera som regulatorer av kolesterolmetabolismen [9]. Oxysteroler, t ex, har länge pekats ut som tänkbara receptorligander, då deras effekter delvis tycks vara på transkriptionsnivå. Stöd för denna teori gavs nyligen, då orphan-receptorn FXR visade sig aktiveras av farnesol, en prekursor till kolesterol [10].

Aktivatorer för orphan-receptorer

skulle även kunna återfinnas bland signalmolekyler från andra endokrina system. Till exempel kan vissa prostaglandiner aktivera PPAR [11]. Ännu ett spektakulärt, men fortfarande synnerligen omdebatterat, stöd för denna hypotes gavs nyligen då en forskargrupp pekade ut melatonin som aktivator av orphan-receptorn RZR [12]. Melatonin är känt framför allt för att tillsammans med serotonin reglerar dygnsrytmen av sömn och vakenhet.

Slutligen är det möjligt att vissa orphan-receptorers effekt regleras på andra vägar än via bindning av en specifik ligand, t ex via skillnader i uttrycket av själva receptorproteinet eller via posttranslational modifiering, till exempel fosforylering. Någon av dessa alternativa aktiveringsvägar kan mycket väl vara aktuell för orphan-receptorn COUP-TF.

Sökandet efter potentiella ligander sker framför allt efter två grundprinciper. Den ena, ibland skämtsamt kallad »Merck index», använder rena substanser, t ex från ett sk substansbibliotek, för att testa aktiveringspotential i ett in vitro-system, med en indikatorgen med lätt kvantifierad produkt, t ex luciferas, som målgen. Den andra principen utgår från ett biologiskt material, t ex plasma eller vävnadsextrakt, som fraktioneras med biokemiska metoder, varefter fraktionerna testas med avseende på sin aktiverande förmåga enligt ovan.

Fraktioner innehållande aktiverande substanser kan därefter analyseras med t ex gaskromatografi-masspektrometri för att identifiera den aktiverande substansen. I dessa studier har man ofta dragit fördel av att de olika receptordomänerna kan fungera oberoende av varandra, och sk chimära receptorer har tillverkats med den ligandbindande domänen från den studerade orphan-receptorn och den aminoterminala och DNA-bindande domänen från en välkarakteriserad receptor, t ex glukokortikoidreceptorn, vilket kringgår problemet med att DNA-bindningsegenskaperna inte är kända för orphan-receptorn ifråga.

»Knockout» av orphan-receptorer

En drastisk men ibland effektiv metod att finna en fysiologisk funktion för ett protein är via framtagande av sk »knockout-möss», där den studerade genen genom homolog rekombination eliminerats från försöksdjuret, alternativt endast från vissa vävnader i djuret [13]. För orphan-receptorer har denna metod hittills tillämpats på fyra olika gener. För två av dessa, *err2* och *HNF4*, blev resultatet att fostren dog tidigt under embryonalutvecklingen, vilket pekar på en viktig funktion för dessa re-

ceptorer i detta stadium [14]; [V Giguère, Lake Tahoe, pers medd, 1996]. Knockout av en tredje orphan, *SF1*, leder inte oväntat till kraftiga störningar i utvecklingen av de reproduktiva organen (avsaknad av gonader och binjurar). För den fjärde orphan-receptorn, *NGFI-B*, syns ingen defekt i de mutanta djuren. En isoform av *NGFI-B*, *nurr1*, uttrycks däremot i större mängder än normalt, vilket tyder på att denna kompensatoriskt övertagit många av de funktioner som normalt handhas av *NGFI-B*.

Stort medicinskt intresse

Upptäckten av ett stort antal proteiner tillhöriga samma proteinfamilj som steroidreceptorerna, men för vilka ingen funktion ännu är känd, är av stort potentiellt medicinskt intresse. Det kan förutspås att många fler orphan-receptorer än de nu kända kommer att isoleras under kommande år. Att karakterisera dessa med avseende på deras fysiologiska roll är en viktig uppgift, och dessa studier kommer med stor sannolikhet att ge ytterligare värdefull kunskap om kroppens olika system för att svara på endokrina och exokrina signaler, insikter som kan komma till praktisk nytta inom medicinen.

Referenser

1. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-95.
2. Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO Journal* 1992; 11: 1003-13.
3. Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptors. *Cell* 1991; 65: 1255-66.
4. Leblanc BP, Stunnenberg HG. 9-cis retinoic acid signaling: changing partners causes some excitement. *Genes Dev* 1995; 9: 1811-6.
5. Laudet V, Adelmant G. Nuclear receptors. Lonesome orphans. *Current Biology* 1995; 5: 124-7.
6. Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W et al. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 1994; 372: 635-41.
7. Sengupta P, Colbert HA, Bargmann CI. The *C elegans* gene *odr-7* encodes an olfactory-specific member of the nuclear receptor superfamily. *Cell* 1994; 79: 971-80.
8. Göttlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JÅ. Fatty acids activate a chimera of the clofibrate acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89: 4653-7.
9. Moore DD. Diversity and unity in the nuclear hormone receptors: a terpenoid receptor superfamily. *New Biologist* 1990; 2: 100-5.
10. Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* 1995; 81: 687-93.

11. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin j(2) is a ligand for the adipocyte determination factor ppar-gamma. *Cell* 1995; 83: 803-12.
12. Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren WN, Andre E, Missbach M, Saurat JH et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994; 269: 28531-4.
13. Lendahl U, Törnell J. Transgena djur. Djur med skräddarsydda genetiska förändringar. *Läkartidningen* 1994; 91: 1711-7.
14. Chen WS, Manova K, Weinstein DC, Duncan SA, Plump AS, Prezioso VR, et al. Disruption of the *HNF-4* gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev* 1994; 8: 2466-77.