

Γλυκοκορτικοειδή και υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών

Ε. Σουβατζόγλου

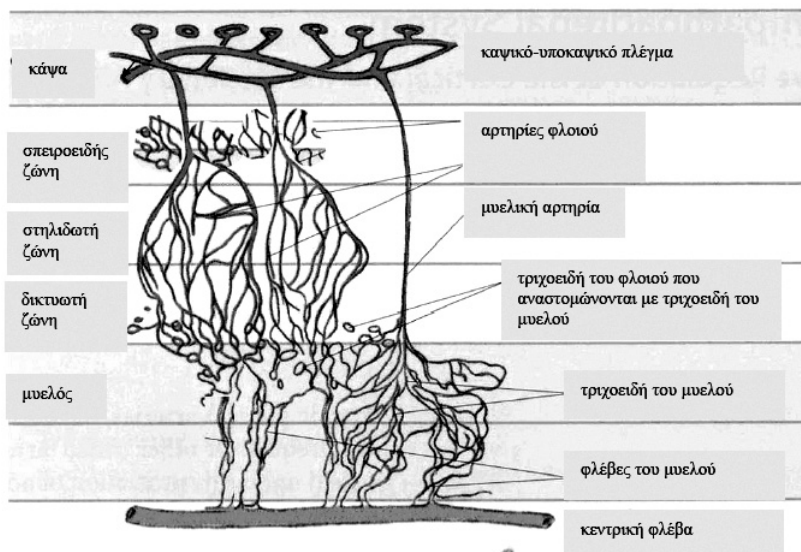
Ενδοκρινολόγος

1. Εισαγωγή

Η δράση των γλυκοκορτικοειδών στα κύτταρα στόχους πραγματοποιείται μέσω σύνδεσής τους με ενδοκυττάριους υποδοχείς αφού πρώτα περάσουν μέσω διήθησης την κυτταρική μεμβράνη. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor GR) ανήκει στην ομάδα των πυρηνικών υποδοχέων η οποία περιλαμβάνει τους υποδοχείς των αλατοκορτικοειδών, ανδρογόνων, προγεστερόνης οιστρογόνων, βιταμίνης D, θυρεοειδικών ορμονών, ρετινοϊκού οξέως, PPAR γ , καθώς και ορφανούς υποδοχείς όπου δεν έχει βρεθεί ακόμη ο προσδέτης (ligand). Οι πυρηνικοί υποδοχείς ανήκουν στην κατηγορία των μεταγραφικών παραγόντων ενεργοποιούμενων από προσδέτη (ligand activated transcription factors) χαρακτηριστικό των οποίων είναι η λειτουργία τους στην ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων στόχων. Ο GR εκφράζεται σε σχεδόν όλους τους ανθρώπινους ιστούς. Η παρουσία γλυκοκορτικοειδών είναι κεφαλαιώδους σημασίας για την διατήρηση της ομοιοστασίας του οργανισμού και η πλήρης αντίσταση στην δράση τους δεν είναι συμβατή με την επιβίωση.

2. Γονίδιο

Το γονίδιο του GR ονομάζεται NR3C1 στην ονοματολογία του Human Genome Organization. Βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του 5ου χρωμοσώματος (5q31-32), περιέχει 140kb και περιλαμβάνει 9 εξόνια που αποτελούν λιγότερο από 2% (2,5kb) του μήκους του. Κωδικοποιεί μέσω ματίσματος δύο πρωτεΐνες (splice variants): GR α και GR β που παράγονται από εναλλακτική χρήση δύο διαφορετικών εξονίων 9 α και 9 β .⁽¹⁾ (Εικόνα 1). Εναλλακτικό σημείο έναρξης μεταγραφής στο εξόνιο 2 οδηγεί πιθανώς στην έκφραση ισομορφών του υποδοχέα που ονομάζονται GR α A, GR α B και GR β A, GR β B ο ρόλος των οποίων είναι αντικείμενο έρευνας.⁽²⁾



