

REMODELING CHROMATYNY JAKO GŁÓWNY MOLEKULARNY MECHANIZM DZIAŁANIA RECEPTORA GLUKOKORTYKOSTEROIDOWEGO

CHROMATIN REMODELING AS A GENERAL MOLECULAR MECHANISM
OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR ACTION

Ewa Barbara BRZEZIAŃSKA, Daria DOMAŃSKA, Dorota Izabela
PASTUSZAK-LEWANDOSKA

Zakład Molekularnych Podstaw Medycyny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie: Swoistość odpowiedzi tkanki na endogenne i syntetyczne glukokortykosteroidy (GK) jest kontrolowana na różnych poziomach funkcjonowania komórki: transkrypcji genów, translacji białka receptorowego dla glukokortykosteroidów (GR) oraz jego aktywacji i translokacji do jądra komórkowego. Molekularny mechanizm działania GR związany jest z genomową regulacją ekspresji – transaktywacją lub transrepresją – genów steroidozależnych poprzez interakcję z regionem promotorowym genów docelowych, wpływem na stabilność mRNA niektórych białek, oddziaływaniem z licznymi czynnikami transkrypcyjnymi, remodelingiem chromatyny a także oddziaływaniem z mikroRNA. Mechanizm pozagenomowego działania GR dotyczy aktywacji systemu wtórnych przekaźników oraz ścieżek przekazywania sygnału, która zachodzi z udziałem receptorów jądrowych i błonowych związanych z kanałami jonowymi, szeregiem kinaz tyrozynowych, serynowo-treoninowych jak i licznymi białkami adaptorowymi. Molekularne działanie glukokortykosteroidów determinuje prawidłową odpowiedź, lub też jej brak, na leczenie GK w wielu chorobach autoimmunologicznych i zapalnych, w tym w astmie, POChP, chorobie Crohna czy stwardnieniu rozsianym.

Słowa kluczowe: receptor glukokortykosteroidowy, remodeling chromatyny, zapalenie, czynniki transkrypcyjne, szlak sygnałowy MAPK

Summary: Specific tissue response to endogenic and synthetic glucocorticoids (GCs) is controlled at different levels of cell function: target gene transcriptions, glucocorticoid receptor (GR) protein translation, GR activation and translocation to the nucleus. Molecular mechanism of GR action is related to genomic regulation of gene expression, i.e., transactivation or transrepression of steroid-sensitive genes *via* interaction with gene promoter, influence on mRNA stability of some proteins, interaction with numerous transcription factors, microRNAs as well as influence on chromatin

remodeling. Non-genomic mechanism of GR action is connected with activation of secondary transmitters and signaling pathways *via* nuclear and membrane receptors associated with ion channels as well as through interaction with tyrosine and serine/threonine kinases and adaptor proteins.

Molecular mechanism of GK activity may determine the proper or lack of response on GK in the treatment of many autoimmune and inflammatory diseases including asthma, multiple sclerosis, Crohn diseases or POChP.

Key words: glucocorticoid receptor, chromatin remodeling, inflammation, transcription factors, MAPK signaling pathway

WSTĘP

Glukokortykosteroidy (GK) zostały powszechnie uznane za modulatory działania cytokin, przejawiające właściwości immunosupresyjne i przeciwzapalne. Z tego względu syntetyczne glukokortykosteroidy znalazły powszechne zastosowanie w farmakoterapii jako leki przeciwzapalne, przeciwalergiczne i immunosupresyjne [4].

Molekularne działanie naturalnych, jak i syntetycznych GK w komórce związane jest z interakcją z licznymi kinazami aktywowanymi przez mitogeny (ang. *mitogen-activated protein kinases*; MAPK), kinazami zależnymi od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinases*; CDK) czy kinazą syntazy glikogenu-3 (ang. *glycogen synthase kinase 3*; GSK-3), które na drodze fosforylacji zmieniają konformację receptora dla glukokortykosteroidów (GR) oraz jego powinowactwo do DNA genu docelowego. Wykazano, że mechanizm ten reguluje aktywność glukokortykosteroidów w komórce, jednak wrażliwość na ich działanie jest różna w zależności od rodzaju tkanek, a nawet stadiów cyklu komórkowego [25]. Swoistość reakcji na GK oraz końcowy wynik ich oddziaływania zależy od złożonego genomowego jak i pozagenomowego mechanizmu działania tych hormonów.

Mechanizm genomowy związany z transaktywacją lub transrepresją licznych genów prozapalnych, wpływa na przebudowę chromatyny poprzez acetylację/deacetylację histonów, odbywającą się z udziałem koaktywatorów transkrypcji o wewnętrznej aktywności acetylotransferaz/deacetylaz histonów (ang. *histone acetyltransferases/histone deacetylases*; HAT/HDAC).

Mechanizm pozagenomowego działania glukokortykosteroidów – związany z szybkim efektem ich oddziaływania w komórce – uzupełnia mechanizm genomowy, doprowadzając do jego potencjalizacji. Wykazano, że pozagenomowy mechanizm działania GK wymaga modyfikacji przepuszczalności błon komórkowych, aktywacji systemu wtórnych przekaźników, licznych oddziaływań białko-białko z kaskadą kinaz wchodzących w skład szlaków sygnałowych komórki, głównie: szlaku sygnałowego MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases signaling pathway*) i szlaku PI3K/Akt (PKB) (ang. *phosphatidylinositol 3-kinases/ Protein Kinase B signaling pathway*) oraz interakcji z receptorami związanymi z białkami G (ang. *G protein coupled receptors*).

Bardziej szczegółowe poznanie molekularnego działania GK na poziomie komórkowym ma kluczowe znaczenie w planowaniu leczenia glukokortykoidami w przebiegu chorób o podłożu immunologicznym i zapalnym, m.in. takich jak astma, przewlekłe obturacyjne zapalenie płuc (POChP) czy stwardnienie rozsiane (SM). Wrażliwość na GK i efekt terapii zależy od złożonych mechanizmów – modyfikacji GR po przyłączeniu ligandu, zmian konformacyjnych jego izoform (głównie alfa), jego translokacji do jądra komórkowego i interakcji z czynnikami transkrypcyjnymi, a także od wpływu remodelingu chromatyny na ekspresję genów prozapalnych.

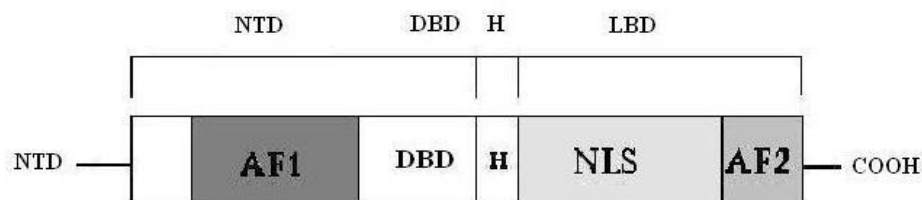
STRUKTURA RECEPTORA GLUKOKORTYKOSTEROIDOWEGO (GR)

Receptor glukokortykosteroidowy (GR, NR3C1) należy do nadrodziny jądrowych receptorów steroidowo-tarczycowo-retinoidowych, zależnych od ligandu czynników transkrypcyjnych, do których zalicza się także receptory dla mineralokortykoidów (ang. *mineralocorticoid receptor*; MR), hormonów tarczycy (ang. *thyroid hormone receptor*; THR), androgenów (ang. *androgen receptor*; AR), estrogenów (ang. *estrogen receptor*; ER), receptora aktywowanego przez proliferatory peroksyosomów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*; PPAR) oraz witaminy D3 (ang. *vitamin D3 receptor*; VDR) [10].

