

NYA GLUKOKORTIKOIDER GÖRS MER SELEKTIVA

Dagens kunskaper kan eliminera allvarliga biverkningar

Glukokortikoider har sedan början av 1940-talet använts som anti-inflammatoriska, anti-allergiska och immunsuppressiva läkemedel. Under de senaste åren har glukokortikoiders anti-inflammatoriska mekanismer börjat klarna. Dessvärre leder långtidsbehandling med glukokortikoider till en rad negativa effekter, t ex högt blodtryck, benskörhet, diabetes, hudförtunning och personlighetsförändringar. Dagens nya kunskaper om molekylära mekanismer och utvecklingen inom biotekniken ger dock möjligheter till framtagande av nya glukokortikoider med en mer selektiv anti-inflammatorisk effekt utan allvarliga biverkningar.

Hormonreceptorfamiljen

Hormoner som kemiskt sett är små molekyler (t ex binjurebarkshormoner eller glukokortikoider och östradiol) spelar en viktig roll i kroppen t ex för differentieringen av specifika celler och organ samt för upprätthållande av metabolism balans. Deras effekter förmedlas via hormonreceptorer, en receptor för varje hormon, tillhörande en ständigt växande proteinfamilj som kallas steroid/tyreoideahormonreceptorfamiljen [1].

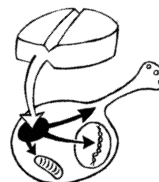
Denna familj av receptorproteiner omfattar idag närmare 60 olika medlemmar varav de mest kända är recepto-

terna för steroidhormonerna glukokortikoider (kortisol eller hydrokortison), mineralokortikoider (kortikosteron och aldosteron), könshormoner (testosteron och östradiol) och gulkroppshormonet progesteron.

Dessutom omfattar steroid/tyreoideahormonreceptorfamiljen receptorer för vitamin A respektive vitamin D samt sköldkörtelhormonerna T3 och T4. För de flesta receptorerna inom denna familj känner man dock ännu ej till någon hormonell eller kemisk substans som binder till receptorproteinet, och dessa receptorer kallas därför »orphan» eller föräldralösa receptorer.

Verkningsmekanism

Det som är gemensamt för denna familj av hormonreceptorproteiner är deras strukturella domänuppbyggnad (Figur 1) samt deras funktion som hormonberoende transkriptionsfaktorer [1], dvs deras förmåga att kunna reglera produktionen av ett visst protein/vissa proteiner i olika celler i närvaro av sitt hormon. Denna förmåga att kunna öka eller minska mängden av ett visst proteins/vissa proteiners närvaro i eller kring en cell leder till att cellen och dess omgivning får ett förändrat beteende. Generellt anses det gå till så att hormonerna som transporteras i blodbanan bundna till transportproteiner kan diffundera igenom cellmembranet in i cellen där de olika receptorproteinerna passivt ligger och väntar. När ett specifikt hormon binder till sin receptor inne i cellen sker en rad händelser som leder till att receptorn aktiveras (som att stoppa in nyckeln i bilens tändningslås och vrida om), vilket bl a innebär att hormonreceptorkomplexet söker upp och binder till specifika DNA-sekvenser, s k hormonresponsiva element (HRE), vilka finns i anslutning till vissa gener i cellens genetiska arkiv (genomet), och på så vis kan receptorn påverka produktionen av det/de proteiner som genen/generna kodar för (Figur 2). Förutom att hormonaktiverade receptorproteiner kan styra uttrycket från gener via bindning till HRE (direkt effekt) kan de även reglera uttrycket av gener genom att bilda s k protein:protein-komplex med andra transkriptionsfaktorer



SERIE

Läkemedelsmekanismer

(indirekt effekt) tillhörande andra proteinfamiljer [2].

Det har beräknats att ett hormon och dess receptor på ett direkt sätt, via bindning till HRE, kan reglera syntesen av proteiner från mellan 10 och 100 gener per cell, men ett stort antal gener i en cell är också indirekt styrda av hormonreceptorer via andra mekanismer. Totalt anses cellens genetiska arkiv innehålla information för omkring 100 000 olika proteiner.