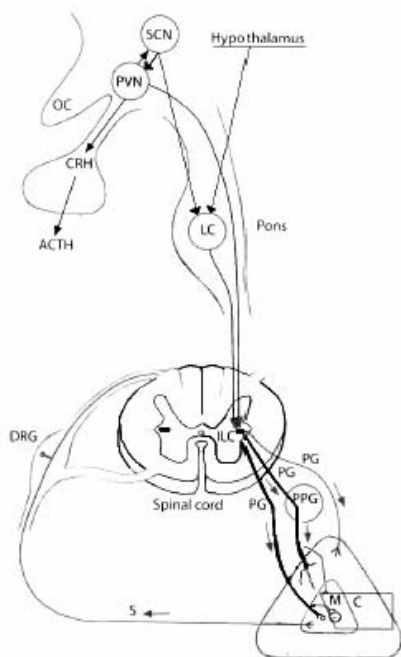
Εικόνα 1 Σχηματική απεικόνιση της δομής του γονιδίου του hGR. (3)

3. Δομή

Οι υποδοχείς των στεροειδών αποτελούν υποομάδα των πυρηνικών υποδοχέων και περιλαμβάνουν τους υποδοχείς αλατοκορτικοειδών, ανδρογόνων, προγεστερόνης, οιστρογόνων και GR. Υπάρχουν κοινά σημεία στη δομή τους: το αμινοτελικό άκρο τους (N-), καταλύει την μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα προσδένοντας συνεργικούς παράγοντες, στο κέντρο βρίσκεται το σημείο πρόσδεσης στο DNA (DNA binding domain DBD), ενώ προς το καρβοξυτελικό άκρο (C-) βρίσκεται το σημείο πρόσδεσης της ορμόνης (ligand binding domain LBD). (Εικόνα 2) Η περιοχή DBD χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη αμινοξική αλληλουχία διατεταγμένης υπό μορφή «δακτύλων ψευδαργύρου (Zn)» και αλλαγή της αλληλουχίας αυτής μπορεί να αλλάξει πλήρως τις ιδιότητες του υποδοχέα.

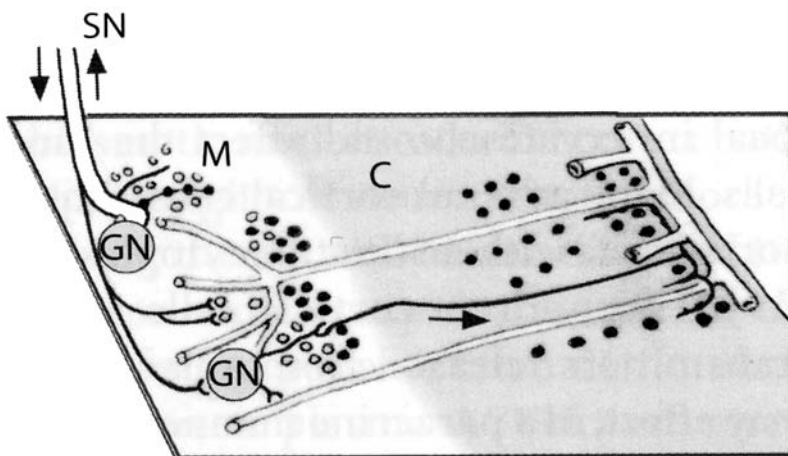
Έχουν αναγνωριστεί δύο περιοχές που συμμετέχουν στην λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής, τις AF-1 και AF-2 (Activation Factor), οι οποίες παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στον τρόπο λειτουργίας τους. (Εικόνα 2)

Ο GR α αποτελείται από 777 αμινοξέα ενώ ο GR β από 742. Τα πρώτα 727 αμινοξέα είναι κοινά, η διαφοροποίηση των υποδοχέων γίνεται στο C-τελικό άκρο. Ο GR α είναι ο «κλασικός» υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών που προσδένει την ορμόνη και μεταγράφει τα αντίστοιχα γονίδια. Εκφράζεται πρακτικώς σε όλα τα ανθρώπινα κύτταρα. Ο GR β δεν προσδένει γλυκοκορτικοειδή ενώ η κατανόηση του ρόλου του σε φυσιολογία και παθολογία είναι περιορισμένη.