Receptory jądrowe tworzą grupę strukturalnie homologicznych białek, które po związaniu odpowiedniego ligandu działają w jądrze jako czynniki transkrypcyjne. Ponadto w postaci transaktywowanych monomerów, homodimerów lub heterodimerów regulują różne procesy komórkowe. Receptor glukokortykosteroidowy, oprócz swojej transaktywacyjnej funkcji na terenie jądra, może również ulegać translokacji na powierzchnię mitochondrium, biorąc udział w regulacji apoptozy.

Podobnie jak każdy receptor steroidowy, GR posiada trzy funkcjonalne domeny: 1) najbardziej zmienną transaktywacyjną domenę N-kończącą (ang. *N-terminal transactivation domain*; NTD), posiadającą sekwencje odpowiedzialne za aktywację genów docelowych (ang. *activation function domain 1*; domena AF1) i prawdopodobnie interakcje z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, 2) domenę środkową, wiążącą DNA (ang. *DNA-binding domain*; DBD), zawierającą dwa motywy palca cynkowego (ang. *zinc finger domain*) bezpośrednio uczestniczące w wiązaniu cząsteczki kwasu nukleinowego przez białko receptorowe. Dodatkowo, ta część receptora bierze udział w dimeryzacji, translokacji do jądra komórkowego oraz transaktywacji. Jednak w translokacji kompleksu GR-ligand do jądra komórkowego uczestniczy głównie region łączący, tzw. zawiasowy (ang. *hinge region*; H). Ostatnią domeną jest 3) domena C-kończąca, wiążąca ligand (ang. *ligand binding domain*; LBD), odpowiadająca za wiązanie z białkami szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins*; Hsp), translokację

do jądra komórkowego, dimeryzację oraz transaktywację receptora. Domena LBD zawiera kolejną domenę o funkcji aktywacyjnej (ang. *activational function domain 2*; *domena AF2*) (ryc. 1).



AF1- domena aktywacji transkrypcji niezależnej od liganda

DBD - domena wiążąca DNA

H - region zawiasowy

NLS – domena wiążąca ligand

AF2 – domena aktywacji transkrypcji zależnej od liganda

RYCINA 1. Schemat budowy podstawowych funkcjonalnych domen receptora glukokortykosteroidowego

FIGURE 1. Diagram of the basic functional domains glucocorticoid receptor

Gen dla receptora glukokortykosteroidowego u człowieka zlokalizowano na chromosomie 5 (*locus* 5q31–32). Analiza sekwencji DNA wykazała występowanie 9 eksonów o wysoko konserwatywnej strukturze. Udowodniono, że istnieje kilka funkcjonalnych podtypów GR, będących rezultatem alternatywnego splicingu prekursorowego mRNA (pre-mRNA) powstałego po transkrypcji matrycowego DNA. W procesie alternatywnego splicingu eksonu 9 u człowieka powstają dwie izoformy GR (GR α i GR β) różniące się strukturą odcinka C-końcowego. Wysoką homologię sekwencji dwóch izoform warunkują niezmiennione eksony 1-8 genu *GR* [14]. Wykazano, że izoforma GR α jest dominującym, funkcjonalnie aktywnym białkiem receptorowym o wyższej niż GR β ekspresji, lepszych właściwościach wiązania ligandu oraz wyższej aktywności transkrypcyjnej [13, 28]. Dotychczas sądzono, że w tej samej komórce GR β działa jako dominująco-negatywny regulator aktywności GR α (ang. *dominant-negative inhibitor*), hamujący jego działanie i nie przyłączający glukokortykosteroidów. Ostatnio wykazano jednak, że proces regulacji ekspresji genów docelowych może odbywać się bezpośrednio poprzez GR β , niezależnie od izoformy GR α [13,14]. Ponadto opisano inne warianty receptora GR o skróconym odcinku C-końcowym: GR δ oraz GR-P, które ulegają ekspresji głównie w komórkach nowotworowych. Opisano także kolejny, splicingowy wariant GR γ , posiadający dodatkową argininę w domenie wiążącej DNA. Zgodnie z ostatnimi wynikami badań, alternatywne miejsce inicjacji

translacji GR α zwiększa różnorodność izoform oraz zmienność ich ekspresji [28]. Alternatywna translacja genu GR jest uwarunkowana występującymi w genie funkcjonalnymi sekwencjami nukleotydowymi, występującymi w mRNA tzw. sekwencjami Kozak (ang. *Kozak consensus sequence*): (GCC)GCC(A/G)CCAUGG. W obrębie tych sekwencji miejsce (A/G) jest rozpoznawane przez rybosom jako punkt startu, od którego rozpoczyna się przepisywanie informacji genetycznej z mRNA na kolejność aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym [46]. Wykazano, że białkowe warianty posiadają zróżnicowaną aktywność regulacji genów docelowych i ulegają ekspresji na zróżnicowanym poziomie zależnie od typu tkanki. Jak dotąd, zidentyfikowano kilka wariantów translacyjnych receptora GR α u człowieka (A,B,C,D a wśród C i D białkowe warianty C1-C3 oraz D1-D3) oraz kilka wariantów GR β [46]. Wszystkie dotychczas opisane izoformy receptora GR różnią się sekwencjami N-końcowymi, podczas gdy domena wiążąca ligand jest strukturalnie i funkcjonalnie taka sama (wykazuje to samo powinowactwo do ligandu).

Badania *in vivo* na modelu zwierzęcym udowodniły istnienie znaczących różnic w ekspresji np. GR α -C i GR α -D pomiędzy tkanką śledziony, płuc, pęcherza moczowego czy wątroby [13, 14]. Tak więc przyjmuje się, że tkankowo swoista odpowiedź na GK i mechanizm odpowiedzi komórki na hormony steroidowe zależy m.in. od zjawiska alternatywnego składania genu (*splicing*), powstawania różnych izoform translacyjnych jak i ich tkankowo swoistego rozmieszczenia w poszczególnych tkankach [13, 14].

MOLEKULARNY MECHANIZM DZIAŁANIA GR

Molekularny mechanizm działania receptora glukokortykosteroidowego (GR) związany jest z interakcją z ligandem: naturalnymi lub syntetycznymi glukokortykosteroidami (np. prednisolonem i deksametasonem), licznymi interakcjami białkowo-białkowymi, białkowo- nukleotydowymi (wiązanie 3' UTR regionu receptora z *seed region* mikroRNA), jak również z translokacją aktywnej formy receptora do jądra komórkowego.

Najważniejszym czynnikiem regulującym dostęp glukokortykosteroidów do receptora, jest lokalny metabolizm steroidów przy udziale mikrosomalnego enzymu dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej (11 β -HSD), która katalizuje w mitochondriach przekształcanie 11 β -deoksykortyzolu do kortyzolu, końcowego produktu syntezy GK. U ludzi zidentyfikowano dwie izoformy tego enzymu (11 β -HSD1 i 11 β -HSD2), którego tkankowo swoista ekspresja reguluje dostęp GK do receptorów GR oraz MR. Typ 1 enzymu (11 β -HSD1) działa swoiście tkankowo i uczestniczy w konwersji nieaktywnego kortyzonu w aktywny kortyzol, przyczyniając się do wzrostu krążących we krwi glukokortykosteroidów. Typ 2 (11 β -HSD2) działa przeciwnie, inaktywuje kortyzol i tym samym zapobiega jego wiązaniu z MR. Z tego względu, typ 2 enzymu występuje w tkankach

charakteryzujących się wysokim stężeniem receptora dla mineralokortykoidów. Jak wykazano na modelu zwierzęcym, 11β -HSD2 ulega ekspresji na wysokim poziomie np. w nerkach, gruczołach potowych, okrężnicy czy mięśniach gładkich naczyń krwionośnych [19].

