

Received: 2008.06.13
Accepted: 2008.09.18
Published: 2008.10.17

Rola receptorów jądrowych w procesie śmierci komórek*

The role of nuclear receptors in cell death

Magdalena Kopij, Andrzej Rapak

Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Receptory jądrowe tworzą grupę strukturalnie homologicznych białek, które po związaniu odpowiedniego liganda działają w jądrze jako czynniki transkrypcyjne i regulują różne procesy komórkowe. Receptory jądrowe działają jako monomery, homodimery lub heterodimery z receptorem RXR. W jądrze wiążą się ze swoistą sekwencją nukleotydową w obszarze paromotorowym danego genu, zwaną elementem odpowiedzi RE. Niektóre z receptorów jądrowych (Nur77, GR, RXR, RAR, VDR, PPAR) mogą wpływać na proces apoptozy poprzez indukcję białek pro- i/lub antyapoptotycznych lub oddziaływanie na inne czynniki transkrypcyjne. Wiele ligandów receptorów jądrowych (głównie retinoidów) znalazło już zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej stosowane indywidualnie lub częściej w połączeniu z innymi lekami przeciwnowotworowymi.

Słowa kluczowe:

receptory jądrowe • śmierć komórek • apoptoza • RXR

Summary

The nuclear receptors form a group of structurally homologous proteins which act as ligand-dependent transcription factors and regulate a variety of intracellular processes. The nuclear receptors act as monomers, homodimers, or heterodimers together with retinoid X receptor (RXR). They bind in the nucleus to a specific nucleotide sequence in the promoter region called the response element (RE). Certain nuclear receptors (e.g. Nur77, GR, RXR, RAR, VDR, PPAR) can influence apoptosis through the induction of pro- and/or anti-apoptotic proteins or affect other transcription factors. Some ligands for the nuclear receptors (mainly retinoids) are applied in anticancer therapy alone or in combination with other anticancer drugs.

Key words:

nuclear receptors • cell death • apoptosis • RXR

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=870428>

Word count:

5022

Tables:

–

Figures:

–

References:

84

Adres autora:

doc. dr hab. Andrzej Rapak, Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: rapak@iitd.pan.wroc.pl

* Praca powstała w ramach grantu MNiSW nr N401 114 31/2607.

WSTĘP

Zjawiska prowadzące do śmierci komórki należą do jednych z najistotniejszych procesów w rozwoju organizmów, pozwalają bowiem na zachowanie homeostazy i eliminację komórek nieprawidłowych. Śmierć komórki może zachodzić za pośrednictwem dwóch mechanizmów: biernego procesu nekrozy i programowanego procesu obejmującego apoptozę i autofagię. Poszczególne szlaki śmierci występują często jednocześnie i są trudne do rozróżnienia. Uruchamiają się w różnych przedziałach czasowych i mogą przebiegać niezależnie lub wzajemnie się uzupełniać [66].

Zaburzenie mechanizmów śmierci komórki może się przyczynić do rozwoju wielu schorzeń. Nadmierna odporność komórek na apoptozę odgrywa rolę w rozwoju nowotworów, schorzeń autoimmunologicznych i przewlekłych infekcji. Natomiast zbyt rozległa śmierć komórek wskutek apoptozy lub nekrozy może być przyczyną ostrej niewydolności narządów, nasilenia powikłań procesów niedokrwienia lub rozwoju niektórych przewlekłych chorób degeneracyjnych. Apoptoza odgrywa też szczególną rolę w procesie negatywnej selekcji limfocytów T dojrzewających w grasicy oraz w odpowiedzi typu komórkowego, co leży u podstaw prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego [55,67].

W procesie apoptozy bierze udział wiele białek, z których najważniejsze to grupa receptorów jądrowych, czynniki transkrypcyjne NF-AT i NF- κ B oraz białka z rodziny Bcl-2. Spośród licznej nadrodziny receptorów steroidowo-tyroidowo-retinoidowych, w procesie apoptozy komórek, najważniejszą rolę mogą pełnić receptory z rodziny Nur77, ROR, receptory retinoidów (RXR, RAR), glukokortykosteroidów (GR), androgenów i estrogenów (AR, ER), receptor peroksyosomalnego czynnika proliferacyjnego (PPAR) oraz witaminy D3 (VDR). Niektóre receptory jądrowe, oprócz swojej transkrypcyjnej funkcji w jądrze, mogą ulegać translokacji na powierzchnię mitochondrium (Nur77, RXR, GR, ER). Nie wiadomo, jaki jest dokładny mechanizm i na czym polega regulacja translokacji jądrowo-mitochondrialnej receptorów jądrowych oraz jej znaczenie dla procesu apoptozy. Receptory jądrowe biorą udział głównie w apoptotycznej śmierci komórki, zarówno poprzez szlak zewnątrzkomórkowy, jak i mitochondrialny szlak wewnątrzkomórkowy. Działając jako klasyczne czynniki transkrypcyjne mogą wpływać na ekspresję białek pro- i antyapoptotycznych, blokować działanie innych czynników transkrypcyjnych, a także pełnić funkcję białek transportowych lub adaptorowych.

MECHANIZMY ŚMIERCI KOMÓRKI

Apoptoza

Apoptoza jest programowaną śmiercią komórki kontrolowaną przez geny, wywołowaną zarówno przez bodźce fizjologiczne jak i patologiczne. Jest to aktywny, uporządkowany proces umożliwiający eliminację komórek bez pobudzenia procesu zapalnego i uszkodzenia otaczających tkanek [3]. Komórka może ulec apoptozie z powodu:

- braku czynników wzrostowych, hormonów, substancji odżywczych,
- zaburzonego kontaktu z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej i z innymi komórkami,
- działania czynników zewnątrzpochodnych.

Proces apoptozy możemy podzielić na kilka faz:

1. Przesłanie sygnału śmierci.
2. Faza efektorowa – wspólna dla różnych sygnałów inicjujących apoptozę, decydująca o nieodwracalności zmian.
3. Zmiany strukturalne prowadzące do śmierci komórki.
4. Usunięcie komórek i ciałek apoptotycznych.

Proces apoptozy może być zainicjowany drogą zewnątrzkomórkową poprzez aktywację receptorów z rodziny TNF lub szlakiem mitochondrialnym, który prowadzi do zmiany potencjału mitochondrialnego, tworzenia się porów i uwolnienia do cytosolu różnych czynników apoptotycznych [20]. Szlak zewnątrzkomórkowy może wzmacniać proces apoptozy poprzez trawienie białka Bid i aktywację szlaku mitochondrialnego.

W odpowiedzi na sygnał śmierci dochodzi do uruchomienia śmiertelnej kaskady kaspaz, swoistych wewnątrzkomórkowych proteaz cysteininowych rozszczepiających łańcuch białkowy substratów w miejscu reszty karboksylowej kwasu asparaginowego. Kaspazy tworzą odrębną rodzinę czternastu dotychczas poznanych enzymów, którą na podstawie swoistości substratowej i funkcji biologicznej można podzielić na dwie grupy. Pierwsza z nich obejmuje kaspazy prozapalne (np. kaspaza 1), druga natomiast kaspazy zaangażowane w proces apoptozy, wśród których wyróżnia się kaspazy inicjatorowe (kaspazy 2, 8, 9 i 10) i kaspazy efektorowe (kaspazy 3, 6 i 7). Proteolityczna aktywacja kaspaz efektorowych przez kaspazy inicjatorowe zapoczątkowuje lawinę przemian wewnątrzkomórkowych nieuchronnie prowadzących do śmierci komórki. Uruchomienie kaskady kaspaz wiąże się z degradacją różnych białek cytoplazmatycznych i jądrowych zarówno strukturalnych, jak i regulatorowych. Fragmentacja DNA przez endonukleazy oraz zniszczenie białek enzymatycznych, odpowiedzialnych za jego syntezę i naprawę powoduje, że proces autodestrukcji komórki staje się nieodwracalny [9]. Istnieje również możliwość indukcji apoptozy niezależnie od kaspaz, w której istotną rolę odgrywa tzw. czynnik mitochondrialny AIF (apoptosis inducing factor) oraz endonukleaza G.

Autofagia

Do programowanych mechanizmów śmierci komórki zalicza się również autofagię, chociaż proces ten jest raczej wykorzystywany przez komórki w celu przeżycia. Występuje ona w przypadku braku czynników odżywczych, niedotlenienia (hipoksja) i stresu [19]. W odróżnieniu od apoptozy, nie występuje fragmentacja DNA, lecz zwiększona degradacja białek cytoplazmatycznych i tworzenie się wakuol autofagowych. W komórkach zwierzęcych indukcja autofagii jest inicjowana przez białko beclin 1 (Atg6) związane z PI3 kinazą. Natomiast kinaza mTOR w obecności czynników wzrostowych hamuje ten proces. Procesy autofagii i apoptozy mogą przebiegać oddzielnie lub nakładać się. Białko Atg5 może indukować mitochondrialny szlak apoptozy, z kolei Bcl-2 może wiązać się z białkiem beclin 1 i hamować autofagię [41].