Εικόνα 2 Απεικόνιση του GRα με τις λειτουργικές περιοχές του. Modulatory: αποκαλούμενη και ανοσογόνος περιοχή του υποδοχέα εμπεριέχει την περιοχή AF-1 (activation function 1) που καταλύει μόνιμα την μεταγραφική δραστηριότητα προσδένοντας πρωτεϊνικούς συνπαράγοντες. DBD: DNA Binding Domain, H: hinge region, LBD: Ligand Binding Domain. AF-2 (activation factor 2): περιοχή που μεταβάλλει την μεταγραφική δραστηριότητα μετά από πρόσδεση στην ορμόνη. (4)

4. Λειτουργία



Εικόνα 3: Μηχανισμοί ρύθμισης της μεταγραφής μέσω του GRα. (A): άμεση αλληλεπίδραση μέσω GRE (B) σύνδεση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (C) συνδυασμός τω (A) και (B).

Ο GRα βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σχεδόν σε όλα τα ανθρώπινα κύτταρα, συνδεδεμένος με άλλες πρωτεΐνες (Heat Shock Proteins 90, 70, 50 κ.ά.) σε

μορφή ετεροπολυμερούς. Μετά την είσοδό στο κύτταρο-στόχο η ορμόνη συνδέεται με τον υποδοχέα ενεργοποιώντας μια σειρά από μεταβολές. Η αλλοστερική δομή του μεταβάλλεται: αποχωρίζονται οι συνδεδεμένες πρωτεΐνες, διμερίζεται και εισέρχεται μέσω ενεργούς μεταφοράς από πρωτεΐνες στον πυρήνα ⁽⁵⁾. Εκεί αναγνωρίζει ειδικές αλληλουχίες στο DNA που ονομάζονται στοιχεία ανταποκρινόμενα στα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid response elements GRE) και προσδένεται σε αυτά μέσω της DBD. ^(5,6)

4.1. Στοιχεία ανταποκρινόμενα στα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid response elements GRE):

Αποτελούνται από δύο αλληλουχίες έξι νουκλεοτιδίων (AGAACA) που εμφανίζονται με συγκεκριμένο τρόπο στο DNA και αποτελούν το σημείο πρόσδεσης του ομοδιμερισμένου υποδοχέα ⁽⁷⁾. Ανευρίσκονται στο DNA σε θέση πριν από τις περιοχές των υποκινητών (promoters) γονιδίων που ελέγχονται από γλυκοκορτικοειδή. GRE έχουν ταυτοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό γονιδίων. Τα GRE είναι συνήθως θετικοί ενεργοποιητές μεταγραφής, υπάρχουν όμως και στοιχεία που ανταποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή και αναστέλλουν την μεταγραφή πρωτεϊνών. Οι γνώσεις για τα στοιχεία αυτά είναι περιορισμένες. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι ο GR μπορεί να επηρεάσει την μεταγραφή γονιδίων που δεν περιέχουν GRE μέσω πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης.

4.2. Συνεργοποιητές GR (GR coactivators):

Επιπρόσθετα στην δημιουργία του εναρκτήριου συμπλέγματος μεταγραφής (RNA πολυμεράση) ο GR έλκει ικανό αριθμό πρωτεϊνών που αποκαλούνται συνεργοποιητές και υποστηρίζουν την δράση του. Η σύνδεση με τον υποδοχέα γίνεται μέσω της περιοχής του AF-2 και πιθανολογείται ότι δρουν μέσω ακετυλίωσης ιστονίων «χαλαρώνοντας» την δομή της χρωματίνης και διευκολύνοντας την πρόσβαση στο DNA. Περιλαμβάνουν πρωτεΐνες όπως η CREB (cAMP response element binding protein), p160, pCAF κ.ά.

Εκτός από τους συνεργοποιητές πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν και πρωτεΐνες η λειτουργία των οποίων είναι να διατηρούν τον υποδοχέα σε κατασταλήνη, ανενεργή κατάσταση (corepressors).