Receptor glukokortykosteroidowy w swojej nieaktywnej formie – wielobiałkowego kompleksu złożonego z molekuł Hsp: dwu Hsp90, jednej Hsp70 i jednej Hsp56 – obecny jest głównie w cytoplazmie komórki. Ponadto, ten receptorowy kompleks jest stabilizowany także przez interakcje białkowo-białkowe np. z immunofilinami, białkiem opiekuńczym p23, kinazami aktywowanymi mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinases*, MAPKs), przez co utrzymywane jest wysokie powinowactwo GR do ligandów [42]. Przyłączenie ligandu do receptora (do molekuly $GR\alpha$) inicjuje oddysocjowanie się receptora od białek kompleksu i jego aktywację. Rozpoczyna się fosforylacja GR za pośrednictwem kinaz (MAPK, CDK oraz GSK-3) oraz zmiana jego konformacji. Zaktywowany w ten sposób receptor, w postaci kompleksu receptor-ligand, ulega przemieszczeniu z cytoplazmy do jądra przy udziale systemu białek transportujących, przez pory błony jądrowej (tzw. importyn) [11].

Oprócz fosforylacji, GR może podlegać innym potranslacyjnym modyfikacjom regulującym jego aktywność: ubikwitynacji, sumoilacji i acetylacji, [8].

W procesie aktywacji receptor homodimeryzuje, zmieniając powinowactwo do DNA, a także do koregulatorów transkrypcji genów docelowych. Zaktywowane homodimery GR działają w jądrze jako czynnik transkrypcyjny regulujący transkrypcję genów docelowych (indukowanie lub hamowanie ich ekspresji), poprzez bezpośrednią interakcję ze swoistymi elementami odpowiadającymi na glukokortykosteroidy (ang. *glucocorticoid response elements*; GREs). Sekwencje te, znajdują się w znacznych odległościach (>10kbp) od miejsca startu transkrypcji genów docelowych. Wykazano, że GREs są równomiernie rozmieszczone wokół regulowanych genów i obejmują miejsca wiązania wielu czynników transkrypcyjnych, a ich pozycja jest konserwatywna ewolucyjnie [41]. Uważa się, że geny indukowane przez steroidy posiadają sekwencje GREs pokrewne z elementami regulacyjnymi DNA, które mogą być aktywowane poprzez inne czynniki transkrypcji. Dotyczy to m.in. miejsc wiązania dla czynników transkrypcji: SP-1 (ang. *stimulatory protein-1*), NF- κ B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), CREB (ang. *cAMP response element binding*) czy AP-1 (ang. *activating protein -1*). Dostępność receptora do GREs jest zależna od swoistych koregulatorów transkrypcji (koaktywatorów lub korepresorów), regulujących wiązanie jądrowego GR z DNA. Efekt transkrypcji zależy od rodzaju ligandu i przyłączonego białka koregulatorowego – których rozmieszczenie jest swoiste tkankowo – a także od licznych potranslacyjnych modyfikacji, którym podlegają koaktywatory [16].

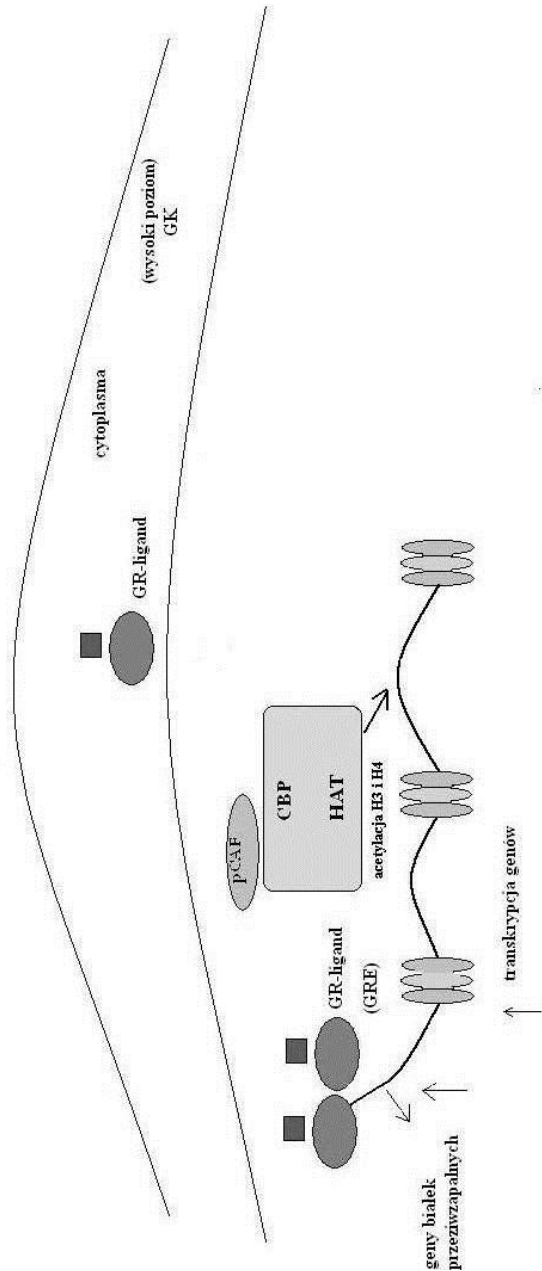
GENOMOWY I POZAGENOMOWY MECHANIZM DZIAŁANIA GK A REMODELING CHROMATYNY

Według klasycznej teorii, molekularny mechanizm działania aktywowanego GR w komórce można rozpatrywać jako mechanizm genomowy i pozagenomowy. Mechanizm genomowy działania glukokortykosteroidów polega na bezpośrednim lub pośrednim wpływie na transkrypcję genów kodujących mediatory procesu zapalnego. W pojedynczej komórce występuje 10-100 genów, których transkrypcja jest bezpośrednio regulowana przez glukokortykosteroidy na drodze wiązania się kompleksu GR-ligand do DNA [29]. Kompleks ten może, wraz z koaktywatorami transkrypcji, przyłączać się do regionu promotorowego genu docelowego poprzez elementy oddziałujące z GK, tzw. pozytywne sekwencje GREs (ang. *positive GREs*). W miejscu połączenia kompleksu GR-ligand z DNA dochodzi do rozluźnienia chromatyny, rozplecenia nici DNA i przyłączenia jądrowej polimerazy RNA II do kompleksu inicjacyjnego transkrypcji. Ten kompleks zawiera białka TBP (ang. *TATA-box binding protein*), które rozpoznają sekwencję TATA (ang. *TATA box*) w transkrybowanych genach [16,2,31,36,48]. W następstwie powyższego procesu, tzw. bezpośredniej transaktywacji, rozpoczyna się synteza białek o działaniu przeciwzapalnym. Proces ten dotyczy głównie aktywacji ekspresji genów dla białek: inhibitora czynnika izolowanego NF- κ B (ang. *inhibitor of NF- κ B*; I κ B), lipokortyny 1, receptora adrenergicznego typu β 2 (ang. *adrenergic receptor β 2*; ADRB2), fosfatazy-1 kinazy MAP (ang. *mitogen-activated protein kinase phosphatase-1*; MKP-1) oraz białka GILZ (ang. *glucocorticoid -induced leucine zipper protein*), które działa przeciwzapalnie poprzez hamowanie NF- κ B i AP-1, jak również inhibitora proteazy leukocytowej (ang. *secretory lymphocyte protease inhibitor*; SLPI), białka CC10 (białko komórek Klara), antagonisty receptora IL-1 a także aneksyny -1(ang. *annexins A1*; ANX A1) [2].