Glukokortikoider

Glukokortikoider tillhör hormongruppen kortikosteroider som syntetiseras i binjurebarken där kolesterol utgör prekursor för syntes av kortisol/hydrokortison, som är det naturliga binjurebarkshormonet hos människa. Visserligen hänför sig namnet glukokortikoid till dess glukosreglerande egenskaper, men detta är bara en del av dess livsviktiga roll. Glukokortikoider är också involverade i kolhydrat-, lipid- och proteinmetabolismen samt i regleringen av det inflammatoriska/immunologiska svaret i kroppen. Dessutom påverkar de vertebraters tillväxt och utveckling, benmetabolismen, vissa delar av CNS-aktiviteten samt förmågan att klara stressituationer.

Effekten på den inflammatoriska processen

Alltsedan andra världskriget, när kortison för första gången användes för behandling av reumatoid artrit, har glukokortikoider utgjort en hörnsten för behandling av inflammatoriska och immunologiska sjukdomstillstånd. Glukokortikoider reglerar det inflammatoriska svaret genom att påverka tillväxten, utmognaden/differentieringen och funktionen hos många olika typer av celler som är involverade i den inflammatoriska processen [4]. De inhiberar leukocyters transport till stället för in-

Författare

STEFAN NILSSON

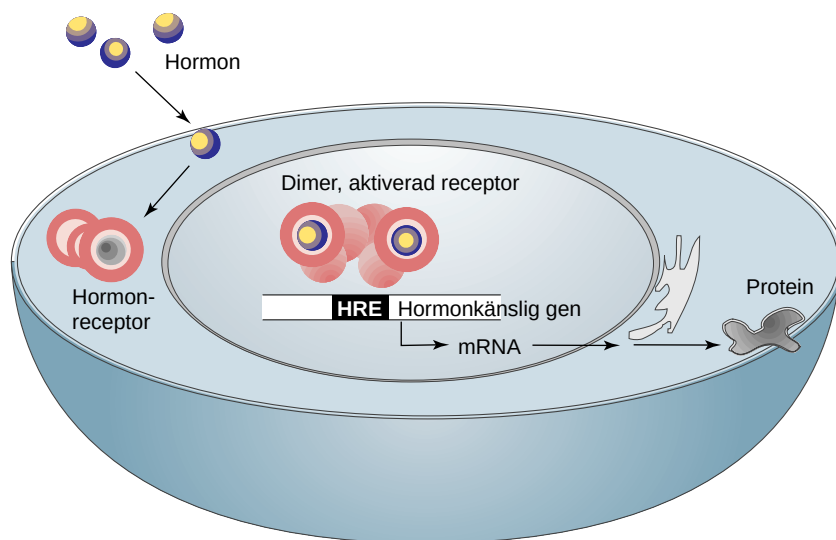
dr med, ställföreträdande forskningschef och ansvarig för explorativ forskning, Karo Bio AB, Novum, Huddinge

JAN-ÅKE GUSTAFSSON

professor i medicinsk näringslära, Karolinska institutet, VD vid Centrum för Bioteknik, Novum, Huddinge.



Figur 1. Schematisk bild av steroid/tyreoideahormonreceptorernas strukturella uppbyggnad. I de flesta fall presenteras receptorernas uppbyggnad i domäner: den N-terminala A/B-domänen följd av den DNA-bindande C-domänen, D- eller den s k hinge-domänen och slutligen den C-terminala ligandbindande domänen som även benämns E/F-domänen. Olika funktioner hos receptorerna har lokaliserats till de olika receptordomänerna. Karakteristiskt för denna familj av receptorer är C-domänens Zn-finger-struktur, vilken är essentiell för receptorernas DNA-bindande förmåga. Kommunikation mellan receptorerna och andra proteiner sker över regionerna för transkriptionsaktivering som återfinns i både A/B- och E/F-domänerna. Mer eller mindre hela E/F-domänen förefaller nödvändig för att receptorerna skall kunna binda sina respektive hormoner. Övriga funktioner av betydelse för receptorernas roll som transkriptionsfaktorer är en aminosyrasekvens som underlättar deras lokalisering till cellkärnan (kärnlokaliseringssignal) samt deras förmåga att bilda dimer med sig själva eller andra receptorer inom familjen. För vissa av receptorerna har komplexbildning med hsp90 och andra liknande proteiner betydelse för deras livslängd och förmåga att binda ligand.



