

Eva Enmark, forskare, centrum för bioteknik, institutionen för biovetenskaper

Jan-Åke Gustafsson, professor i medicinsk näringslära, VD, centrum för bioteknik, institutionen för biovetenskaper; båda vid Novum, Karolinska institutet, Huddinge (jan-ake.gustafsson@mednut.ki.se)

Kärnreceptorer hos människa, fluga och mask ger ökad sjukdomsförståelse

■ Kärnreceptorer utgör en snabbt växande grupp av transkriptionsfaktorer involverade i många viktiga biologiska processer, till exempel reglering av kolesterolmetabolism, fertilitet och embryonell utveckling [1]. Cirka 50 medlemmar av denna proteinfamilj är kända hos däggdjur, och för 28 av dem har ligander/aktivatorer identifierats (Figur 1). Dessa ligander utgör ett viktigt fält för utveckling av nya läkemedel riktade mot till exempel diabetes, hyperkolesterolemi och cancer.

Som utannonserats i flera sammanhang har även människans genom nu kartlagts fullständigt. Detta har man sedan länge sett fram emot med stor förväntan, och det innebär ett genombrott även i fråga om kärnreceptorforskningen. För en tid sedan gjordes en preliminär version av Celeras sekvensresultat tillgänglig för delar av forskarvärlden [2]. De slutsatser man kan dra från dessa resultat pekar mot att endast ett litet fåtal, om ens någon, kärnreceptor undgått upptäckt sedan tidigare. Nu tillgängliga resultat är emellertid inte helt fullständiga, så möjligheten existerar fortfarande att ytterligare någon receptor kan identifieras i den ännu ej offentliggjorda delen av sekvensdata. Detta kan vid första påseendet tyckas som något av en besvikelse. Man bör dock ha i minnet att just denna proteinfamilj under flera år varit en av de flitigast studerade, både av akademiska forskare och inom industrin, på grund av dess stora intresse vid läkemedelsdesign.

Trots att alltså sannolikt endast någon enstaka ny receptor kommer att återfinnas i dessa genomdata är de ändå av synnerligen stort värde, framför allt av två orsaker. Den första är att många tidigare okända varianter av de kända receptorerna har identifierats med hjälp av dessa data, vilket ökar förståelsen av receptorernas funktion. Till detta kan även anföras att den transkriptionella regleringen av receptorerna nu kan studeras på ett systematiskt sätt, i och med att promotorregionerna för samtliga receptorgener nu blir tillgängliga. Celeras genomsekvenser är också intressanta för nukleärreceptorforskningen när det gäller studierna av den naturligt förekommande variationen mellan individer, genom uppbyggnaden av en så kallad SNP (single nucleotide polymorphism)-databas, där en stor mängd data om små individuella variationer på DNA-nivå lagrats. Till dags dato har i storleksordningen två miljoner sådana variationer identifierats. Dessa är värdefulla framför allt vid sökandet efter samband mellan genetiskt

SAMMANFATTAT

På kort tid har de fullständiga DNA-sekvenserna för tre mycket olika flercelliga organismer publicerats; en nematod (*Caenorhabditis elegans*), en fluga (*Drosophila melanogaster*) och människa (*Homo sapiens*). Detta innebär naturligtvis på många sätt ett genombrott för biologisk och medicinsk forskning.

I denna artikel summeras de fynd som gjorts med hjälp av dessa genomsekvenser med avseende på proteinfamiljen kärnreceptorer, en grupp av transkriptionsfaktorer som är involverade i många viktiga biologiska processer, till exempel reglering av kolesterolmetabolism och fertilitet, där klassiska medlemmar bland annat är receptorerna för östradiol och progesteron.

betingade sjukdomar och mutationer i individuella gener.

Hittills har endast ett fåtal studier gjorts angående samband mellan olika sjukdomar och polymorfism hos kärnreceptorer. De mest lovande resultaten så långt kommer från studier av PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors), där samband har funnits med insulinkänslighet och fetma [3]. Man har även studerat SHP (short heterodimer partner) och där funnit att denna receptor tycks vara hypervariabel samt möjligen kopplad till fetma hos människan [4].