Οι μηχανισμοί που περιγράφησαν χρησιμοποιούνται κυρίως για την έναρξη και επίταση της μεταγραφικής δραστηριότητας. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως τα γλυκοκορτικοειδή επιδρούν μέσω αρνητικής ρύθμισης της μεταγραφής. Έχει

καταδειχθεί π.χ. η αρνητική ρύθμιση που προκαλούν στην δράση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Η σημασία του μηχανισμού αυτού δεν έχει ακόμη πλήρως διερευνηθεί πιθανολογείται όμως ότι ενέχεται στην δράση των γλυκοκορτικοειδών στο ανοσοποιητικό ⁽⁸⁾.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η σύνδεση του συμπλέγματος υποδοχέα- γλυκοκορτικοστεροειδούς με το DNA δεν φαίνεται να είναι πάντα απαραίτητη για την έκφραση γονιδίων. Ο υποδοχέας, σε σύνδεση με το γλυκοκορτικοειδές, αλλά και επί απουσίας της, μπορεί να συσχετιστεί με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι πρωτεΐνες STAT 3, STAT 5 (Signal Transducers and Activator of Transcription (STAT) protein), c-jun ομοδιμερή. Είναι χαρακτηριστικό ότι επίμνες στους οποίους έχει αφαιρεθεί το γονίδιο του GR δεν επιζούν, ενώ αν ο GR τροποποιηθεί ώστε να μην μπορεί να προσδεθεί στο DNA (αφαιρείται η δυνατότητα διμερισμού) τα ποντίκια επιβιώνουν ^(9,10).

4.3. Μη γενομική δράση γλυκοκορτικοειδών:

Όπως και για άλλες στεροειδικές ορμόνες πιθανολογείται και για τα γλυκοστεροειδή η ύπαρξη μηχανισμού δράσης διαφορετικού από αυτόν της μετεγγραφής γονιδίων. Διαμεμβρανικοί υποδοχείς συνδεδεμένοι με συστήματα ενδοκυττάριας επικοινωνίας (c-AMP/PKA, Ca⁺⁺) φαίνεται να συμμετέχουν σε αυτή την «μη γενομική» (non genomic) δράση η οποία πιθανώς να ευθύνεται για κάποιες από τις ταχείες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών (π.χ. στο ανοσοποιητικό) όπου ο χρόνος αντίδρασης καθιστά λιγότερο πιθανή την γενομική δράση ^(11,12).

5. GRβ

Εκφράζεται επίσης σε μεγάλο αριθμό των ανθρώπινων κυττάρων συνήθως σε χαμηλότερη συγκέντρωση από τον GRα. Εντοπίζεται σχεδόν πάντα μόνο στον πυρήνα του κυττάρου, δεν προσδένει γλυκοκορτικοειδή ούτε τους ανταγωνιστές τους. και φαίνεται ότι δρα ως αναστολέας του GRα μέσω πιθανώς ανταγωνισμού δέσμησης με συνεργοποιητές (coactivators) και την δημιουργία ανενεργών ετεροδιμερών μεταξύ των δύο υποδοχέων ⁽¹³⁾. Τα σχετικά ενδοκυττάρια επίπεδα των GRα και GRβ επηρεάζουν την ευαισθησία του κυττάρου στα γλυκοκορτικοειδή έτσι ώστε επί υπεροχής GRβ να παρουσιάζεται αυξημένη αντίσταση.

Παθολογία

Στο σύνδρομο της οικογενούς αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή έχουν περιγραφεί οικογένειες με υπερκορτιζολαιμία αλλά χωρίς τα κλινικά σημεία αυτής. Η