Podczas interakcji kompleksu GR-ligand z chromatyną dochodzi do zmian konformacyjnych w obrębie receptora oraz do rekrutowania licznych komodulatorowych białek. Powstają liczne kompleksy wielobiałkowe, zawierające podjednostki ATP-azowe, które umożliwiają ATP-zależne zmiany konformacyjne w nukleosomach. W następstwie powyższych zmian, dochodzi do przebudowy chromatyny.

Wykazano, że remodeling chromatyny zmienia ekspresję genów dla wielu komodulatorowych białek, wiąże się z ich potranslacyjną modyfikacją, co w efekcie zmienia wrażliwość tkanki na glukokortykosteroidy [36, 48]. Wśród komodulatorów, których zmieniona aktywność wiąże się z remodelingiem chromatyny, kluczowe znaczenie mają koaktywatory transkrypcji o aktywności acetylotransferaz histonów, HAT: CBP (ang. *CREB binding protein*) i pCAF (ang. *P300/CBP-associated factor*). Są one odpowiedzialne za acetylację histonów (H3 i H4) w nukleosomach i powstanie kompetentnej transkrypcyjnie chromatyny

o rozluźnionej strukturze. Rekrutacja białek o aktywności HAT, poprzez aktywny kompleks GR-ligand z udziałem sekwencji GRE, doprowadza do uruchomienia transkrypcji genów białek przeciwzapalnych. Mechanizm bezpośredniej transaktywacji genów przedstawiono na rycinie 2.

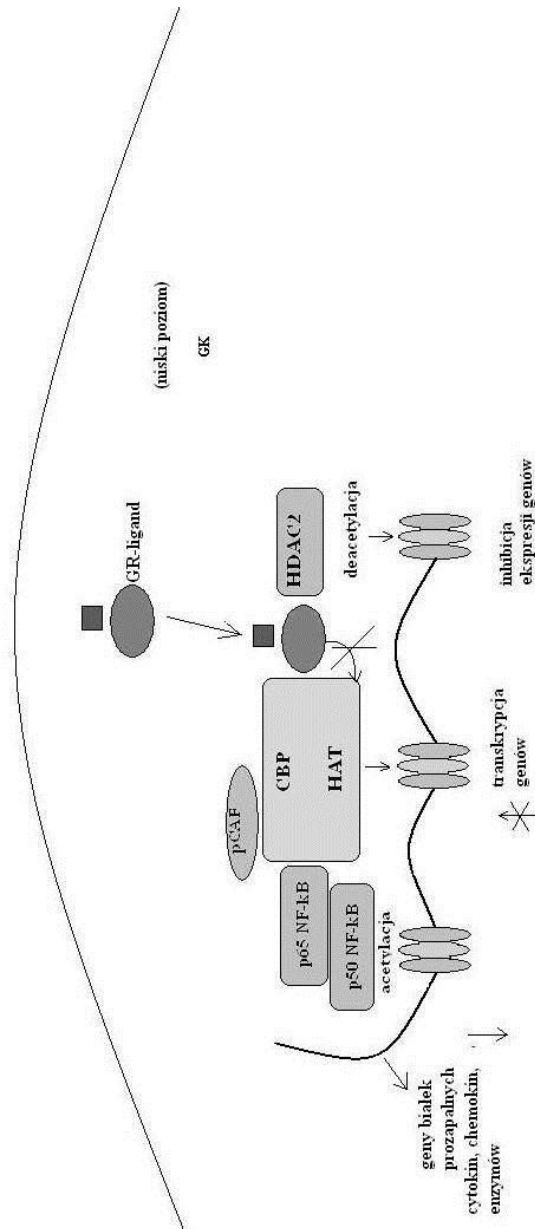


RYCINA 2. Bezpośrednia transaktywacja genów dla białek przeciwzapalnych poprzez oddziaływanie kompleksu GR – ligand poprzez GRE z koaktywatorami o aktywności wewnętrznej HAT (CBP, pCAF) – remodeling chromatyny
 FIGURE 2. Direct transactivation genes for inflammatory proteins by affecting GR complex - ligand through GRE with coactivators for internal HAT activity (CBP, pCAF) - chromatin remodeling

Powyższy efekt zmiany ekspresji genów dla białek przeciwzapalnych, uzyskuje się w przypadku obecności wysokiego poziomu endo lub/i egzogennych glukokortykosteroidów w komórce lub w przypadku obecności steroidów o zwiększonym powinowactwie receptorowym.

Glukokortykosteroidy, poprzez aktywny kompleks GR α – ligand z udziałem sekwencji GRE, mogą także hamować proces syntezy białek prozapalnych poprzez zwiększenie transkrypcji specyficznej rybonukleazy rozkładającej i redukującej stabilność mRNA mediatorów pozapalnych, posiadających sekwencje bogate w adeninę i uracyl (ang. *AU-rich elements*; ARE). Mechanizm ten dotyczy inhibicji: IL-1, IL-6, IL-8, TNF α (ang. *tumor necrosis factor-alpha*), GMC-SF (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), enzymu cyklooksygenazy 2 (ang. *cyclooxygenase-2*; COX-2) i eotaksyny. Inhibicja syntezy białek prozapalnych może zachodzić także poprzez interakcję z sekwencjami różnymi od GRE, tzw. negatywnymi GRE (ang. *negative GREs*; nGREs), w regionie promotorowym genów docelowych [29,9]. W wyniku tego procesu, tzw. transrepresji bezpośredniej, dochodzi do inhibicji ekspresji genów docelowych dla białek prozapalnych. Przykładem bezpośredniej transrepresji z udziałem GR jest hamowanie ekspresji genów dla proopiomelanokortyny, osteokalcyny czy prolaktyny. Wykazano jednak, że sekwencje nGRE nie występują we wszystkich regionach promotorowych genów. Tak więc modulowanie transkrypcji genów nie posiadających sekwencji nGRE (ang. *non-GRE-containing genes*), może być kompensowane poprzez interakcje kompleksu GR-ligand z jądrowymi czynnikami transkrypcyjnymi: białkiem aktywującym 1 (ang. *activator protein 1*; AP-1), występującym w formie kompleksu białkowego złożonego z dimeru białka Fos i Jun, NF- κ B oraz białkiem STAT5 (ang. *signal transducer and activator of transcription 5*) [47]. Wyżej wymieniony mechanizm, tzw. transrepresja pośrednia dotyczy wyciszania ekspresji większej liczby genów docelowych zaangażowanych w proces zapalenia [cytokin, chemokin, ich receptorów oraz enzymów uczestniczących w procesie zapalnym np. fosfolipazy A2 (ang. *phospholipase A2*; PLA2)]. Istotny jest fakt, że mechanizm ten związany jest z oddziaływaniem typu białko-białko (ang. *cross-talk*) aktywnego kompleksu GR α -ligand z licznymi koaktywatorami transkrypcji (p50NF- κ B, p65NF- κ B, pCAF) oraz szlakami sygnałowymi komórki, w wyniku czego hamowana jest ekspresja genów prozapalnych. Szczególnie oddziaływanie GR z NF- κ B hamuje białka o aktywności wewnętrznej HAT. Jednocześnie, dochodzi do rekrutacji koaktywatorów o aktywności deacetylazy histonów (HDAC). Wśród licznych HDAC (HDAC 1,2,3,8), głównie HDAC2 deacetyluje histony oraz niektóre czynniki transkrypcyjne np. GATA3, podjednostkę p65NF- κ B, wpływając na przebudowę chromatyny. Kluczowe znaczenie ma połączenie acetylowanej podjednostki p65NF κ B z I κ B, co prowadzi do inhibicji transkrypcji genów dla białek prozapalnych: cytokin – IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-16, IL-17, IL-18, TNF α , GMC-SF, chemokin RANTES (ang. *regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted*), MIP1a (ang. *macrophage*

inflammatory protein 1alpha), eotaksyny, enzymów – indukowanej syntetazy tlenku azotu (ang. *inducible nitric oxide synthases* ; iNOS), COX-2, fosfolipazy A2, receptorów neurokininowego (ang. *neurokinin receptor*) i bradykininowego (ang. *bradykinin receptor*) [3]. Opisany powyżej mechanizm – przykład pośredniej transrepresji genów – przedstawiono na rycinie 3.