C elegans kärnreceptorer

C elegans är en jordlevande mask och den första flercelliga organism vars genom kartlagts fullständigt; detta skedde i december 1998 [5]. Fullbordandet av detta projekt gav ett överraskande resultat avseende antalet nukleära receptorer. Baserat på graden av identitet i den DNA-bindande domänen har C elegans inte mindre än 250 nukleära receptorer, mer än fyra gånger fler än vad som är känt från någon annan organism [6]. Preliminär karakterisering av dessa gener ger vid handen att en majoritet av dem är funktionella, åtminstone transkriberas de. Analys av dessa gener visar att flera klasser av receptorer i däggdjur och insekter även återfinns hos C elegans. De fles-

T v Drosophila melanogaster, en cirka 2 mm lång bananfluga. T h Caenorhabditis elegans, en jordlevande mikroskopiskt liten nematod som lever på bakterier. Båda arterna är idealiska för genetisk forskning, flugan eftersom den reproducerar sig snabbt och nematoden eftersom den har en förmåga till självbefrukting och blir fullt mogen på tre dygn.

ta av *C elegans* receptorer saknar dock kända motsvarigheter hos däggdjur. Många andra maskar liknande *C elegans* orsakar stora hälsoproblem i utvecklingsländer, till exempel *Schistosoma mansoni*, en trematod som ger upphov till bilharzia (snäckfeber). Flera nematoder, till exempel springmask, spolmask och hakmask samt flera cestoder (bandmaskar), infekterar såväl husdjur som människa och är både vanliga och obehagliga. Upptäckten att dessa organismer har ett flertal nukleära receptorer öppnar en helt ny möjlighet för utveckling av behandlingsmetoder mot dessa parasiter.

Receptorer hos Drosophila – färre än väntat

Den 31 december 1999 offentliggjordes den fullständiga sekvensen för *Drosophila melanogaster* (bananflugans) genom [7]. *Drosophila* är en väl karakteriserad modellorganism för genetiska studier, och det är av stort intresse att jämföra uppsättningen kärnreceptorer hos denna insekt med dem hos *C elegans* respektive människa. Till mångas förvåning visade det sig att *Drosophila* endast har en mindre del av de receptorer som tidigare identifierats hos *C elegans* – sammanlagt 21 unika gener. Vidare kan samtliga av dessa receptorer placeras i en av de sju sedan tidigare identifierade receptorklasserna (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999).

Endast fyra av dessa gener var okända sedan tidigare. Av dessa fyra tillhör två den så kallade »tailless«-gruppen av orphan-receptorer. En är en *Drosophila*-homolog till ERR-receptorerna (estrogen receptor-related receptor) och en är nära besläktad med den humana orphan-receptorn GCNF (germ cell nuclear factor).

Nya Drosophila-receptorer

Den från evolutionär synpunkt mest intressanta av de tidigare okända receptorerna från *Drosophila* är *Drosophila*-homologen till ERR, eftersom den sannolikt utgör den evolutionära föregångaren till östrogenreceptorerna. En ERR-liknande sekvens har tidigare identifierats hos en korall [B Blumberg, University of California, Irvine, USA, pers medd 1999], vilket gör denna receptor evolutionärt långt äldre än vad som ti-

digare antagits. Hos däggdjur är tre subtyper av ERR kända, kallade ERR α , - β respektive - γ . Dessa uppvisar klart distinkta biologiska funktioner.

ERR α uttrycks i många olika vävnader, hos både foster och vuxna djur. Ett samband med fettsyra β -oxidation har antytts [8], då ERR α har visat sig reglera ett nyckelenzym för denna; medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD). En ERR α knock-out-mus (dvs en musstam där ERR α -genen har inaktiverats) har framställts, som är viabel men som visar intrauterin tillväxtstörning.