διαταραχή έχει ως αίτιο γενικευμένη διαταραχή της ευαισθησίας στα γλυκοκορτικοειδή και χαρακτηρίζεται από αντιρροπιστική αύξηση της έκκρισης κορτιζόλης με συνοδή αύξηση έκκρισης ACTH, με διατήρηση του κερκαδιανού ρυθμού, χωρίς κλινικά σημάδια υπερκορτιζολαιμίας, πλην ίσως χρονίας κόπωσης. Η εκδήλωσή της απαιτεί παραγωγή κορτιζόλης σε τέτοιο βαθμό που να ξεπερνά την δράση του προστατευτικού ενζυμικού (11β- HSD2) μηχανισμού που δεν επιτρέπει την μετατροπή κορτιζόνης σε κορτιζόλη ιδιαίτερα στους νεφρούς όπου και ο υποδοχέας αλατοκορτικοειδών. Επιπρόσθετα συνυπάρχει υπερπαραγωγή στεροειδών με αλατοκορτικοειδή δράση (δεοξυκορτικοστερόνης (DOC) και κορτικοστερόνης) ή ανδρογονική δράση (ανδροστενδιόνη, DHEAs) λόγω της υπερέκκρισης ACTH. Είναι εξαιρετικά σπάνια νόσος. Έχουν περιγραφεί παραπάνω από δεκα περιστατικά στην διεθνή βιβλιογραφία που αφορούν σε οικογενής ή σποραδικές περιπτώσεις. Σε κάποια από τα περιστατικά αυτά έχει ταυτοποιηθεί η μετάλλαξη του υποδοχέα που ευθύνεται ⁽³⁾. Πρόσφατη δημοσίευση ανέδειξε μετάλλαξη στη θέση 773 (T→C) της LBD που προκαλεί μείωση της μεταγραφικής ικανότητας του υποδοχέα, διαταραχή πρόσδεσης άλλων πρωτεϊνών, μειωμένη συγγένεια προς τα γλυκοκορτικοειδή καθώς και διαταραχή στην μετανάστευση του υποδοχέα στον πυρήνα, αναδεικνύοντας την σημασία της LBD για την λειτουργία του GRα ⁽¹⁴⁾.

Έχουν επίσης περιγραφεί περιστατικά με υπερευαισθησία στην κορτιζόλη. Η κλινική εικόνα είναι αυτή του συνδρόμου Cushing, τα επίπεδα κορτιζόλης όμως ανευρίσκονται φυσιολογικά. Σε αντίθεση με το οικογενές σύνδρομο αντίστασης δεν ανευρίσκεται μετάλλαξη στον υποδοχέα αλλά πολυμορφισμός αυτού.

Η AF-1 (N-τελικό άκρο) είναι η περιοχή όπου έχουν περιγραφεί πολυμορφισμοί που οδηγούν τόσο σε αυξημένη όσο και σε μειωμένη ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή. Αποτελεί αντικείμενο έρευνας και συζήτησης ο μηχανισμός μέσω του οποίου αλλοιώνεται η λειτουργία του GRα καθώς και η σημασία των πολυμορφισμών του υποδοχέα στον φαινότυπο ⁽¹⁵⁾.