Nekroza

W procesie nekrozy, który jest wywołany zaburzeniami równowagi osmotycznej przez czynnik uszkadzający



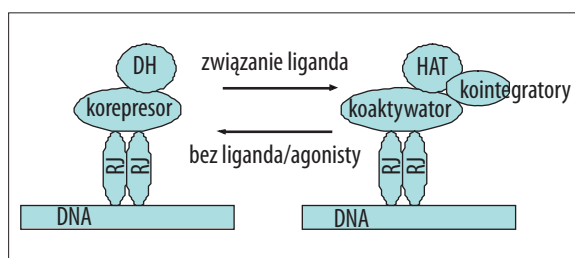
Tabela 1. Klasyfikacja receptorów jądrowych

Podobne do receptorów hormonów tyroidowych (thyroid hormone-like)	TR (thyroid hormone), RAR (retinoid acid), ROR (retinoid acid-related orphan), podobne do receptora witaminy D3: VDR, PXR, CAR, PPAR (peroxisome proliferator activated), REV-ERB (NRD1, NRD2, E75), ecdysone-inducible protein E78, podobne do receptorów ekdysonu: ECR, LXR, FXR, DHR96, NHR1, CNR14
Podobne do receptorów HNF4 (HNF4-like)	HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4), RXR, USP (retinoic acid X), TR2, TR4 (orphan nuclear), DHR78, podobne do Tailles: TLL, TLX, PNR, DSF, FAX, podobne do COUP-TF: COUP-TF, SVP, EAR2
Podobne do receptorów estrogenu (estrogen-like)	ER, ERR (estrogen-related), podobne do receptorów glukokortykoidów: GR, MR, PR, AR
Podobne do NGFIB (nerve growth factor I-B-like)	podobne do NGFIB: NGFIB, NURR NOR, HR38, CNR-8
Podobne do Fushi tarazu-F1 (Fushi tarazu-F1-like)	podobne do Fushi tarazu-F1: SF1, FTF, FTZ-F1, DHR39 i inne
Podobne do GCNF1 (germ cell nuclear factor-like)	GCNF1 (germ cell nuclear factor1)
Podobne do receptorów Knirps (Knirps-like)(OA) oraz do DAX (DAX-like) (OB)	podobne do receptorów Knirps oraz DAX, KNI (Knirps), KNIR (Knirps-related), EGON (Embryonic gonad protein), ODR-7, TRX (Trithorax), DAX, SHP (bez DBD)

jący (temperatura, promieniowanie, toksyny), napływ płynu pozakomórkowego powoduje puchnięcie komórki i organelli komórkowych, a zwłaszcza mitochondriów. Błona komórkowa zostaje rozerwana i zawartość cytoplazmatyczna (łącznie z uwalnianymi enzymami lizosomalnymi) wylewana jest do płynu pozakomórkowego, niszcząc macierz i uszkodzając sąsiednie komórki. Powstaje ognisko martwicy, do którego w ramach reakcji obronnej napływają granulocyty obojętnochłonne, limfocyty i makrofagi biorące udział w procesie zapalnym. Charakterystycznymi procesami nekrozy są uwolnienie jonów wapnia z endoplazmatycznego retikulum, aktywacja Ca-zależnych proteaz oraz uwolnienie czynników ROS z mitochondrium [17].

KLASYFIKACJA I BUDOWA RECEPTORÓW JĄDROWYCH

Receptory jądrowe tworzą grupę wewnątrzkomórkowych, strukturalnie homologicznych białek, których zadaniem jest regulacja transkrypcji genów odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie komórek. Wiele spośród nich, wymaga do aktywacji związania małowcząsteczkowych lipofilnych ligandów (np. steroid, kwas retinowy, tyroksyna), swobodnie dyfundujących do wnętrza komórki. Do receptorów jądrowych zalicza się także tzw. sieroce receptory wewnątrzkomórkowe, czyli takie receptory, dla których nie udało się w pełni udokumentować istnienia endogennego liganda [13]. Receptory jądrowe po związaniu liganda przemieszczają się z cytoplazmy do jądra komórki, gdzie działają jako czynniki transkrypcyjne zarówno w postaci monomerów, ale znacznie częściej homo- i hetero-dimerów z receptorem RXR (retinoid X receptor) [42]. Receptory jądrowe wiążą się z określoną sekwencją nukleotydomową w obszarze paromotorowym danego genu, zwaną elementem odpowiedzi (RE – response element) i w ten sposób mogą wpływać dwójako na proces transkrypcji genu, odpowiednio go pobudzając lub hamując. Aktywne receptory jądrowe mogą również pośrednio hamować transkrypcję genów przez oddziaływanie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi.



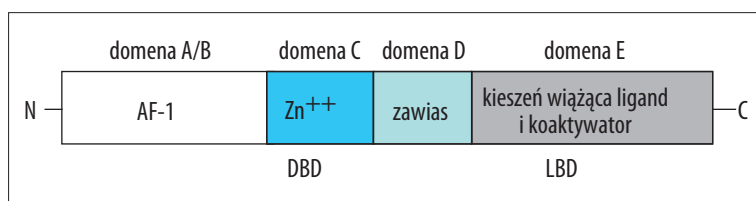
Ryc. 1. Schemat reorganizacji struktury kompleksu czynników transkrypcyjnych aktywowanych ligandem; RJ – receptor jądrowy, DH – deacetylaza histonów, HAT – acetylotransferaza histonów

Aktywność receptorów jądrowych podlega złożonemu systemowi regulacji i może być kontrolowana na wiele sposobów, m.in. przez:

- związanie małowcząsteczkowego lipofilnego liganda przez receptor lub jego partnera w postaci heterodimeru,
- fosforylację receptora.
- oddziaływanie z innymi białkami (np. innymi receptorami, czynnikami transkrypcyjnymi), które mogą być ko-represorami lub koaktywatorami.

Wszystkie wymienione mechanizmy mogą działać indywidualnie lub łącznie kontrolując aktywność receptorów jądrowych i tym samym wpływać stymulująco lub hamująco na tempo transkrypcji odpowiednich genów. Nadrodzinę receptorów jądrowych (wg NucleaRDB) dzieli się na 6 głównych rodzin przedstawionych w tabeli 1.

Na rycinie 1 przedstawiono schemat aktywacji receptora jądrowego. Wiele receptorów, lecz nie wszystkie spośród receptorów jądrowych, wiążą małe cząstki sygnałowe, które ze względu na swoje właściwości lipofilowe łatwo pokonują barierę komórkową. Chociaż mechanizm działania receptorów sierocych, heterodimerów i receptorów hormonów steroidowych jest podobny, istnieją znaczące różnice. Ligandy receptorów: witamina D₃, hormon tyroidowy, retinoidy czy prostanoidy różnią się strukturą i aktywnością. Ponadto nie



Ryc. 2. Schemat struktury receptora jądrowego: DBD – DNA binding domain, LBD – ligand binding domain

wszystkie cząstki są wydzielane endokrynnie, mogą być aktywowane w szlakach metabolicznych komórek docelowych. Inne mogą być wytwarzane w komórce docelowej, zatem nie mają cech właściwych hormonom. Ponadto, co zostało przedstawione poniżej, nie wszystkie receptory charakteryzują się odpowiedzią na hormon, co sugeruje alternatywną ścieżkę metaboliczną, niezależną od liganda [42].

Budowa receptorów jądrowych

Wszystkie receptory jądrowe są podobnie zbudowane. Zawierają trzy główne domeny: zmienny N-końcowy region (A/B box), konserwatywną domenę wiążącą DNA (DBD – DNA binding domain, C box) region zawiasowy (D box) oraz domenę wiążącą ligand (LBD – ligand binding domain, E box) (ryc. 2).

Domena A/B receptorów należy do regionów o największej zmienności. Stanowi fragment modulatorowy, zawierający subdomenę o funkcji aktywacji transkrypcji AF-1 (activation function 1) oraz może odpowiadać za oddziaływanie z komórkowo swoistymi kofaktorami. Domena wiążąca DNA jest konserwatywnym fragmentem białka, zawierającym około 60–70 aa. Odpowiada za oddziaływanie z sekwencją nukleotydów DNA. Jądrowe receptory wiążą DNA jako monomery, homodimery i heterodimery.

W postaciach heterodimerycznych najpowszechniejszym partnerem białkowym jest RXR. Sekwencja konsensusowa w promotorze rozpoznawana przez każdą z podjednostek postaci dimerycznej może występować w trzech orientacjach: odwróconej (ER – everted repeat), odwrotnej (IR – inverted repeat) oraz w postaci prostych powtórzeń (DR – direct repeat). Receptory steroidowe rozpoznają swoistą sekwencję konsensusową AGAACA w rejonie paromatorowym danego genu, zaś pozostałe rodzaje receptorów wiążą się do AGGTCA. Monomeryczne receptory jądrowe rozpoznają motyw poprzedzony sekwencją bogatą w pary A/T. Region zawiasowy łączy domeny DBD i LBD, jest ruchomy i umożliwia rotację DBD nawet o 180° i zawiera sygnał lokalizacji jądrowej [15].