ERR β -receptorn uttrycks i stora mängder framför allt under embryonalutvecklingen, varefter uttrycket avtar. Knock-out av denna gen resulterar i embryonal letalitet 10,5 d.p.c. (dvs 10,5 dagar efter befruktningen) på grund av störd placentautveckling [9].

ERR γ slutligen isolerades långt senare än de ovan nämnda två generna, och mycket mindre är känt om dess biologiska funktion. Den är sekvensmässigt mest lik ERR β , men har ett bredare uttrycksmönster med stora mängder bland annat i hjärna, lunga, benmärg och binjurar [10].

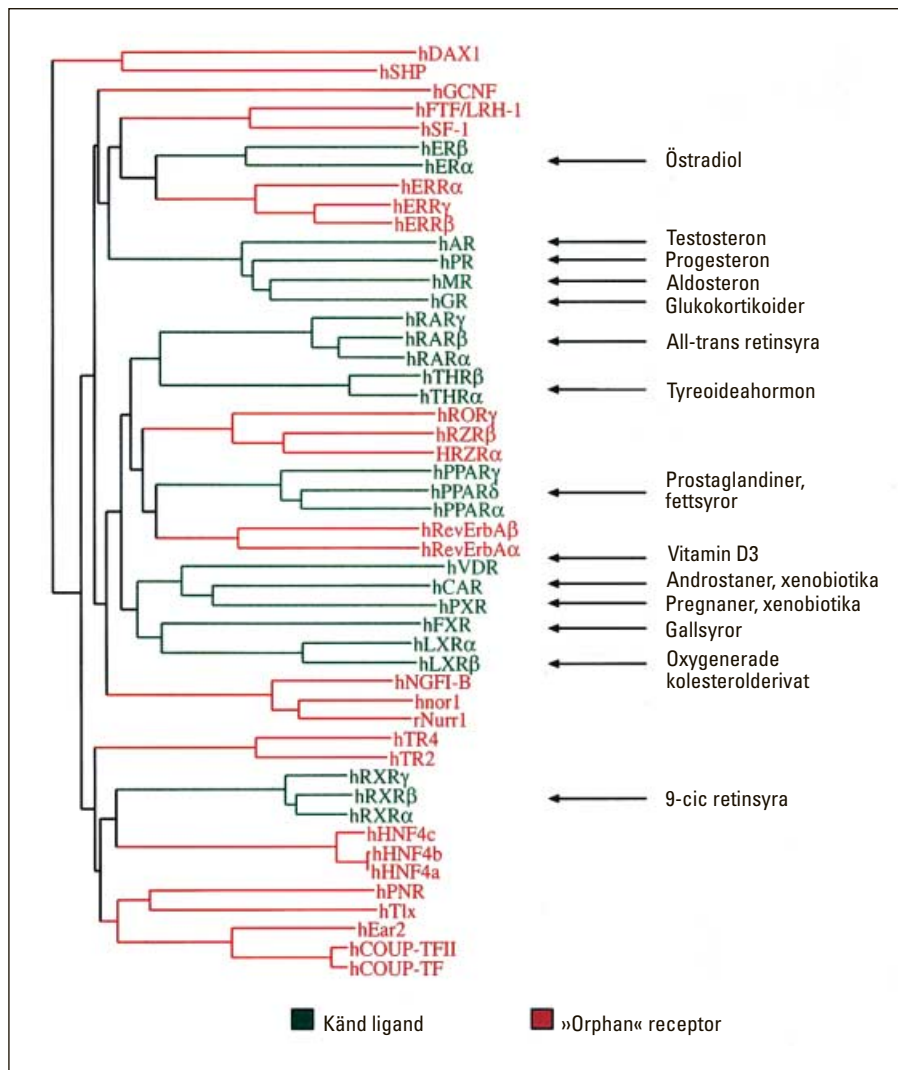
Alla tre subtyperna av ERR hos däggdjur kan aktivera samma målgener som östrogenreceptorerna, eftersom de kan binda till samma DNA-sekvens, ERE (estrogen response element), som dessa. De kan även aktivera samma målgener som kärnreceptorn SF-1 genom att binda till SF-1:s responselement [11]. Det senare är av stort intresse eftersom SF-1 (steroidogenic factor 1)-receptorn spelar en viktig roll vid bland annat könsdifferentiering och reglering av syntes av steroidhormonerna.