Σχετική αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή οφειλόμενη σε πολυμορφισμό μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα στους φορείς (π.χ. χαμηλή αντίσταση στην ινσουλίνη), αλλά ενδεχομένως και επιβαρυντικά όπως π.χ. σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα ⁽¹⁶⁾. Παράδειγμα επίκτητης υπερευαισθησίας στα γλυκοκορτικοειδή είναι πιθανώς οι ασθενείς με νοσο AIDS. Πρωτείνες συνδεδεμένες με τον ιο HIV-1 η Vpr και η Tat, προκαλούν αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GRα με πιθανή συμμετοχή σε κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου ⁽¹⁷⁾.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kino T, Chrousos GP 2001 Glucocorticoid and mineralocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes. *J Endocrinol.* 169(3):437-45. Review.
2. Yudit MR, Cidlowski JA 2001 Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol.* 15(7):1093-103.
3. Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E, Vottero A, Bhattacharyya N, Chrousos GP 2004 Natural glucocorticoid receptor mutants causing generalized Glucocorticoid resistance: molecular genotype, genetic transmission, and clinical phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(4):1939-49
4. J. Zhou, J.A. Cidlowski 2005 The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70 407–417
5. Isohashi F, Okamoto K. 1993. ATP-stimulated translocation promoter that enhances the nuclear binding of activated glucocorticoid receptor complex. Biochemical properties and its function (mini-review). *Receptor Summer*;3(2):113-24
6. Kino T, Souvatzoglou E, De Martino MU, Tsopanomihalu M, Wan Y, Chrousos GP. 2003 Protein 14-3-3sigma interacts with and favors cytoplasmic subcellular localization of the glucocorticoid receptor, acting as a negative regulator of the glucocorticoid signaling pathway. *J Biol Chem.* 11;278(28):25651-6
7. Mangelsdorf, DJ, Thummel, C, Beato, M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83:835
8. Hermoso MA, Cidlowski JA. 2003 Putting the brake on inflammatory responses: the role of glucocorticoids. *Life.* 55(9):497-504. Review
9. Reichardt HM; Kaestner KH; Tuckermann J; Kretz O; Wessely O; Bock R; Gass P; Schmid W; Herrlich P; Angel P; Schutz G SO 1998 DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93(4):531-41
10. Kino T, Chrousos GP 2004 Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and associated diseases. *Essays Biochem.*40:137-55. Review
11. Borski RJ; Hyde GN; Fruchtmann S 2002 Signal transduction mechanisms mediating rapid, nongenomic effects of cortisol on prolactin release. *Steroids* 67(6):539-48.
12. Barnes PJ, Adcock IM. *Ann Intern Med.* 2003How do corticosteroids work in asthma? 139(5 Pt 1):359-70.
13. Charmandari E, Chrousos GP, Ichijo T, Bhattacharyya N, Vottero A, Souvatzoglou E, Kino T 2005 The human glucocorticoid receptor (hGR) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hGRalpha by interfering with formation of active coactivator complexes. *Mol Endocrinol.* 19(1):52-64.
14. Charmandari E, Raji A, Kino T, Ichijo T, Tiulpakov A, Zachman K, Chrousos GP 2005 A novel point mutation in the ligand-binding domain (LBD) of the human glucocorticoid receptor (hGR) causing generalized glucocorticoid resistance: the importance of the C terminus of hGR LBD in conferring transactivational activity. *J Clin Endocrinol Metab* 90(6):3696-705
15. van Rossum EF, Lamberts SW. 2004 Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res.*59:333-57. Review

16. Adcock IM, Lane SJ. 2003 Corticosteroid-insensitive asthma: molecular mechanisms. J Endocrinol. 178(3):347-55. Review
17. Kino T, Chrousos GP 2004 Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and associated diseases. Essays Biochem. 40:137-55. Review

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΕΠΙΛΟΓΗΣ

1. Το γονίδιο του GR

- α) κωδικοποιεί μία μόνο πρωτεΐνη τον GRα
- β) κωδικοποιεί τουλάχιστο δύο πρωτεΐνες
- γ) αποτελείται από 9 εξόνια
- δ) βρίσκεται στο 9ο χρωμόσωμα
- ε) (β) και (γ)

Ερώτηση 2

- α) Ο GRα και ο GRβ διαφέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο
- β) Ο GRα εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς
- γ) Οι AF είναι περιοχές που σχετίζονται κυρίως με την πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA
- δ) (α) +(β)
- ε) (α) +(γ)

Ερώτηση 3

- α) Ο GR είναι χαρακτηριστικός εκπρόσωπος της ομάδας των μεμβρανικών υποδοχέων
- β) Παρουσία GRE είναι απαραίτητη συνθήκη για να επηρεάσει ο GRα την μεταγραφή
- γ) Η μεταγραφή πρωτεϊνών ε[ιτεινεται αλλά και αναστέλλεται από τον GRα
- δ) η γονομική δράση είναι ο μόνος τρόπος δράσης του GRα

4. Ο GRβ

- α) βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα
- β) προσδένει δεξαμεθαζόνη
- γ) πιθανώς αναστέλλει την δράση του GRα
- δ) σχηματίζει πολυμερή με τον GRα ενισχύοντας την δράση του

5. Το σύνδρομο της οικογενούς αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή

- α) είναι σπάνια νόσος
- β) οι ασθενείς παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα κορτιζόλης και χαμηλά επίπεδα ACTH
- γ) έχει πάντα σαφή κλινικά σημεία
- δ) οφείλεται σε πολυμορφισμό του υποδοχέα

Σωστές απαντήσεις κατά σειρά

ε, δ, γ, γ, α