W odróżnieniu od receptorów hormonów steroidowych, które wiążą elementy odpowiedzi jako homodimery, receptory kwasów retinowych i hormonów tyroidowych reprezentują klasę receptorów wiążących swoiście DNA jako heterodimery z RXR, w odpowiedzi na ligand. Ponieważ heterodimery RXR zawierają dwie różne podjednostki kompleksu, mogą wiązać niezależnie dwa ligandy [16]. W odróżnieniu od homodimerów, heterodimery asymetrycznie wiążą fragment helisy DNA, co narzuca różnice w konformacji obu podjednostek. Te różnice wpływają na oddziaływanie partnerów RXR z innymi białkami umożliwiającymi aktywację transkrypcji. Reasumując, tworzenie heterodimerów RXR zwiększa swoistość regulacji genów kontrolowanych

przez dane czynniki transkrypcyjne [16]. LBD jest domeną wielofunkcyjną. Umożliwia wiązanie ligandu, dimeryzację, oddziaływanie z białkami szoku termicznego (heat shock proteins), umożliwia aktywację transkrypcji, wiąże korepresory i zawiera sygnał lokalizacji jądrowej [58]. Dodatkowa funkcja transaktywacyjna zależy również od wysoce konserwatywnego fragmentu AF-2, umiejscowionego w C-końcowym odcinku LBD [15].

RXR i RAR (retinoid X receptor, retinoid acid receptor)

Witamina A i jej analogi nazywane retinoidami wywierają znaczący wpływ na morfogenezę, regulację procesów wzrostu i różnicowania zarówno prawidłowych, jak i złośliwych typów komórek, są także w stanie wywołać apoptozę w różnych liniach komórek nowotworowych. Liczne badania na zwierzętach poddanych działaniu czynników rakotwórczych wskazują na skuteczność retinoidów w zapobieganiu rozwojowi raka skóry, jamy ustnej, płuc, prostaty, wątroby i trzustki. Badania kliniczne dowodzą natomiast efektywności retinoidów w zapobieganiu powstawaniu nowotworów piersi i jajników. Zdolność retinoidów do regulacji procesów komórkowych *in vivo* jest związana jednak z wysokim ryzykiem występowania działań niepożądanych w postaci podrażnień skóry, toksycznego wpływu na kości i tkankę tłuszczową oraz embriotoksyczności i teratogenności. Dlatego też prowadzi się intensywne poszukiwania analogów witaminy A zdolnych do selektywnego aktywowania mechanizmów apoptozy w komórkach raka, ale pozbawionych działań niepożądanych [63].

Wykazano, że RXR i jego ligandy pełnią istotną rolę w regulacji procesu apoptozy w wielu nowotworach, m.in. nowotworze żołądka (SNU-1-gastric cancer cell lines), płuc i innych [28,32]. Zachęcające wyniki dały wstępne badania kliniczne nad skutecznością stosowania retinoidów w terapii skojarzonej z chemioterapeutykami. Poza tym, że zwiększają one skuteczność chemioterapii, przez wzbudzenie apoptozy mogą okazać się skuteczne w leczeniu nowotworów opornych na działanie konwencjonalnych leków antynowotworowych [82]. Przykładem może być połączenie kwasu 13-cis retinowego i kwasu fenylomasłowego synergistycznie wywołujących apoptozę w kilku ludzkich i szczurzych liniach komórek nowotworowych prostaty [53]. Syntetyczny analog – 4HPR (N-(4-hydroksyfenilo) retinamid) jest w stanie wywołać apoptozę w androgenozależnych i niezależnych komórkach raka prostaty oraz w innych typach złośliwych komórek nowotworowych. Kompleks 4HPR z metalami (głównie Ni) hamuje natomiast proliferację i wywołuje apoptozę komórek nowotworowych raka pęcherza moczowego [48].

Biologiczna rola retinoidów przejawia się w regulacji ekspresji genów przez oddziaływanie z dwoma różnymi ro-



dzinami receptorów: RXR i RAR (retinoid X receptor i retinoic acid receptors). Obie rodziny składają się z trzech podtypów: α , β i γ [80]. O ile RAR wiąże obie postaci *all-trans*- (ATRA) i *9-cis*-RA, RXR oddziałuje wyłącznie ze sterycznym izomerem *9-cis*-RA [26].

RXR jest jednym z najistotniejszych receptorów, ponieważ tworzy heterodimery z wieloma innymi receptorami jądrowymi (m.in. PPAR, Nur77, RAR, VDR, GR) modulując ich aktywność transkrypcyjną [82]. Mimo to, że RXR wydaje się najpowszechniejszym partnerem w heterodimerycznych postaciach receptorów jądrowych, ustalenie jego biologicznej roli pozostaje trudne. Dodatkowo, w miarę rosnących informacji opisujących oddziaływanie RXR z innymi molekułami komórkowymi, obserwuje się rosnącą liczbę pytań o istotę i funkcję takich interakcji [14]. Aktywacja lub represja transkrypcji spowodowana oddziaływaniem RXR ze swoistym elementem odpowiedzi w obrębie sekwencji nukleotydowej DNA, jest determinowana przez LBD (ligand binding domain). Wywołanie odpowiedzi wymaga interakcji LBD obu podjednostek dimeru. Delecja fragmentu w obrębie kasyety wiążącej ligand podjednostki RXR postaci heterodimerycznych skutkuje obniżeniem aktywacji transkrypcji indukowanej kwasem retinowym [61]. Usytuowanie RXR w odpowiednim kompartmentcie komórki determinuje dimeryzacja receptora, która jest zależna od związania liganda. Wykazano obecność monomerów w cytoplazmie, a w odpowiedzi na *9-cis*-RA dimer ulega przemieszczeniu do jądra. Ponieważ RXR oddziałuje z licznymi jądrowymi receptorami, uważa się, że determinuje jądrową lokalizację TR i VDR wskutek heterodimeryzacji [4].

Opisano trzy podtypy RXR: α , β i γ , przy czym każdy stanowi produkt oddzielnego genu. Do każdego podtypu należą po dwie izoformy: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ i $\gamma 2$. Zidentyfikowano wielu białkowych partnerów RXR, do których m.in. należą: TR (thyroid hormone receptor), RAR (retinoid acid receptor), VDR (vitamin D receptor), PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), LXR (liver X receptor), FXR (farnesoid X receptor), PXR (pregnane X receptor), czy CAR (constitutively activated receptor) [14]. Obecność RXR α stwierdzono w wątrobie, nerkach, nabłonku (epidermis), jelicie oraz skórze. RXR β ulega ekspresji niemal we wszystkich tkankach. RXR γ występuje w mięśniach i przysadce mózgowej [14]. Powszechnie wiadomo, że kwas *9-cis*-retinowy efektywnie rozpoznaje i silnie wiąże RXR. Jednak istnieją wątpliwości, czy jest on naturalnym ligandem receptora. Obecność *9-cis*-RA w komórkach ssaczych jest kontrowersyjna, mimo że jego występowanie stwierdzono w komórkach embrionalnych i wykazano w niektórych tkankach (np. nerek, jąder) cDNA dehydrogenazy *9-cis*-retinolu [46]. Zidentyfikowano dwa niecykliczne terpenoidy wiążące i aktywujące RXR: kwas metoprenowy (jako składnik środowiskowy) [22] oraz kwas fitynowy (metabolit cholesterolu w ludzkiej diecie) [35].

RXR pełni główną rolę w regulacji transdukcji wewnątrzkomórkowego sygnału, ponieważ powszechnie oddziałuje z wieloma białkowymi partnerami, m.in. z rodziną sierocych receptorów jądrowych Nur77 (nazywanych zamiennie receptorami tyroidowymi 3 lub NGFIB). Razem z Nur77, heterodimer ulega translokacji z jądra komórkowego do mitochondrium, gdzie oddziałując z Bcl-2 jest zaangażo-

Tabela 2. Heterodimery RXR i ich elementy odpowiedzi w sekwencji nukleotydowej DNA

RXR:RXR	DR1
RXR:Nur77, RXR:Nurr1	DR5 (RARE2 β)
RXR:VDR	DR3, DR4, DR5
RXR:RAR	DR5 (RARE2 β), DR2
RXR:PPAR (peroxisome proliferator activated receptor)	DR1
RXR:LXR (liver X receptor)	DR4
RXR:PXR (pregnane receptor)	DR3
RXR:TR	DR4

wany w indukcję apoptozy [31]. Udowodniono, że eksport z jądra do mitochondrium wymaga oddziaływania Nur77 z RXR α , a w bezpośrednim kontakcie uczestniczy domena wiążąca DNA RXR α . Sekwencja odpowiadająca za eksport receptora z jądra (NES) jest umiejscowiona w przedziale C-końcowym białka. Jednak ligandy RXR α , których związanie umożliwia homo- lub heterodimeryzację, wyciszają aktywność NES. Funkcja NES jest również wygaszona na skutek heterodimeryzacji RXR α z RAR, PPAR i VDR. Wpływ kwasu *9-cis*-retinowego na translokację heterodimeru RXR: Nur77 nie jest jednoznaczny. Dane literaturowe są sprzeczne, ukazują hamowanie translokacji z jądra na mitochondria [4] lub wzmożony eksport z jądra do mitochondrium [39] wskutek indukcji ligandem. Tworzenie postaci heterodimerycznych przez RXR z RAR lub TR zwiększa efektywność oddziaływania z DNA oraz moduluje swoistość odpowiedzi. Po związaniu liganda RXR dimeryzuje z wieloma jądrowymi receptorami, które do aktywacji funkcji wymagają oddziaływania z RXR. Dlatego RXR pełni znamienne rolę w kontroli proliferacji i metabolizmu prawidłowej komórki i działa jako główny regulator receptorów jądrowych.