RYCINA 3. Pośrednia transrepresja genów dla białek prozapalnych poprzez oddziaływanie kompleksu GR – ligand z koaktywatorami o aktywności wewnętrznej deacetylasy histonów HADC (szczególnie HDAC2) - remodeling chromatyny

FIGURE 3. Indirect transrepression genes for inflammatory proteins by affecting GR complex - ligand of coactivators with intrinsic activity of histone deacetylase HADC (especially HDAC2) - chromatin remodeling

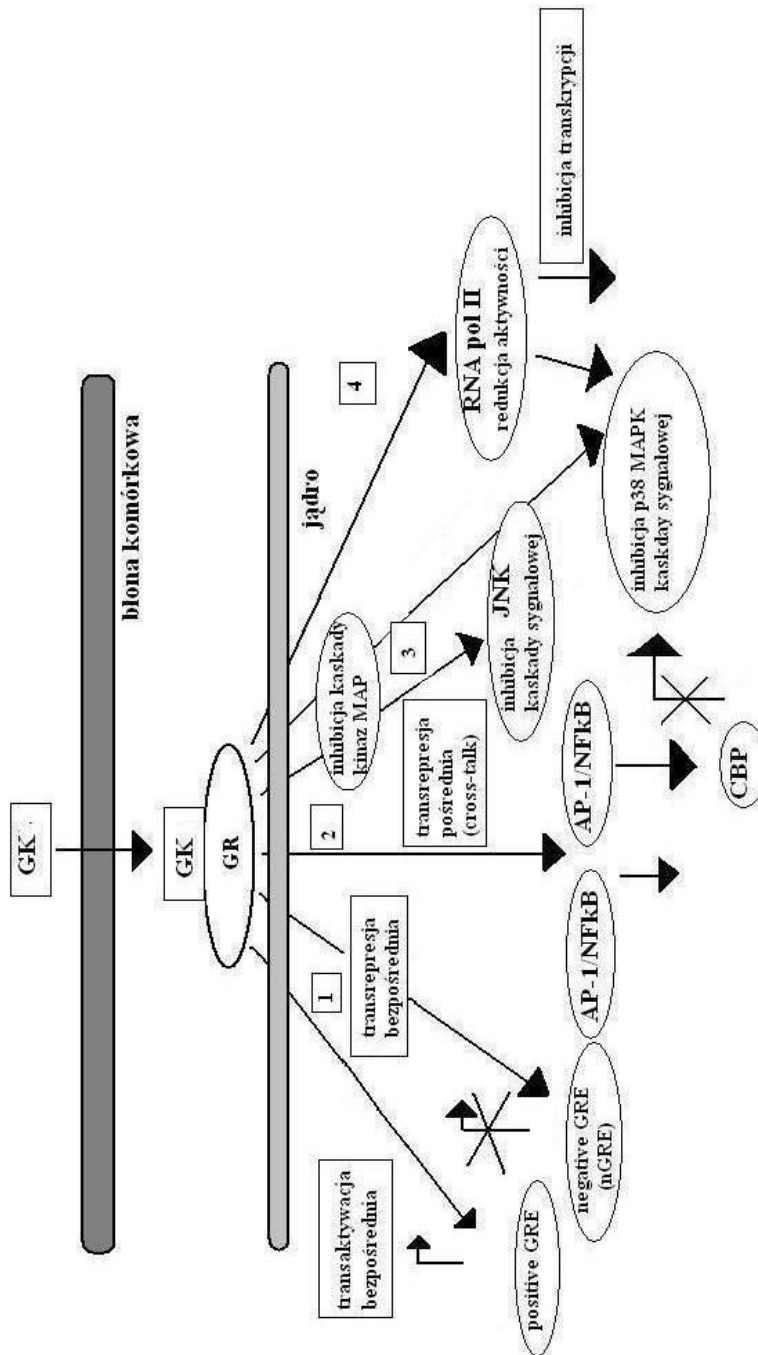
Wykazano, że HDAC2 jest w znacznym stopniu wrażliwy na utlenianie aktywnymi rodnikami tlenu, które powstały w komórce w okresie stresu oksydacyjnego. Aktywne rodniki tlenowe mają zdolność hamowania ekspresji HDAC2, przez co dochodzi do obniżenia jej aktywności na drodze degradacji w proteosomie.

Transrepresja pośrednia jest głównym mechanizmem regulacji odpowiedzi komórki na niski poziom endo lub/i egzogennych glukokortykosteroidów i tym samym regulacji procesu zapalnego organizmu. Kluczowe znaczenie w pośredniej transrepresji ma interakcja kompleksu GR-ligand z NF- κ B i AP-1, która głównie poprzez wpływ na RANTES, powoduje zahamowanie napływu eozynofili w miejsce zapalenia.

INTERAKCJE BIAŁKO-BIAŁKO POMIĘDZY GLUKOKORTYKOSTEROIDAMI A WEWNĄTRZKOMÓRKOWAMI UKŁADAMI SYGNALIZACYJNYMI

Molekularny mechanizm działania glukokortykosteroidów nie ogranicza się tylko do bezpośredniej interakcji aktywnego homodimeru GR α z elementami GRE lub nGRE w regionach promotorowych genów docelowych. Jak wspomniano wcześniej, dotyczy także interakcji białko-białko (*cross-talk*), szczególnie z czynnikami AP-1 i NF- κ B. Związany jest również z modulacją aktywności kinaz serynowo-treoninowych, będących elementami komórkowej kaskady sygnalizacyjnej MKKK/MAP3K-MKK/MAP2K-MAPK. Dodatkową drogą regulacji postranskrypcyjnej ekspresji genów jest redukcja aktywności polimerazy RNA II oraz zmniejszenie stabilności RNA mediatorów prozapalnych (ryc. 4).

Wykazano jednak, że MAPK odgrywają kluczową rolę w przebiegu odpowiedzi immunologicznej ustroju, poprzez regulację wrodzonych mechanizmów obronnych, różnicowanie limfocytów T i B, produkcję cytokin oraz wpływ na ich działanie [1]. Ponadto, wzajemne oddziaływanie pomiędzy białkami (ang. *cross-talk*) odpowiedzialne za interakcje wielu szlaków sygnałowych między sobą, ma wpływ na integrację płynących do komórki sygnałów i swoistość odpowiedzi. Tak więc, jak podkreślono wcześniej, udział GR w pozagenomowej postranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów prozapalnych – poprzez interakcje z kaskadą kinaz MAP – ma zasadnicze znaczenie w odpowiedzi komórki na glukokortykosteroidy.