Några fysiologiska ligander till ERR eller SF-1 har ännu inte identifierats. En nyligen publicerad artikel antyder emellertid att vissa xeno-östrogener eventuellt kan verka som antagonister på ERR α -receptorn [12], och två andra artiklar har visat att två välkända farmakologiska substanser, dietylstilbestrol och 4-hydroxytamoxifen, kan aktivera ERR β respektive ERR γ [13, 14], vilket ökar möjligheterna att även fysiologiska ERR-agonister eller -antagonister kommer att kunna identifieras.

Den andra av de tidigare okända kärnreceptorerna som identifierats vid sekvensering av *Drosophila*-genomet är en

annons

annons



Figur 1. Fylogenetiskt träd visande samtliga nu kända mammala kärnreceptorer och deras ligander. Receptorer med känd ligand är markerade med grön färg, och receptorer utan känd ligand markeras i rött.

homolog till den mammala GCNF-receptorn (NR6A1) [15].

Motsvarigheter till denna receptor har även identifierats i *C. elegans* (Bogan A och medarbetare, GenBank acc no AAG15182), såväl som i andra typer av insekter. GCNF representerar således ytterligare en av de ursprungliga receptorfamiljerna, med ett evolutionärt ursprung tidigare än ryggradsdjurens framträdande. GCNF är unik i det att den utgör den enda kända representanten för sin receptorgrupp, medan de flesta andra receptorer har två eller flera nära besläktade subtyper, vilka kodas av separata gener.

Under den embryonala utvecklingen uttrycks GCNF företrädesvis i det centrala nervsystemet, varefter uttrycket förändras till att vara högst i könsceller med lågt uttryck i de flesta andra organ. Knock-out av musens GCNF resulterar i embryonal letalitet. Den direkta orsaken till denna är ej känd, men utvecklingen av såväl placenta som nervsystemet är kraftigt störd hos de foster som studerats [16]. Även hos *Xenopus* (lövgroda) har GCNF visat sig spela en viktig roll vid embryonal utveckling och vävnadsdifferentiering.

I tillgängliga data från *Drosophila*-genomprojektet finns det två olika typer av GCNF, som sannolikt representerar olika splitsningsvarianter av genen. Den längre av dessa kodar för ett 1 506 aminosyror långt protein, vilket gör denna till en av de störstmässigt längsta kända receptorer.

Analys av aminosyrasekvensen hos *Drosophilas* GCNF avslöjar i den N-terminala domänen ett sekvensmotiv, en sträcka aminosyror, som är karakteristisk för ATP/GTP-bin-

dande proteiner. Detta motiv är inte känt hos någon annan grupp av receptorer. Motivet är konserverat hos alla kända icke-mammala GCNF: *Drosophila*, *C. elegans*, *Bombyx mori* (mullbärssilkesfjäril), *Tenebrio molitor* (mjölmask), vilket antyder att sekvensmotivet har en viktig funktion; motivet är i övrigt vanligast hos membranbundna receptorer.

Två av de tidigare okända receptorererna hos *Drosophila* tillhör »tailless«-undergruppen av receptorer. Den ena av dessa utgör sannolikt homologen till den mammala PNR (photoreceptor specific nuclear receptor)-receptorn, medan den andra representerar en tidigare okänd subtyp. Dessa receptorer har hos både däggdjur och insekter olika funktioner i det centrala nervsystemet. Den tidigast identifierade receptorn i denna grupp, kallad »tailless« hos *Drosophila* och »tlx« hos vertebrater, är av stor betydelse för nervsystemets utveckling [17]. PNR å sin sida uttrycks i princip endast i retina och är hos människa genetiskt associerad med vissa ärftliga former av retinadegeneration [18].