Homodimery RAR rozpoznają charakterystyczny motyw PuG(G/T)TCA rozdzielony 2, 3, 4 lub 5 nukleotydami, ułożony w postaci polarnych powtórzeń DR (direct repeats). Homodimery TR wiążą preferencyjnie DR3, DR4 i DR5, a homodimery RXR oddziałują swoiście z DR1. Heterodimer RXR: RAR wiąże sekwencję w obrębie DR5, DR2, DR1, a heterodimer RXR: TR selektywnie DR4. RXR w heterodimerach oddziałujących z DR2, DR4 lub DR5 koresponduje z 5' końcem sekwencji nukleotydowej [81]. Heterodimery RXR z Nur77 i Nurr1 oraz RAR rozpoznają wspólny motyw sekwencji nukleotydowej nazywany DR5. Jednakże RXR w dimerze z RAR jest przez niego hamowany, a heterodimer z Nur77 czy Nurr1 efektywnie aktywują ligandy RXR. Stąd też RXR oscyluje w komórce, jako tzw. partner cichy bądź aktywny. Jednocześnie stanowi swoisty system sygnału, ponieważ pośredniczy w krzyżowaniu szlaków sygnałowych indukowanych retinoidami i czynnikami wzrostu [51] (tabela 2).

Heterodimery RXR dzieli się na przyzwalające (permissive) i nieprzyzwalające (nonpermissive). Przyzwalające należą do niezależnie aktywowanych zarówno przez kwas

9-*cis*-retinowy, jak i ligand partnera i/lub przez ich działanie synergistyczne. W dimerach nieprzyzwalających zostaje wyciszona aktywność transkrypcyjna indukowana ligandem RXR. Heterodimeryzacja VDR i innych receptorów z RXR wzmacnia jego wiązanie do DNA i aktywność transkrypcyjną. Heterodimer RXR: VDR należy do nieprzyzwalających, choć udowodniono, że kwas 9-*cis*-retinowy ułatwia rekrutację koaktywatorów w odpowiedzi na stymulację witaminą D3 [21]. Zarówno kwas 9-*cis*-retinowy, jak i witamina D mają zdolność dołączania się do kompleksu RXR: VDR, który z kolei rozpoznaje VDRE. Jednak o trwałości heterodimeru decyduje kolejność wiązania ligandów. Jeżeli kwas 9-*cis*-retinowy dołącza się do kompleksu ze związaną witaminą D, dimer jest nietrwały i rozpada się, w konsekwencji powiększając pulę homodimerów RXR. Związanie witaminy D z VDR przez utworzenie dimeru, a następnie wiązanie RXR skutkuje trwałym heterodimetem [68].

Nieprawidłowości w ekspresji i funkcjonowaniu retinoidów i ich receptorów powodują rozwój wielu nowotworów. Udowodniono, że P-RXR α , postać fosforylowana RXR α jest oporna na ubikwitynację i proteosomalną degradację zarówno w linii komórkowej jak i tkance HCC (hepatocellular carcinoma). Dodatkowo, P-RXR α traci zdolność transaktywacyjną i możliwość dimeryzacji zarówno z RXR jak i RAR β [80].

Heterodimer RXR: RAR funkcjonuje zarówno jako aktywator jak i represor transkrypcji. Aktywność wyciszająca przejawia się wówczas, gdy dimer oddziałuje z korepresorami przy braku ligandu. Związanie agonistów (holoreceptorów) rozpoczyna mechanizm, w którym C-końcowa 12 helisa w LBD umożliwia utworzenie tzw. holokonformacji, sprzyjającej dołączaniu się koaktywatorów i utrudniającej wiązanie korepresorów. Koaktywatory transkrypcyjne, np. z rodziny SRC-1 (p-160) lub kompleks TRAP, są zaangażowane w przekształcenie (remodeling) chromatyny lub interakcje z czynnikami transkrypcyjnymi, oddziałując z receptorami jądrowymi krótkim helikalnym motywem LXXLL (tzw. NR box), z prezentowanymi w postaci licznych powtórzeń domenach NID w receptorach jądrowych [54].

ROR (retinoid-related orphan receptor)

Receptory ROR spełniają wiele ról w procesach wzrostu komórki, jej różnicowania i apoptozy. Dwie spośród podrodzin receptorów sierocych: ROR oraz Nur77 odgrywają istotną rolę w różnicowaniu i prawidłowym funkcjonowaniu systemu immunologicznego [12].

Jądrowe receptory sieroce ROR stanowią podrodzinę trzech strukturalnie podobnych podtypów: ROR α (NR1R1), ROR β (NR1F2), ROR γ (NR1F3). Zawierają charakterystyczne dla receptorów jądrowych elementy budowy: konserwatywną domenę wiążącą DNA (DBD) umiejscowioną na N-końcu i mniej konserwatywną domenę wiążącą ligand (LBD). DBD jest wydłużona o około 66aa, spośród których większość jest wspólna dla wszystkich izoform. LBD wykazuje średnio 50% identyczności w sekwencji aminokwasowej, stąd wydaje się, że wszystkie trzy izoformy ROR oddziałują z tym samym fragmentem DNA, lecz z innym ligandem [12]. Każdy z receptorów ROR w postaci monomeru wiąże się z sekwencją nukleotydów (ROREs) w postaci

konsensusowego motywu AGGTCA poprzedzonego regionem bogatym w pary A/T [34]. Izoforma alfa wykazuje dużą homologię z receptorem retinoidu RAR, co ułatwiło jej odkrycie. ROR α występuje powszechnie w organizmie, m.in. w mózdzku, skórze, jądrach i obwodowych leukocytach. W obrębie układu immunologicznego ROR α ulega ekspresji zarówno w komórkach limfoidalnych, jak i mieloidalnych. Scharakteryzowano 4 izoformy ROR α , przy czym obecność wszystkich 4 wykazano u ludzi, a ROR α 1 i ROR α 4 u myszy [12]. Wszystkie izoformy rozpoznają sekwencję AGGTCA poprzedzoną 6 nukleotydami bogatymi w A/T lub wiążą konsensus w orientacji DR (direct repeats) rozdzielony 2 nukleotydami (DR2). Miejsca wiązania ROR α odnaleziono wśród regionów regulatorowych wielu genów, jednakże dokładny mechanizm regulacji transkrypcji przez ROR α opisano tylko dla kilku genów: *N-myc*, prosaponiny, ApoA-1, PCP2 (Purkinje cell protein 2) oraz Rev-erb [12].

W 2002 r. określono strukturę krystaliczną LBD z ROR α z dokładnością do 1,63 Å, ukazując cholesterol, jako ligand w hydrofobowej kieszeni receptora. Dodatkowo wykazano, że poziom wewnątrzkomórkowego cholesterolu moduluje aktywność ROR α , co może sugerować jego funkcję regulującą homeostazę cholesterolową [29]. Udowodniono, że myszy z podwójnym nokautem genu ROR α -/- charakteryzują się fenotypem ataksji [70].

Wyróżnia się dwie izoformy ROR β : ROR β 1 i ROR β 2 [24]. W odróżnieniu od pozostałych dwu izoform, ekspresję ROR β wykazano wyłącznie w komórkach ośrodkowego układu nerwowego (CNS – central nervous system) [12]. Retinoidy regulują ekspresję genów poprzez oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi RAR i RXR. Obecnie uważa się, że kwas all-trans retinowy (ATRA) należy do ligandów wiążących ROR β . Zarówno ATRA, jak i jego pochodne hamują aktywność transkrypcyjną receptora β , lecz nie α [65].