RYCINA 4. Transkrypcyjna i posttranskrypcyjna regulacja ekspresji genów poprzez 1) bezpośrednią interakcję aktywowanego Gr z DNA (sekwencje GRE, nGRE), 2) interakcje białko-białko z czynnikami transkrypcyjnymi AP-1 NF-κB, 3) wpływ na wewnątrzkomórkowe kaskady kinaz MAP, 4) redukcję aktywności RNA polimerazy II oraz zmniejszenie stabilności RNA mediatorów prozapalnych

FIGURE 4. Post-transcription and transcription regulation of gene expression by 1) direct interaction of activated GR to DNA (GRE sequences, nGRE), 2) protein-protein interactions of transcription factors AP-1 NF-κappaB, 3) the effect on intracellular MAP kinase cascade, 4) reduction RNA polymerase II activity and reduced RNA stability of pro-inflammatory mediators

Aktywacja kaskady kinaz MAP związana jest z hierarchiczną fosforylacją funkcjonalnie zależnych od siebie kinaz MAP (do których zaliczane są rodziny ERK, JNK oraz p38), tworzących kaskadę RAS/ RAF/ MEK/ERK w odpowiedzi na czynniki wzrostowe np. EGF (ang. *epidermal growth factor*), IGF-1 (ang. *insulin-like growth factor 1*), cytokiny czy czynniki związane ze stresem komórkowym. Szlak sygnałowy MAPK może być aktywowany przez tyrozynowe kinazy receptorowe (ang. *receptor tyrosine kinases RTKs*), takie jak EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*), HER2 (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*), IGF-R1 lub c-MET, poprzez receptory integrynowe lub poprzez sygnały z kanałów jonowych. Aktywacja ta, w znacznym stopniu odpowiada za regulację aktywności genów prozapalnych i modulację odpowiedzi immunologicznej [1]. Wykazano, że substratami w aktywacji szlaku sygnałowego MAPK jest wiele białek, a wśród nich czynniki transkrypcyjne: Elk1, c-Myc, c-Fos, Jun, STAT3, ATF-2 (ang. *activating transcription factor 2*), MEF2 (ang. *myocyte enhancer factor-2*), NF- κ B czy AP-1, [26, 33, 34] jak również receptor glukokortykosteroidowy. Aktywacja kinaz MAP – szczególnie poprzez bezpośrednią aktywację kinaz JNK (ang. *Jun N-terminal kinase*) oraz czynników transkrypcyjnych c-Jun i ATF-2 – kieruje komórki na drogę apoptozy i wzmaga produkcję cytokin (IL-1 β , TNF- α) pod wpływem stresu oksydacyjnego [26, 34]. Jednocześnie dochodzi do fosforylacji N-terminalnej domeny receptora glukokortykosteroidowego za pośrednictwem kinazy JNK. Fosforylacja GR, osłabia jego zdolność translokacji do jądra komórkowego [2] oraz interakcji z genami docelowymi, obniża tym samym jego zdolność do inhibicji transkrypcji genów prozapalnych [20]. Wykazano, że interakcja białko-białko pomiędzy JNK a GR oraz innymi czynnikami transkrypcyjnymi, np. STAT5, podlega regulacji „z dołu” (ang. *downstream regulation*) zależnie od aktywowanego receptora cytokin (np. receptora IL-2). Wykazano także, że GR może działać synergicznie z poszczególnymi czynnikami transkrypcyjnymi (np. STAT5) w stosunku do regulowanych genów docelowych [15]. Inną ścieżką aktywacyjną kaskady kinaz MAP w odpowiedzi na cytokiny (np. IL-1, TNF α), jest aktywacja kinazy p38MAP, której efektorami są czynniki transkrypcyjne MEF2, Elk-1 oraz ATF-2. Dodatkowo, kaskada kinazy p38 reguluje produkcję TNF- α , poprzez postranskrypcyjną modyfikację transkryptów zawierających sekwencje ARE [6]. Wykazano również, że pozagenomowy mechanizm działania glukokortykosteroidów związany jest z powstaniem w komórce systemu wtórnych przekaźników np. Ca²⁺, cyklicznych nukleotydów: cAMP, cGMP, trójfosforanu inozytolu (ang. *inositol 1,4,5-triphosphate* ; IP3) czy diacyloglicerolu (ang. *diglyceride*; DAG). Wzrost aktywności określonego, wtórnego przekaźnika uruchamia kaskadę kinaz, która jest od niego funkcjonalnie zależna. W szczególności aktywacja kinazy białkowej C (ang. *protein kinase C*; PKC) stymuluje kaskadę Ras-ERK (ang. *Ras-extracellular signal-regulated kinase*) [49]. Dochodzi również do aktywacji szlaku kinaz MAP, kinazy białkowej A (PKA), kinaz tyrozynowych np. kinaza niereceptorowa c-Src (ang. *tyrosine-protein kinase*

SRC-1; c-Src) i lipidowych np. kinazy trójfosforanu inozytolu (ang. *phosphatidylinositol 3-kinases*; PI3K) [49]. Glukokortykosteroidy, w sposób bezpośredni lub pośrednio przez interakcje z receptorem błonowym i białkami adaptorowymi (podjednostki białka Gs), mogą także uruchamiać szlak sygnałowy Gs-cAMP-PKA i syntezę przeciwzapalnych endokannabinoidów. Efektem interakcji białko-białko i stymulacji poszczególnych kaskad sygnałowych z udziałem GK w komórce jest aktywacja czynników transkrypcyjnych (NF- κ B, AP-1, ATF-2) oraz związanych z nimi genów regulujących apoptozę i odpowiedź komórki na działanie stresora. Końcowym efektem działania GK jest modulacja ekspresji genów docelowych, zarówno -pro jak i przeciwzapalnych.

PODŁOŻE MOLEKULARNE TERAPII GLUKOKORTYKOSTEROIDAMI W PRZEBIEGU WYBRANYCH CHORÓB AUTOIMMUNOLOGICZNYCH I ZAPALNYCH

Glukokortykosteroidy zaliczane są do powszechnie stosowanej grupy leków w chorobach autoimmunologicznych i zapalnych [27, 43]. Wykazują one plejotropowy mechanizm działania o efekcie przeciwzapalnym i immunosupresyjnym. Jak opisano w pierwszej części artykułu, GK funkcjonują poprzez interakcję kompleksu GR-ligand: na drodze transaktywacji białek przeciwzapalnych (ang. *up-regulation*), m.in. - lipokortyny I, kalpektyny I, wydzielniczego inhibitora leukoproteazy (ang. *secretory leukoprotease inhibitor*; SLPI) lub transrepresji białek prozapalnych (ang. *down-regulation*), zmniejszając syntezę cytokin: m.in. interleukin IL-1, IL-2 i IL-6, IL-4 IL-5 i IL-8, chemokin, cytokin, GM-CSF, czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α), interferonu alfa i gamma (TNF- α , INF- γ) [32].

Udowodniono, że w warunkach fizjologicznych działanie immunosupresyjne GK związane jest z ich wpływem na rozwój i dojrzewanie tymocytów oraz na utrzymanie obwodowej homeostazy tych komórek. Funkcję dotyczącą GK udokumentowano w badaniach na modelu transgenicznych myszy [38]. Glukokortykosteroidy powodują immunosupresję, przyczyniając się również do redukcji liczby i aktywności limfocytów T stymulowanych antygenem lub miogেনem [37]. Udowodniono także, że GK indukują apoptozę niedojrzałych limfocytów T w grasicy, powodując tym samym niedobór odpowiedzi humoralnej.

Immunoregulacyjny mechanizm molekularnego działania GK, wiąże się ponadto z podwyższaniem ekspresji kluczowych w regulacji odpowiedzi immunologicznej cytokin, takich jak IL-4 i IL-10. Jednak głównym mechanizmem immunosupresji i osłabienia odpowiedzi układu immunologicznego zależnym od GK jest hamowanie NF- κ B, czynnika regulującego transkrypcję cytokin i białek adhezyjnych, które promują odpowiedź immunologiczną [40].

Hamowanie odpowiedzi komórkowej poprzez GK odbywa się na drodze obniżenia ekspresji genów kodujących cytokiny: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 i IFN- γ , z których najważniejsza jest IL-2 [27].