Hos *Drosophila* finns ytterligare en subtyp utan känd motsvarighet hos däggdjur, kallad »dissatisfaction« (dsf). Denna receptor utgör en av de faktorer som bestämmer sexuell preferens hos insekter [19].

Varför har *C. elegans* många receptorer och *Drosophila* få?

En uppenbar fråga efter kartläggningen av genomen hos masken och insekten är varför kärnreceptorgenfamiljen har genomgått denna amplifiering utan motstycke hos masken, *C.*

elegans. För att förstå detta måste man ta en närmare titt på denna speciella organism. En unik egenskap som särskiljer den från både däggdjur och insekter är den stora andel av djurets celler som utgörs av nervceller. Hela masken har cirka 959 celler, och inte mindre än en tredjedel utgörs av nervceller av olika typer. Det är inte otroligt att många av de receptorer som saknas hos andra djurgrupper är involverade i kontakten mellan dessa celler.

En annan påtaglig skillnad mellan *C. elegans* och andra organismer är den ytterst genomsläppliga » huden«. Detta utnyttjas till exempel i försök där masken »badar« i en lösning innehållande RNA motsvarande vissa specifika gener, varvid masken tar upp dessa molekyler genom huden och så kallad RNA-interferens inträffar, vilket stör uttrycket av den aktuella genen. Masken är nämligen mycket mer mottaglig för ämnen i omgivningen, till exempel tungmetaller, hormonliknande substanser från växter, föroreningar etc. En möjlighet är att de för masken unika receptorerna tjänar som mediatorer för just signaler från omgivningen, vilket gör att masken genom förändrat genuttryck kan anpassa sig till den aktuella situationen.

En intressant uppgift är nu att undersöka den biologiska funktionen hos *C. elegans*-receptorerna. I synnerhet om man finner att en del av dessa har fysiologiska ligander öppnar detta stora möjligheter för utveckling av nya läkemedel mot de patogena maskarna som nämndes ovan.

Ett annat intressant spörsmål är hur vanlig förekomsten av ett sådant högt receptortantal är i den övriga djurvärlden. Kärnreceptorer har isolerats från många typer av djur, även så kallade primitiva eukaryoter, som till exempel koraller, havsanemoner och schistosomas [20]. Hittills har endast receptorer tillhörande de receptorklasser som återfinns i *Drosophila* identifierats, och det är av stort intresse att undersöka den evolutionära utbredningen av de receptorgrupper som hittills visat sig vara unika för *Caenorhabditis*-släktet.

Perspektiv

Sekvensering av det humana genomet har alltså slutligen fastställt det totala antalet kärnreceptorer. Studier av variationer i receptorernas uttryck och struktur kommer utan tvivel att ge väsentlig information och ge större förståelse för sjukdomars uppkomst och epidemiologi.

De kärnreceptorer som återfunnits i *C. elegans*, men vilka saknar motsvarighet hos däggdjur, kan även de ha betydelse för utveckling av nya läkemedel med användning mot patogena parasiter hos människa och inom veterinärmedicin.

Referenser

1. Gronemeyer H, Laudet V. Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* 1995;2:1173-308.
2. McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, et al. A physical map of the human genome. *Nature* 2001;409:934-41.
3. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamäki J, Mykkanen L, Kuusisto J, et al. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature Genet* 1998;20:284-7.
4. Nishigori H, Tomura H, Tonooka N, Kanamori M, Yamada S, Shio K, et al. Mutations in the small heterodimer partner gene are associated with mild obesity in Japanese subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:575-80.
5. Chervitz SA, Aravind L, Sherlock G, Ball CA, Koonin EV, Dwight SS, et al. Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: orthology and divergence. *Science* 1998;282:2022-8.
6. Sluder AE, Mathews SW, Hough D, Yin VP, Maina CV. The nuclear receptor superfamily has undergone extensive proliferation and diversification in nematodes. *Genome Res* 1999;9:103-20.

7. Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amaratunga PG, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 2000;287:2185-95.
8. Vega RB, Kelly DP. A role for estrogen-related receptor alpha in the control of mitochondrial fatty acid beta-oxidation during brown adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 1997;272:31693-9.
9. Luo J, Sladek R, Bader JA, Matthysen A, Rossant J, Giguere V. Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta. *Nature* 1997;388:778-82.
10. Eudy JD, Yao S, Weston MD, Ma-Edmonds M, Talmadge CB, Cheng JJ, et al. Isolation of a gene encoding a novel member of the nuclear receptor superfamily from the critical region of Usher syndrome type IIa at 1q41. *Genomics* 1998;50:382-4.
11. Johnston SD, Liu X, Zuo F, Eisenbraun TL, Wiley SR, Kraus RJ, et al. Estrogen-related receptor alpha 1 functionally binds as a monomer to extended half-site sequences including ones contained within estrogen-response elements. *Mol Endocrinol* 1997;11:342-52.
12. Yang C, Chen S. Two organochlorine pesticides, toxaphene and chlordane, are antagonists for estrogen-related receptor alpha-1 orphan receptor. *Cancer Res* 1999;59:4519-24.
13. Tremblay GB, Kunath T, Bergeron D, Lapointe L, Champigny C, Bader JA, et al. Diethylstilbestrol regulates trophoblast stem cell differentiation as a ligand of orphan nuclear receptor ERR beta. *Genes Dev* 2001;15:833-8.
14. Coward P, Lee D, Hull MV, Lehmann JM. 4-hydroxytamoxifen binds to and deactivates the estrogen-related receptor gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8880-4.
15. Chen F, Cooney AJ, Wang Y, Law SW, O'Malley BW. Cloning of a novel orphan receptor (GCNF) expressed during germ cell development. *Mol Endocrinol* 1994;8:1434-44.
16. Greschik H, Schule R. Germ cell nuclear factor: an orphan receptor with unexpected properties. *J Mol Med* 1998;76:800-10.
17. Pignoni F, Baldarelli RM, Steingrimsson E, Diaz RJ, Patapoutian A, Merriam JR, et al. The *Drosophila* gene *tailless* is expressed at the embryonic termini and is a member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 1990;62:151-63.
18. Kobayashi M, Takezawa SI, Hara K, Yu RT, Umesono Y, Agata K, et al. Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4814-9.
19. Finley KD, Edeen PT, Foss M, Gross E, Ghbeish N, Palmer RH, et al. Dissatisfaction encodes a tailless-like nuclear receptor expressed in a subset of CNS neurons controlling *Drosophila* sexual behavior. *Neuron* 1998;21:1363-74.
20. Escriva H, Langlois MC, Mendonca RL, Pierce R, Laudet V. Evolution and diversification of the nuclear receptor superfamily. *Ann NY Acad Sci* 1998;839:143-6.

SUMMARY

Nuclear receptors in man, fly and worm provide greater understanding of disease

Eva Enmark, Jan-Åke Gustafsson

Läkartidningen 2002;1186-90

Recently the complete genomic sequences for three very different multicellular organisms have been published, from one nematode (*Caenorhabditis elegans*), one fly (*Drosophila melanogaster*) and human (*Homo sapiens*). Of course, this means a breakthrough in many ways for biological research. Summarised in this article are the findings made using these genomic sequences regarding the protein family of nuclear receptors. This is a group of transcription factors involved in many important biological processes, i.e. regulation of cholesterol homeostasis and fertility; classical members of this protein family are, amongst others, the receptors for estradiol and progesterone.

Correspondence: Jan-Åke Gustafsson, Dept of Medical Nutrition, Huddinge sjukhus, SE-141 86 Huddinge, Sweden