Gen *ROR γ* generuje dwie izoformy wskutek transkrypcji z udziałem alternatywnych promotorów [70] i jest powszechnie ekspresjonowany w grasicy, nerkach, wątrobie, mięśniach, brązowej tkance tłuszczowej, lecz nie w białej [12]. Jego masa cząsteczkowa oscyluje wokół 58 kDa [24]. Zidentyfikowano dwie grasicze izoformy γ : ROR γ 1 oraz ROR γ 2 (ROR γ T). ROR γ 2 różni się od ROR γ 1 utratą fragmentu N-końcowego występującego zawsze w ROR γ 1. O ile izoforma γ 1 ulega ekspresji w wielu tkankach, obecność γ 2 wykazano jedynie w dwóch populacjach komórek: tymocytów DP (CD4⁺8⁺) i induktorów komórek tkanki limfoidalnej (LTi) [12]. Ponieważ występowanie ROR γ 2 jest ściśle ograniczone, może to świadczyć o jego roli jako regulatora w tych komórkach. Nadekspresja ROR w hybridowych komórkach T skutkuje zahamowaniem apoptozy indukowanej aktywacją receptora TCR, poprzez represję indukcji ligandu Fas (FasL) [34]. Różnicowanie tkanki limfoidalnej, węzłów chłonnych i kępek Peyera zależy od ROR γ 2. Ten czynnik transkrypcyjny jest konieczny do rozwoju induktora komórek i komórek podobnych do komórek tkanki limfoidalnej (LTi) [27]. Ekspresja ROR γ 2 w różnicujących tymocytach jest ściśle regulowana. Tymocyty DP ekspresjonują mRNA ROR γ 2 na wysokim poziomie, podczas gdy dojrzałe tymocyty SP CD4⁺ lub CD8⁺ nie wykazują ekspresji receptora. Precyzyjny mechanizm kontroli różnicowania tymocytów z udziałem ROR γ 2 nie jest dotąd



wyjaśniony. Wykazano, że indukowana ekspresja izoformy $\gamma 2$ w dojrzałych tymocytach ujemnie koreluje z ekspresją powierzchniowego TCR, hamuje proliferację dojrzałych i negatywnych tymocytów oraz hamuje wytwarzanie IL-2 i aktywację szlaku sygnałowego z udziałem c-Rel w komórkach dojrzałych [25]. Ekspresja ROR $\gamma 2$ w hybrydowych komórkach T hamuje wytwarzanie IL-2 oraz szlak indukowany ligandem FasL, jednak nie wykazuje hamowania względem szlaku CD69. Jak dotąd nie rozpoznano naturalnego liganda receptora ROR γ [65].

GR (glucocorticoid receptor)

Endogenne glukokortykoidy (Gc) to hormony wydzielane przez korę nadnercza. Pośredniczą w wielu procesach fizjologicznych: metabolizmie, odpowiedzi immunologicznej czy elektrolitowej homeostazie. Ze względu na tę wielkość funkcji, syntetyczne Gc znajdują zastosowanie, jako leki przeciwoleku schorzeniom, m.in.: stanom zapalnym, chorobom autoagresywnym, chorobom nowotworowym, obrzękowi mózgu i odrzucaniu przeszczepów.

Mechanizm działania Gc w ustroju nie jest do końca zrozumiały. Trudności w wyjaśnieniu ich biologicznej roli wynikają z odpowiedzi tkankowości, przy powszechnym występowaniu Gc. Poza odpowiedzią tkankowości istną obserwuje się zróżnicowanie odpowiedzi wynikające ze stopnia zróżnicowania komórki oraz występującej ewentualnej patologii [40].

Glukokortykoidy odgrywają szczególnie istotną rolę w walce z nowotworami hematologicznymi. Są inhibitorami systemu odpornościowego przez wpływ na regulację cytokin, a także wywołują programowaną śmierć niedojrzałych tymocytów. Gc prowadzą do apoptozy na skutek aktywowania receptorów glukokortykoidów (GR), regulując kompleks transkrypcyjny we wzajemnie oddziałującej sieci odpowiedzi genowych, co poprzedza aktywację enzymów apoptotycznych [47].

Apoptoza tymocytów indukowana glukokortykoidami jest jednym z lepiej poznanych *in vivo* modeli hormonalnej indukcji programowanej śmierci. Gc powodują apoptozę różnicujących się tymocytów, a zwłaszcza podwójnie pozytywnych DP CD4⁺ CD8⁺, które stanowią około 80% populacji tymocytów [78]. Dojrzałe pojedynczo pozytywne SP CD4⁺ CD8⁺ lub CD4⁺ CD8⁻ są odporne na działanie Gc [8]. Zaobserwowano, że indukcja apoptozy odbywa się przez aktywację tzw. „genów śmierci” czy „genów lizy”. Jednocześnie wykazuje się rolę GR, jako represora genów antyapoptotycznych (prosurvival), np. genów białek Bcl-2, Bcl-x_L, IAP. Wykazano także, że Gc prowadzą do aktywacji enzymów efektorowych apoptozy, konstytutywnie ekspresjonowanych w komórce [7]. Stwierdza się obecność wolnych fragmentów DNA w następstwie apoptozy tymocytów wywołanej przez Gc [18].

Receptory GR kodowane są przez pojedynczy gen, który zawiera 9 eksonów. Ekson pierwszy i dziewiąty uczestniczy w alternatywnym splicingu. Alternatywne składowanie jest przyczyną występowania u ludzi dwóch izoform receptora GR: GR α i GR β . Izoforma GR α składa się z 777 aminokwasów, natomiast izoforma GR β jest krótsza od strony C-końcowej i liczy 742 aminokwasy. Alternatywna inicjacja

translacji jest przyczyną zróżnicowania izoform receptora GR na formy: A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, D₃. Tylko izoforma GR α ma zdolność wiązania hormonu. Ekspresja izoformy GR β jest tkankowości. Natomiast receptor GR α jest obecny niemal we wszystkich komórkach organizmu, również w komórkach układu immunologicznego [40]. W nieobecności glikokortykosteroidów receptor GR tworzy w cytoplazmie kompleks z białkiem szoku termicznego Hsp90, z którym reaguje bezpośrednio i jedną cząsteczką białka pomocniczego. Funkcje białka pomocniczego w kompleksie receptora GR pełnią immunofiliny FKBP51, FKBP52, Cyp40 oraz białkowa fosfataza serynowo-treoninowa PP5. W tej samej tkance lub komórce możliwa jest obecność czterech różnych form kompleksów GR. Jak dotąd nie wiadomo, czy ta różnorodność kompleksów GR ma znaczenie biologiczne [10]. Połączenie się glikokortykosteroidu z cytoplazmatycznym receptorem GR powoduje aktywację tego ostatniego i przemieszczenie do jądra komórkowego, gdzie funkcjonuje jako regulator transkrypcji licznych genów. Do genów, charakterystycznych dla tymocytów, których regulacja zależy od Gc, należą m.in.: BCL2L11 (apoptosis facilitator, Bim), DSCR1 (Down syndrome critical region gene 1), DDIT4 (DNA-damage – inducible transcript 4, RTP801, DEDD1, dig2), FKBP5 (FK506 binding protein 5), I κ B α (nuclear factor κ B inhibitor α). Wszystkie są zaangażowane w apoptozę tymocytów [47].

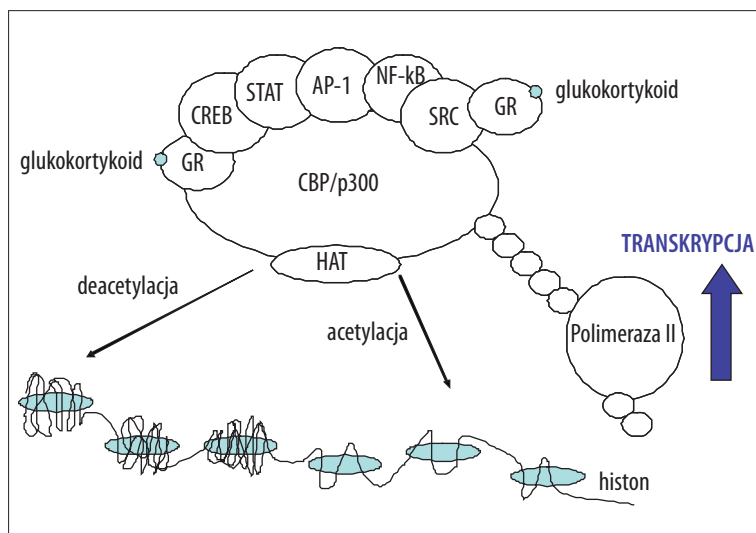
Receptory GR regulują transkrypcję genów poprzez cztery zasadnicze mechanizmy:

- bezpośrednie aktywowanie transkrypcji genów przez oddziaływanie z tzw. elementem odpowiedzi na glikokortykosteroidy – GRE (glucocorticoid response element) znajdującym się w obrębie sekwencji promotora [1],
- bezpośrednie hamowanie aktywności genów przez tzw. negatywne GRE (nGRE),
- pośrednie hamowanie aktywności genów przez oddziaływanie białko-białko (cross-talk) [43],
- wpływ na reorganizację struktury chromatyny przez: oddziaływanie z białkowym kompleksem remodelującym – SWI/SNF mającym aktywność ATP-azy zależnej od DNA, z białkiem CBP mającym aktywność acetylotransferazy histonu (HAT) powodującej rozluźnienie struktury chromatyny, z korepresorami o aktywności deacetylazy (HDAC) [7].