Obecnie przyjmuje się, że kluczowa rola GK w leczeniu procesu zapalnego wiąże się z ich wpływem na działanie cytokin. Jednak, jak opisano w pierwszych częściach pracy, równie istotne znaczenie ma ich udział w modulacji poziomu acetylacji histonów rdzeniowych (głównie H4) w powiązaniu z wpływem GK na zwiększoną (w procesie zapalnym) aktywność acetylotransferaz histonowych, tj. CBP i PCAF (ang. *p300/CBP-associated factor*) oraz wzrost ekspresji genów prozapalnych [21]. Dlatego też przyjmuje się, że acetylacja histonów odgrywa istotną rolę również w samym mechanizmie działania GK. W przypadku genów, których transkrypcja jest pobudzana przez GK (transaktywacja), wysokie stężenie GK, powoduje związanie kompleksu GR-GK z CBP i/lub innymi koaktywatorami, co prowadzi do acetylacji lizyn 5 i 16 (K5 i K16) histonu H4 receptora i zwiększonej transkrypcji genu [21].

Transrepresyjne działanie glukokortykosteroidów, wiąże się natomiast z rekrutacją deacetylazy histonowej (ang. *histone deacetylase*, HDAC) – enzymu o przeciwnym do HAT działaniu, który powoduje deacetylację GR. Receptor glukokortykosteroidowy po związaniu liganda ulega acetylacji, natomiast jego deacetylacja pod wpływem deacetylazy histonowej 2 (ang. *histone deacetylase 2*, HDAC2) umożliwia wiązanie z jądrowym czynnikiem transkrypcyjnym NF- κ B i tłumienie ekspresji genów prozapalnych, aktywowanych przez NF- κ B [39].

Efekt terapeutyczny i towarzyszące mu skutki uboczne, zależą m.in. od udziału konkretnego mechanizmu molekularnego (transaktywacja/transrepresja), poprzez który działają GK. Większość obserwowanych klinicznie skutków ubocznych leczenia GK związana jest z mechanizmem transaktywacji swoistych genów, natomiast zjawisko transrepresji uznawane jest za główną przyczynę osteoporozy czy supresji osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej [23]. Uważa się, że w uzyskaniu pozytywnego efektu terapeutycznego zasadnicze znaczenie może mieć zjawisko występowania w komórce oporności/ niewrażliwości na GK.

Odnosząc się do obserwacji klinicznych, dokonano podziału na pierwotną i wtórną niewrażliwość na leczenie GK. Wykazano, że mechanizm niewrażliwości pierwotnej jest uwarunkowany genetycznie i wiąże się z mutacją w obrębie genu kodującego receptor glukokortykosteroidowy (GR) [44]. W tej grupie chorych, brak odpowiedzi na stosowany GK już po pierwszym jego zastosowaniu, dotyczy wszystkich tkanek zarówno zdrowych jak i zmienionych zapalnie. Jednak, znacznie liczniejszą grupę chorych stanowią pacjenci z niewrażliwością wtórną na GK, która pojawia się w toku leczenia, z różnym nasileniem u poszczególnych pacjentów. Niewrażliwość wtórna związana jest z indukowanymi zaburzeniami immunologicznymi, nasileniem alergicznego procesu zapalnego i zwiększeniem wytwarzania interleukiny IL-2, IL-4 i IL-13. Dlatego też niewrażliwość wtórną określa się jako zależną od cytokin [24].

Wykazano, że mechanizmy oporności na GK, zarówno pierwotnej jak i wtórnej, są podobne i mogą mieć komponentę genetyczną. Dochodzi – szczególnie w limfocytach – do upośledzenia wiązania kompleksu GR-GK z sekwencjami GRE, spowodowanego wzrostem aktywności czynników transkrypcyjnych: AP-1 i NF- κ B oraz ich konkutowaniem z receptorem o miejsce wiązania z DNA [45]. Dodatkowo, zwiększona aktywność wytwarzanych w procesie zapalnym interleukin doprowadza do aktywacji kinazy JNK, co skutkuje zwiększeniem fosforylacji czynnika transkrypcyjnego AP-1 [45]. Ponadto, IL-2 pośrednio opóźnia przemieszczanie się kompleksu GR-GK do jądra komórkowego poprzez indukowanie czynnika transkrypcyjnego STAT5, który łącząc się z kompleksem zatrzymuje go w cytoplazmie [12].

Powyższe mechanizmy odpowiadają za brak skuteczności hamowania procesu zapalnego przez GK w przebiegu kilku chorób autoimmunologicznych i zapalnych, takich jak np. astma oskrzelowa, choroba Cohna czy SM. Ponadto, w świetle ostatnich wyników badań, transkrypcyjna przewaga alternatywnej *splicingowej* formy receptora GR β – o nieprawidłowej konformacji nad GR α (o prawidłowej strukturze przestrzennej) – uniemożliwia wiązanie GK z receptorem na zasadzie dominującego efektu ujemnego (ang. *dominant negative effect*) [35]. Zwiększone stężenie GR β stwierdzono m.in. u pacjentów z astmą niewrażliwą na GK [5] czy chorobą Crohna [17]. Brak skuteczności leczenia glukokortykosteroidami, wiąże się także ze zmianą poziomu acetylacji/deacetylacji histonów rdzeniowych w receptorze. U pacjentów chorych na astmę oskrzelową oporną na GK, stwierdzono obniżony poziom acetylacji K5 w H4, co może stanowić mechanizm powiązany z zaburzeniami transaktywacyjnej funkcji GK w przebiegu tej choroby [30].

Dodatkowo, u osób chorych na astmę oskrzelową leczonych wziewnymi kortykosteroidami, stwierdzono większą aktywność HDAC w porównaniu do osób nieleczonych oraz obniżony poziom aktywności HAT [22,7]. W przypadku pacjentów niewrażliwych na działanie GK, zaobserwowano zmniejszoną aktywność i ekspresję HDAC2 w makrofagach pęcherzykowych, co korelowało ze stopniem ciężkości choroby [18]. Również w przypadku innego schorzenia o podłożu zapalnym, POChP, zaobserwowano obniżenie aktywności deacetylaz histonowych, tj. HDAC2, HDAC5 i HDAC8, korelujące ze stopniem ciężkości choroby [21]. Jak wykazano, utrata aktywności HDAC2 nie wpłynęła na translokację GR do jądra czy wiązanie GR z sekwencją GRE w DNA, ale uniemożliwiła związanie GR z NF- κ B [39]. Rola HDAC2 w mechanizmie niewrażliwości na GK, została potwierdzona w badaniu *in vitro*, w którym nadekspresja HDAC2 w makrofagach pęcherzykowych pacjentów chorych na POChP przywróciła wrażliwość na GK [39]. Wyniki tych badań potwierdzają znaczenie zmian poziomu acetylacji/deacetylacji histonów rdzeniowych w mechanizmie terapeutycznego działania GK. Reasumując, można zauważyć, że plejotropowe działanie GK w komórkach oraz ich efektywne działanie przeciwzapalne i immunomodulacyjne w terapii, zależy od złożonych,

molekularnych interakcji pomiędzy monomerami GR a czynnikami transkrypcji: głównie NF- κ B, AP-1, koaktywatorami oraz remodelingiem chromatyny związanym z modyfikacjami histonów rdzeniowych, głównie poprzez aktywność deacetylaz/deacetylaz histonowych.