Oprócz funkcji immunosupresora Gc odpowiadają za wyciszenie genu propiomelanokortyny (POMC), który koduje prekursor adrenokortykotropiny (ACTH), główny stymulator nadnerczowej syntezy Gc. W odpowiedzi na CRH (corticotropin-releasing hormone), Nur77 aktywuje ekspresję POMC. Gc działają antagonistycznie do Nur77 na dwóch płaszczyznach: osłabia indukcję mRNA Nur77 przez CRH oraz działa przeciwnie do aktywacji transkrypcji zależnej od Nur77. Represja wywołana przez Gc jest konsekwencją antagonizmu z Nur77 w elemencie rozpoznawanym NurRE w genie POMC [52].

Receptory aktywowane proliferatorami peroksymów (PPAR)

Receptory PPAR są zaangażowane w przemianę i transport lipidów oraz równowagę glukozową. Ekspresja genów PPAR jest regulowana przez glukokortykosteroidy oraz hormony płciowe. Naturalnymi ligandami PPAR są kwa-



Ryc. 3. Schemat aktywacji transkrypcji indukowanej glukokortykoidem (objaśnienie w tekście)

sy tłuszczowe, zwłaszcza nienasycone. Receptory PPAR występują w trzech izoformach: alfa, beta/delta i gamma. PPAR α występuje głównie w wątrobie, nerkach i sercu. Wiąże fibraty-leki stosowane w leczeniu hiperlipidemii. PPAR γ występuje w śledzionie, jelicie, nadnerczach, tkance tłuszczowej i jest odpowiedzialny za tworzenie się adipocytów. Ligandami tego receptora są również prostaglandyna J2 i tiazolidenodiony – związki stosowane w leczeniu cukrzycy typu 2 [84]. Przeciwwzapalne działanie PPAR γ polega na blokowaniu czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [11]. Sugeruje się, że pokonanie insulinooporności za pomocą agonistów PPAR γ częściowo jest związane z zahamowaniem aktywności NF- κ B [59]. Ligandy PPAR γ opisano także jako czynniki hamujące wzrost, promujące różnicowanie i indukujące apoptozę komórek nowotworowych. Dane literaturowe wskazują, że receptory PPAR, zwłaszcza izoforma gamma, mogą być celem terapii przeciwnowotworowej w raku jelita, piersi, prostaty oraz nowotworów układu limfatycznego [57]. Tiazolidenodiony indukowały kaspazozależną apoptozę komórek ludzkich białaczek HL-60 i Jurkat, natomiast prostaglandyna J2 działała niezależnie od PPAR γ poprzez uwolnienie czynników ROS [6]. PPAR γ był zaangażowany w apoptozę komórek raka jelita indukowaną kwasem masłowym [62]. Antyproliferacyjne właściwości mają również antagoniści PPAR γ , co pokazano na wielu liniach nowotworowych [2]. Opisano synergistyczne działanie agonistów PPAR γ i retinoidów na indukcję apoptozy wielu linii nowotworowych. Połączenie troglitazonu lub ciglitazonu z kwasem 9-cis retinowym efektywnie hamowało proliferację czterech ludzkich linii osteosarcoma [23]. Kwas 9-cis retinowy zwiększał apoptotyczne działanie ciglitazonu na komórki raka okrężnicy HT29 [79]. Podobnie działała również kombinacja rosiglitazonu i syntetycznego retinoidu – beksarotenu [5]. Kombinacja agonistów PPAR γ i agonistów RXR lub RAR indukowała różnicowanie i apoptozę wielu linii komórkowych białaczek i chłoniaków [33]. Antyproliferacyjne działanie ligandów PPAR γ polega na indukcji inhibitorów kinaz CDK (p18, p21, p27), obniżeniu ekspresji cykliny D1 oraz podwyższeniu ekspresji fosfatazy PTEN, inaktywującej szlak kinaz PI3K/Akt. Indukcja apoptozy jest związana z obniżeniem stężenia białek antyapoptotycznych Bcl-2, FLIP i surwiwiny oraz podwyższeniem białek proapoptotycz-

nych Bak, Bax, Bad i TRAIL. Ligandy PPAR γ wpływają również na proces przerzutowania i angiogenezy poprzez regulację ekspresji białek adhezyjnych (integrzyn, E-kateryny), metaloproteinaz czy receptora VEGF [71].

Receptor sierocy Nur77

Receptory jądrowe z rodziny Nur77 (Nur77, Nurr1, Nor-1) nie mają odpowiedniego liganda i należą do tzw. receptorów sierocych. Ich ekspresja w komórce może być indukowana surowicą płodową, estrami forbolu oraz jonoforami wapnia. Biorą one udział w procesach apoptozy tymocytów i neuronów, różnicowania komórek nerwowych, wytwarzaniu hormonów steroidowych [44]. Ekspresja i funkcja białek Nur77 jest regulowana na poziomie transkrypcji genu i fosforylacji białka. Białka te mogą tworzyć homodimery lub heterodimery z receptorami glukokortykosteroidów (GR) oraz retinoidów (RXR, RAR), co powoduje zmianę ich funkcji. W tymocytach zarówno ATRA, jak i 9-cRA hamują proces apoptozy poprzez oddziaływanie na Nur77 [30].

Fosforylacja Nur77 na Ser350 przez kinazę Akt lub Rsk2 prowadzi do cytoplazmatycznej lokalizacji i zahamowania jego aktywności transkrypcyjnej [32]. W komórkach PC12 traktowanych NGF, Nur77 jest fosforylowany przez kinazę MAP na Ser105, co powoduje jego eksport do cytosolu razem z receptorem RXR obniżając aktywność heterodimeru RXR/RAR [31].

Nur77 i Nor-1 są ważnymi białkami w procesie selekcji negatywnej tymocytów [83]. Nadekspresja nieaktywnego mutantu Nur77 hamowała proces selekcji negatywnej w grasicy [76]. Z kolei u myszy transgenicznym z konstytutywną ekspresją białka Nur77 grasicą była szczątkowa w związku z masową apoptozą tymocytów [72]. Apoptoza tymocytów może być również wywoływana przez glukokortykosteroidy wydzielane przez komórki nabłonkowe grasicy. Nur77 działa jednak hamująco na sygnał stymulowany glukokortykosteroidami poprzez utworzenie transkrypcyjnie nieaktywnego heterodimeru z receptorami GR [52]. Nur77, oprócz swojej aktywności transkrypcyjnej, może indukować apoptozę przez przyłączenie się do błony mitochondrium powodując uwolnienie do cytosolu cytochromu c [36].

W naszych badaniach wykazaliśmy, iż w prawidłowych tymocytach jonomycyna indukuje ekspresję i translokację białka Nur77 do mitochondrium, a to powoduje uwolnienie cytochromu c do cytosolu i apoptozę [64]. Natomiast w komórkach chłoniaka VIII/d, pochodzących z prawidłowych tymocytów, mimo obecności Nur77 na mitochondriach cytochrom c nie jest uwalniany i nie występuje apoptoza komórek. Wrażliwość komórek VIII/d na apoptozę indukowaną szlakiem wapniowym można przywrócić przez dodatkowe traktowanie immunosupresorem FK506 [56].

Białka Nur77 oraz Nor-1 są zaangażowane również w apoptozę komórek nowotworowych. Ekspresję tych białek stwierdzano w traktowanych różnymi związkami chemicznymi, komórkach ludzkiego raka płuc [37], ludzkiego raka prostaty [36], ludzkiego raka okrężnicy [74], żołądka [77] oraz piersi [49]. Niedawno opisano nową funkcję RXR α . Receptor ten okazał się nośnikiem transportującym Nur77 z jądra do mitochondrium, w komórkach raka prostaty, płuc i żołądka, gdzie następowała inicjacja procesu apoptozy [4,39].

Receptor witaminy D3-VDR

Główną funkcją VDR jest ekspresja białek odpowiedzialnych za homeostazę wapniowo-fosforanową. Jednak w ostatnim okresie coraz więcej doniesień poświęconych jest wpływie kalcytriolu i jego analogów na różnicowanie się i proliferację komórek. Jako monomer blokuje on działanie czynników transkrypcyjnych NFAT i AP-1 [69]. Po związaniu swojego liganda (kalcytriol) i utworzeniu heterodimeru z RXR aktywuje geny docelowe. VDR występuje w wielu komórkach nowotworowych, w tym chłoniaków i białaczek, co próbuje się wykorzystać w terapii nowotworowej. Zastosowanie kalcytriolu w zwalczaniu chorób

nowotworowych wynika z jego zdolności do zmniejszania tempa proliferacji komórek oraz wprowadzania ich na drogę ostatecznego różnicowania. Potwierdziły to badania na wielu liniach komórek nowotworowych [50].

Skuteczność terapeutyczną kalcytriolu uzyskano w przypadku raka piersi (zarówno ER+ jak i ER-). Okazał się on także negatywnym regulatorem wzrostu raka sutka (MCF-7), indukując powstanie morfologicznych i biochemicznych markerów apoptozy [73]. Korzystne efekty terapeutyczne można uzyskać przy zastosowaniu ponadfizjologicznego stężenia kalcytriolu, co wiąże się z występowaniem niekorzystnego efektu wapniowego (hiperkalcemii, zwapnień narządów mięsnych itd.). Stało się to bodźcem do syntezy analogów, które przy zachowaniu właściwości antyproliferacyjnych nie miałyby tak dużej aktywności kalcemicznej. Niektóre z analogów (np. Calcipotriol i Tacalcitol) w mniejszym stopniu niż kalcytriol wpływają na gospodarkę wapniową organizmu i są stosowane terapeutycznie w leczeniu łuszczyca [50]. Badania przeciwnowotworowej aktywności kalcytriolu i jego analogów wskazują na możliwość zastosowania tych związków w połączeniu z innymi lekami przeciwnowotworowymi, głównie z cytostatykami i retinoidami [45]. Łączenie analogów z cytostatykami pozwala na obniżenie dawki cytostatyku przy zachowaniu aktywności leku, co znacznie obniża ryzyko niepożądanych skutków chemioterapii. Mechanizm wspomaganego działania w terapii skojarzonej nie został jednak wyjaśniony.

PODZIĘKOWANIE

Autorzy dziękują panu profesorowi Leonowi Strządale za cenne uwagi.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Barnes P.J.: Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanism. *Clin. Sci.*, 1998; 94: 557–572
- [2] Burton J.D., Castillo M.E., Goldenberg D.M., Blumenthal R.D.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma antagonists exhibit potent antiproliferative effects versus many hematopoietic and epithelial cancer cell lines. *Anticancer Drugs*, 2007; 18: 525–534
- [3] Budd R.C.: Activation-induced cell death. *Curr. Opin. Immunol.*, 2001; 13: 356–362
- [4] Cao X., Liu W., Lin F., Kolluri S.K., Lin B., Han Y.H., Dawson M.I., Zhang X.K.: Retinoid X receptor regulates Nur77 (Thyroid hormone receptor 3)-dependent apoptosis by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 9705–9725
- [5] Cesario R.M., Stone J., Yen W., Bissonnette R.P., Lamph W.W.: Differentiation and growth inhibition mediated via the RXR: PPARgamma heterodimer in colon cancer. *Cancer Lett.*, 2006; 240: 225–233
- [6] Chen Y.C., Shen S.C., Tsai S.H.: Prostaglandin D2 and J2 induce apoptosis in human leukemia cells via activation of the caspase 3 cascade and production of reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005; 1743: 291–304
- [7] Chung H., Choi Y.I., Ko M.G., Seong R.H.: Rescuing developing thymocytes from death by neglect. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2002; 35: 7–18
- [8] Cohen J.J., Duke R.C.: Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.*, 1984; 132: 38–42
- [9] Creagh E.M., Martin S.J.: Caspases: cellular demolition expert. *Biochem. Soc. Trans.*, 2001; 29: 696–702
- [10] Davies T.H., Ning Y.M., Sanchez E.R.: A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 4597–4600
- [11] Daynes R.A., Jones D.C.: Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002; 2: 748–759
- [12] Dzhagalov I., Zhang N., He Y.W.: The roles of orphan nuclear receptors in the development and function of the immune system. *Cell. Mol. Immunol.*, 2004; 1: 401–407
- [13] Enmark E., Gustafsson J.A.: Orphan nuclear receptors—the first eight years. *Mol. Endocrinol.*, 1996; 10: 1293–1307
- [14] Germain P., Chambon P., Eichele G., Gronemeyer H.: International union of pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol. Rev.*, 2006; 58: 760–772
- [15] Giguere V.: Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.*, 1999; 20: 689–725
- [16] Glass C.K.: Some new twists in the regulation of gene expression by thyroid hormone and retinoid acid receptors. *J. Endocrinol.*, 1996; 150: 349–357
- [17] Golstein P., Kroemer G.: Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.*, 2007; 32: 37–41
- [18] Goya R.G., Console G.M., Spinelli O.M.: Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoid organs is associated with a delayed increase in circulating deoxyribonucleic acid. *Apoptosis*, 2003; 8: 171–177
- [19] Gozacik D., Kimchi A.: Autophagy and cell death. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 2007; 78: 217–245
- [20] Grądzka I.: Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Post. Bioch.*, 2000; 46: 2–16
- [21] Gronemeyer H., Gustafsson J.A., Laudet V.: Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2004; 3: 950–964
- [22] Harmon M.A., Boehm M.F., Heyman R.A., Mangelsdorf D.J.: Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect regulator methoprene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 6157–6160