PODSUMOWANIE

Pomimo powszechnie przyjętego, jednoznacznego podziału na genomowy i pozagenomowy mechanizm działania GK w komórce, wydaje się, że istnieje swoiste, funkcjonalne połączenie pomiędzy GK a klasycznymi receptorami błonowymi lub cytozolowymi oraz szeregiem białek adaptorowych i białek sygnałowych. Interakcja z kaskadą kinaz MAP, aktywacja wtórnych przekaźników oraz szlaku Gs-cAMP-PKA, jest spójnym molekularnym mechanizmem działania GK w komórce. Obecnie przyjmuje się, że zależy on przede wszystkim od dawek endogennych lub/i egzogennych glukokortykosteroidów, stężenia miejscowego ligandu w komórce, jego dostępności a także powinowactwa z receptorem. Przyjmuje się także, że pozagenomowy mechanizm działania GK stanowi I etap, wzmacniany wtórnie poprzez efekt genomowy – tworząc w komórce pozagenomowo-genomowy mechanizm, oparty głównie na przebudowie chromatyny i interakcji białko-białko pomiędzy GK, czynnikami transkrypcyjnymi, białkami adaptorowymi i kinazami należącymi do różnych szlaków sygnałowych komórki, w których wiodącą rolę odgrywa kaskada kinaz MAP.

Poznanie molekularnych podstaw działania GK jest istotne z punktu widzenia klinicznego. Pozwala na zrozumienie efektu niewrażliwości na leczenie GK, jak również nadwrażliwości na tę grupę leków u niektórych pacjentów, co jest niezbędne do uzyskania prawidłowej kontroli leczenia choroby. Warto podkreślić, że niewrażliwość na GK jest wciąż istotnym problemem klinicznym w przebiegu wielu chorób autoimmunologicznych i zapalnych, w tym w astmie, POChP, chorobie Crohna czy stwardnieniu rozsianym.

LITERATURA

- [1] Ashwell JD. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**: 532-540.
- [2] Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation. Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol* 2006; **148**: 245-254.
- [3] Barnes PJ. Molecular mechanisms of steroid action in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; **26**: 18.
- [4] Boumays DT, Chrousos GP, Wilder RL. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Int Med* 1993; **119**: 1198-1208.
- [5] Chan MT, Leung DY, Szeffler SJ. Difficult-to-control asthma: clinical characteristics of steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; **101**: 594-601.
- [6] Cook R, Wu CC, Kang YJ. The role of the p38 pathway in adaptive immunity. *Cell Mol Immunol* 2007; **4**: 253-259.
- [7] Cosío BG, Mann B, Ito K. Histone acetylase and deacetylase activity in alveolar macrophages and blood monocytes in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; **170**: 141-7.

- [8] Davies L, Karthikeyan N, Lynch JT. Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol Endocrinol* 2008; **22**: 1331-1334.
- [9] Dostert A, Heinzl T. Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr Pharm Des* 2004; **10**: 2807-2816.
- [10] Germain P, Staels B, Dacquet C. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2006; **58**: 685-704.
- [11] Glass CK. Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2006; **116**: 556-560.
- [12] Goleva E, Kisich KO, Leung DY. A role for STAT5 in the pathogenesis of IL-2 induced glucocorticoid resistance. *J Immunol* 2002; **169**: 5934-5940.
- [13] Gross KL, Cidlowski JA. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab* 2008; **19**: 331-339.
- [14] Gross KL, Lu NZ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2009; **300**: 7-16.
- [15] Groner B. Transcription factor regulation in mammary epithelial cells. *Domest Anim Endocrinol* 2002; **23**: 25-32.
- [16] Han SJ, Demayo FJ, Xu J. Steroid receptor coactivator (SRC)-1 and SRC-3 differentially modulate tissue-specific activation functions of the progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 2006; **20**: 45-55.
- [17] Hearing SD, Norman M, Probert CS. Predicting therapeutic outcome in severe ulcerative colitis by measuring in vitro steroid sensitivity of proliferating peripheral blood lymphocytes. *Gut* 1999; **45**: 382-388.
- [18] Hew M, Bhavsar P, Torrego A. Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; **174**: 134-141.
- [19] Holmes MC, Sangra M, French KL. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 protects the neonatal cerebellum from deleterious effects of glucocorticoids. *Neuroscience* 2006; **137**: 865-873.
- [20] Ismaili N, Garabedian MJ. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 2004; **1024**: 86-101.
- [21] Ito K, Ito M, Elliott WM. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2005; **352**: 1967-1976.
- [22] Ito K, Caramori G, Lim S. Expression and activity of histone deacetylases in human asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **166**: 392-396.
- [23] Jaffuel D, Demoly P, Gougat C. Transcriptional potencies of inhaled glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Jul; **162**: 57-63.
- [24] Kam JC, Szeffler SJ, Surs W. Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. *J Immunol* 1993; **151**: 3460-3466.
- [25] Kino T, Chrousos GP. Glucocorticoid and mineralocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes. *J Endocrinol* 2001; **169**: 437-445.
- [26] Klein A. *Molekularne podstawy regulacji hormonalnej*, Wyd UJ, Kraków, 2002.
- [27] Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003; **111**: 3-22.
- [28] Lu NZ, Cidlowski JA. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci* 2004; **1024**: 102-123.
- [29] Muller M, Renkawitz R. The glucocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1088**: 171.
- [30] Matthews JG, Ito K, Barnes PJ. Defective glucocorticoid receptor nuclear translocation and altered histone acetylation patterns in glucocorticoid-resistant patients. *J Allergy Clin Immunol* 2004; **113**: 1100-1108.
- [31] Nawaz Z, O'Malley BW. Urban renewal in the nucleus: is protein turnover by proteasomes absolutely required for nuclear receptor-regulated transcription? *Mol Endocrinol* 2004; **18**: 493-499.
- [32] Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 2000; **55**: 603-13.
- [33] Nishimoto S, Nishida E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *Embo rp* 2006; **7**: 782-786.
- [34] Nowak JZ, Zawilska JB. *Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału*, PWN, Warszawa, 2004.
- [35] Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* 1999; **274**: 27857-27866.
- [36] O'Malley BW. A life-long search for the molecular pathways of steroid hormone action. *Mol Endocrinol* 2005; **19**: 1402-1411

- [37] Pachner AR. Immunosuppressive therapy; targeting the autoantigen in neurologic disease. *Adv Neurol* 1997; **4**: 3–8.
- [38] Pazirandeh A, Xue Y, Prestegard T. Effects of altered glucocorticoid sensitivity in the T cell lineage on thymocyte and T cell homeostasis. *J Faseb* 2002; **16**: 727–9.
- [39] Pratt WB, Morishima Y, Murphy M. Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2006; **172**: 111–138.
- [40] Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005; **353**: 1711–23.
- [41] So AY, Chaivorapol C, Bolton EC. Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet* 2007; **3**: 94.
- [42] Stahn C, Buttgerit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; **4**: 525–533.
- [43] Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *J Endocrinol* 2001; **169**: 429–435.
- [44] Sher ER, Leung DY, Surs W. Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy. *J Clin Invest* 1994; **93**: 33–39.
- [45] Sousa AR, Lane SJ, Soh C. In vivo resistance to corticosteroids in bronchial asthma is associated with enhanced phosphorylation of JUN N-terminal kinase and failure of prednisolone to inhibit JUN N-terminal kinase phosphorylation. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; **104**: 565–574.
- [46] Van der Laan S, Meijer OC. Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors. *Eur J Pharmacol* 2008; **585**: 483–491.
- [47] Wang JC, Shah N, Pantoja C. Novel arylpyrazole compounds selectively modulate glucocorticoid receptor regulatory activity. *Genes Dev* 2006; **20**: 689–699.
- [48] Wu RC, Smith CL, O'Malley BW. Transcriptional regulation by steroid receptor coactivator phosphorylation. *Endocr Rev* 2005; **26**: 393–399.
- [49] Zhang Y, Dong C. Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**: 2771–2789.

Redaktor prowadzący – M. Nowicki

Otrzymano: 16.01.2012

Przyjęto: 13.03.2012

Daria Domańska

Zakład Molekularnych Podstaw Medycyny

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

ul. Pomorska 251 bud. C-5, 92-213 Łódź

tel.: 42 675 77 15

fax: 42 675 77 12

e-mail: ddomanska28@gmail.com