- [23] Haydon R.C., Zhou L., Feng T., Breyer B., Cheng H., He T.C.: Nuclear receptor agonist as potential differentiation therapy agents for human osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 1288–1294
- [24] He Y.W.: Orphan nuclear receptors in T lymphocyte development. *J. Leukoc. Biol.*, 2002; 72: 440–446
- [25] He Y.W.: The role of orphan nuclear receptor in thymocyte differentiation and lymphoid organ development. *Immunol. Res.*, 2000; 22: 71–82
- [26] Heyman R.A., Mangelsdorf D.J., Dyck J.A., Stein R.B., Eichele G., Evans R.M., Thaller C.: 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell*, 1992; 68: 397–406
- [27] Ivanov I.I., McKenzie B.S., Zhou L., Tadokoro C.E., Lepelley A., Lafaille J.J., Cua D.J., Littman D.R.: The orphan nuclear receptor ROR α t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 2006; 126: 1121–1133
- [28] Jeong J.H., Park J.S., Moon B., Kim M.C., Lee S., Yoo Y.H.: Orphan nuclear receptor Nur77 translocates to mitochondria in the early phase of apoptosis induced by synthetic chenodeoxycholic acid derivatives in human stomach cancer cell line SNU-1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2003; 1010: 171–177
- [29] Kallen J.A., Schlaeppi J.M., Bitsch F., Geisse S., Geiser M., Delhon I., Fournier B.: X-ray structure of the hROR α LBD at 1.63 \AA : structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is natural ligand of ROR α . *Structure*, 2002; 10: 1697–1707
- [30] Kang H.J., Song M.J., Choung S.Y., Kim S.J., Le M.O.: Transcriptional induction of Nur77 by indomethacin that results in apoptosis of colon cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 2000; 23: 815–819
- [31] Katagiri Y., Takeda K., Yu Z.X., Ferrans V.J., Ozato K., Guroff G.: Modulation of retinoid signaling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat. Cell Biol.*, 2000; 2: 435–440
- [32] Kolluri S.K., Bruey-Sedano N., Cao X., Lin B., Lin F., Han Y.H., Dawson M.I., Zhang X.K.: Mitogenic effect of orphan receptor TR3 and its regulation by MEKK1 in lung cancer cells. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 8651–8667
- [33] Konoplewa M., Elstner E., McQueen T.J., Tsao T., Sudarikov A., Hu W., Schober W.D., Wang R.Y., Chism D., Kornblau S.M., Younes A., Collins S.J., Koeffler H.P., Andreeff M.: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor ligands are potent inducers of differentiation and apoptosis in leukemias. *Mol. Cancer Ther.*, 2004; 3: 1249–1262
- [34] Kurebayashi S., Ueda E., Sakaue M., Patel D.D., Medvedev A., Zhang F., Jetten A.M.: Retinoid-related orphan receptor γ (ROR γ) is essential for lymphoid organogenesis and control apoptosis during thymopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 10132–10137
- [35] Lemotte P.K., Keidel S., Apfel C.M.: Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand. *Eur. J. Biochem.*, 1996; 236: 328–333
- [36] Li H., Kolluri S.K., Gu J., Dawson M.I., Cao X., Hobbs P.D., Lin B., Chen G., Lu J., Lin F., Xie Z., Fontana J.A., Reed J.C., Zhang X.: Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science*, 2000; 289: 1159–1164
- [37] Li Y., Lin B., Agadir A., Liu R., Dawson M.I., Reed J.C., Fontana J.A., Bost F., Hobbs P.D., Zheng Y., Chen G.Q., Shroot B., Mercola D., Zhang X.K.: Molecular determinants of AHPN (CD37)-induced growth arrest and apoptosis in human lung cancer cell lines. *Mol. Cell. Biol.*, 1998; 18: 4719–4731
- [38] Lin B., Kolluri S.K., Lin F., Liu W., Han Y.H., Cao X., Dawson M.I., Reed J.C., Zhang X.K.: Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell*, 2004; 116: 527–540
- [39] Lin X.F., Zhao B.X., Chen H.Z., Ye X.F., Yang C.Y., Zhou H.Y., Zhang M.Q., Lin S.C., Wu Q.: RXR α acts as a carrier for TR3 nuclear export in a 9-cis retinoic acid-dependent manner in gastric cancer cells. *J. Cell Sci.*, 2004; 117: 5609–5621
- [40] Lu N.Z., Cidlowski J.A.: Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell. Biol.*, 2006; 16: 301–307
- [41] Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G.: Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2007; 8: 741–752
- [42] Mangelsdorf D.J., Evans R.M.: The RXR heterodimer and orphan receptors. *Cell*, 1995; 83: 841–850
- [43] Martens C., Bilodeau S., Maira M., Gauthier Y., Drouin J.: Protein-protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoids receptor. *Mol. Endocrinol.*, 2005; 19: 885–897
- [44] Matuszyk J., Strzadala L.: Regulacja ekspresji i funkcji receptorów jądrowych rodziny Nur77 i ich udział w kontrolnych punktach szlaków sygnałowych prowadzących do apoptozy, różnicowania i produkcji hormonów steroidowych. *Post. Biol. Kom.*, 2002; 29: 61–80
- [45] Mehta R.G., Mehta R.R.: Vitamin D and cancer. *J. Nutr. Biochem.*, 2002; 13: 252–264
- [46] Mertz J.R., Shang E., Piantadosi R., Wei S., Wolgemuth D.J., Blaner W.S.: Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-cis-retinol oxidation. A possible role in 9-cis-retinoic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 11744–11749
- [47] Miller A. L., Komak S., Webb M.S., Leiter E.H., Thompson E.B.: Gene expression profiling of leukemic cells and primary thymocytes predicts a signature for apoptotic sensitivity to glucocorticoids. *Cancer Cell Int.*, 2007; 7: 18
- [48] Nagy L., Thomazy V.A., Heyman R.A., Davies P.J.: Retinoid-induced apoptosis in normal and neoplastic tissues. *Cell Death Differ.*, 1998; 5: 11–19
- [49] Ohkubo T., Ohkura N., Maruyama K., Sasaki K., Nagasaki K., Hanzawa H., Tsukada T., Yamaguchi K.: Early induction of the orphan nuclear receptor NOR-1 during cell death of the human breast cancer cell line MCF-7. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2000; 162: 151–156
- [50] Pełczyńska M., Jaroszewicz I., Świtalska M., Opolski A.: Właściwości biologiczne kalcytriolu i jego nowych analogów – potencjalne zastosowania terapeutyczne. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 129–139
- [51] Perlmann T., Jansson L.: A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.*, 1995; 9: 769–782
- [52] Philips A., Maira M., Mullick A., Chamberland M., Lesage S., Hugo P., Drouin J.: Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 1997; 17: 5952–5959
- [53] Pili R., Kruszewski M.P., Hager B.W., Lantz J., Carducci M.A.: Combination of phenylbutyrate and 13-cis retinoic acid inhibits prostate tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.*, 2001; 61: 1477–1485
- [54] Pogenberg V., Guichou J.F., Vivat-Hannah V., Kammerer S., Perez E., Germain P., de Lera A.R., Gronemeyer H., Royer C.A., Bourguet W.: Characterization of the interaction between retinoid acid receptor/retinoid X receptor (RAR/RXR) heterodimers and transcriptional coactivators through structural and fluorescence anisotropy studies. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 1625–1633
- [55] Quagliano D., Ronchetti I.P.: Cell death in the rat thymus: a minireview. *Apoptosis*, 2001; 6: 389–401
- [56] Rapak A., Stasik I., Ziolo E., Strzadala L.: Apoptosis of lymphoma cells is abolished due to blockade of cytochrome c release despite Nur77 mitochondrial targeting. *Apoptosis*, 2007; 12: 1873–1878
- [57] Roberts-Thomson S.J.: Peroxisome proliferator-activated receptors in tumorigenesis: targets of tumor promotion and treatment. *Immunol. Cell. Biol.*, 2000; 78: 436–441
- [58] Robinson-Rechavi M., Escrivá Garcia E., Laudet V.: The nuclear receptor superfamily. *J. Cell Sci.*, 2003; 116: 585–586
- [59] Ruan H., Pownall H.J., Lodish H.F.: Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor- α -induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF- κ B. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 28181–28192
- [60] Rupniewska Z., Bojarska-Junak A.: Apoptoza: Przepuszczalność błony mitochondrialnej i rola peptona przez białka z rodziny Bcl-2. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 538–546
- [61] Schulman I.G., Juguilon H., Evans R.M.: Activation and repression by nuclear hormone receptors: hormone modulates an equilibrium between active and repressive states. *Mol. Cell. Biol.*, 1996; 16: 3807–3813
- [62] Schwab M., Reynders V., Ulrich S., Zahn N., Stein J., Schroder O.: PPAR γ is a key target of butyrate-induced caspase-3 activation in the colorectal cancer cell line Caco-2. *Apoptosis*, 2006; 11: 1801–1811
- [63] Simoni D., Rondanin R.: Retinoic acid analogs as potent inducers of differentiation and apoptosis. New promising chemopreventive and chemotherapeutic agents in oncology. *Pure Appl. Chem.*, 2001; 73: 1437–1444
- [64] Stasik I., Rapak A., Kalas W., Ziolo E., Strzadala L.: Ionomycin-induced apoptosis of thymocytes is Nur77 NBRE or NurRE binding, but is accompanied by Nur77 mitochondrial targeting. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007; 1773: 1483–1490
- [65] Stehlin-Gaon C., Willmann D., Zeyer D., Zeyer D., Sanglier S., Van Dorsselaer A., Renaud J.P., Moras D., Schule R.: All-trans retinoic acid is a ligand for the orphan nuclear receptor ROR β . *Nat. Struct. Biol.*, 2003; 10: 820–825



- [66] Stepień A., Izdebska M., Grzanka A.: Rodzaje śmierci komórki. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 420–428
- [67] Sun E.W., Shi Y.F.: Apoptosis: the quiet death silences the immune system. *Pharmacol Ther.*, 2001; 92: 135–145
- [68] Thompson P.D., Jurutka P.W., Haussler C.A., Whitfield G.K., Haussler M.R.: Heterodimeric DNA binding by the vitamin D receptor and retinoid X receptors is enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and inhibited by 9-cis-retinoic acid. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273:8483–8491
- [69] Towers T.L., Staeva T.P., Freedman L.P.: A two-hit mechanism for vitamin D₃ mediated transcriptional repression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene: vitamin D receptor competes for DNA binding with NFAT1 and stabilizes c-Jun. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 4191–4199
- [70] Ueda E., Kurebayashi S., Sakaue M., Backlund M., Koller B., Jetten A.M.: High incidence of T-cell lymphomas in mice deficient in the retinoid-related orphan receptor ROR γ . *Cancer Res.*, 2002; 62: 901–909
- [71] Wang T., Xu J., Yu., Yang R., Han Z.C.: Peroxime proliferator-activated receptor γ in malignant diseases. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2006; 58: 1–14
- [72] Weih F., Ryseck R.P., Chen L., Bravo R.: Apoptosis of nur77/N10-transgenic thymocytes involves the Fas/Fas ligand pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 5533–5538
- [73] Welsh J., VanWeelden K., Flanagan L., Byrne I., Nolan E., Narvaez C.J.: The role of vitamin D₃ antiestrogens in modulating apoptosis of breast cancer cells and tumors. *Subcell. Biochem.*, 1998; 30: 245–270
- [74] Wilson A.J., Arango D., Mariadason J.M., Heerd B.G., Augenlicht L.H.: TR3/Nur77 in colon cancer cell apoptosis. *Cancer Res.*, 2003; 63: 5401–5407
- [75] Wilson T.E., Fahrner T.J., Johnston M., Milbrandt J.: Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science*, 1991; 252: 1296–1300
- [76] Woronicz J.D., Lina A., Calnan B.J., Szychowski S., Cheng L., Winoto A.: Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 1995; 15: 6364–6376
- [77] Wu Q., Liu S., Ye X.F., Huang Z.W., Su W.J.: Dual roles of Nur77 in selective regulation of apoptosis and cell cycle by TPA and ATRA in gastric cancer cells. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 1583–1592
- [78] Wyllie A.H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 1980; 284: 555–556
- [79] Yang W.L., Frucht H.: Activation of the PPAR pathway induce apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 2001; 22: 1379–1383
- [80] Yoshimura K., Muto Y., Shimizu M., Matsushima-Nishiwaki R., Okuno M., takano Y., Tsurumi H., Kojima S., okano Y., Moriwaki H.: Phosphorylated retinoid X receptor α loses its heterodimeric activity with retinoic acid receptor β . *Cancer Sci*, 2007; 98: 1868–1874
- [81] Zechel C., Shen X.Q., Chen J.Y., Chen Z.P., Chambon P., Gronemeyer H.: The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J.*, 1994; 13: 1425–1433
- [82] Zhang X.K.: Vitamin A and apoptosis in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 2002; 9: 87–102
- [83] Zhou T., Cheng J., Yang P., Wang Z., Liu C., Su X., Bluethmann H., Mountz J.D.: Inhibition of Nur77/Nurr1 leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells. *J. Exp. Med.*, 1996; 183: 1879–1892
- [84] Zoete V., Grosdidier A., Michielin O.: Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007; 1771: 915–925