Figur 2. Generell bild som kort beskriver hormonreceptorernas roll som transkriptionsfaktorer och modulatorer av hormonkänsliga gener. De flesta hormonerna tros kunna passera cellmembranet genom passiv diffusion. Inne i cellen binder hormonerna till sina respektive receptorer varvid receptorerna aktiveras, vilket bl a innebär att de kan påverka uttrycket av sin/sina målgener via bindning till hormonresponsiva element (HRE). Ett förändrat uttryck av en specifik genprodukt (protein) kommer att påverka cellens funktion och beteende.

inflammationen och deras utsöndring av diverse ämnen. Glukokortikoider påverkar också funktionen hos fibroblaster, epitelceller i luftvägarna och endotelceller i kärlväggen i närheten av inflammationsstället. Glukokortikoiderna utövar dessa effekter huvudsakligen genom att stimulera eller hämma uttrycket från specifika gener.

Orkestrerat av cytokiner

Inflammationsförloppet är orkestrerat av ett antal s k cytokiner som fungerar som kemotaktiska substanser och som aktivatorer av en rad olika cellpopulationer som deltar i det inflammatoriska svaret. Pro-inflammatoriska cytokiner som interleukinerna IL-1, IL-6, IL-8, kemokinen RANTES (regulated upon activation, normal T expressed,

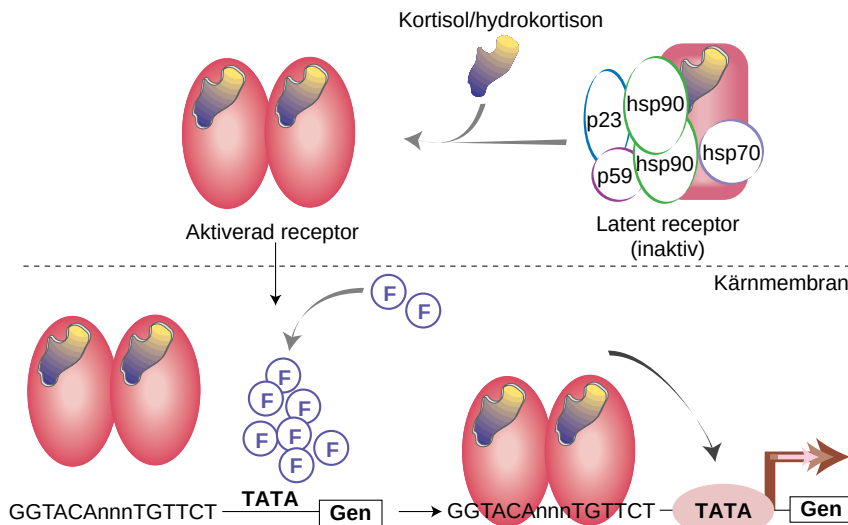
and presumatly secreted) [5] och TNF α (tumörnekrosfaktor α) är några av de faktorer som spelar en viktig roll i den inflammatoriska processen, och mönstret av uttryckta cytokiner avgör till stor del karaktären och längden på det inflammatoriska svaret. Glukokortikoider är potenta hämmare av den cytokinmedierade inflammationen genom att minska eller stoppa uttrycket av cytokiner men även genom att hämma den biologiska effekten av dessa inflammatoriska budbärare. De gör det t ex genom att minska uttrycket av IL-2-receptorn som förmedlar den biologiska effekten av IL-2 eller neurokinin-1(NK-1)-receptorn, vilken medierar den inflammatoriska effekten av substans P i luftvägarna [6, 7], eller genom att hämma den cytokinmedierade induktionen av andra

gener vars genprodukter direkt eller indirekt deltar i det inflammatoriska förloppet.

Makrofager, granulocyter, mastceller och lymfocyter

Glukokortikoider motverkar utmognaden av makrofager samt hämmar deras uttryck och utsöndring av bl a cytokinerna IL-1, IL-6 och TNF α , produktion och sekretion av prostaglandiner och leukotriener samt uttryck av »major histocompatibility complex class II» (MHC klass II). Dessutom minskar glukokortikoider den bakteriedödande effekten hos aktiverade makrofager.

Effekten av glukokortikoider på neutrofiler förefaller främst vara en påverkan på deras förmåga att adherera till endotelcellerna i kärlväggen och där-



Figur 3. Schematisk beskrivning av hormonell aktivering av uttrycket från en glukokortikoidkänslig gen. När en glukokortikoid, t ex kortisol/hydrokortison, binder till GR sker en förändring av receptorproteinets tredimensionella struktur varvid två GR-molekyler bildar par med varandra (dimer) och vandrar in i cellkärnan. Inne i cellkärnan binder GR-GR-dimeren till sitt glukokortikoidresponselement (GRE) och bidrar till rekryteringen av ett antal proteiner, s k basala transkriptionsfaktorer inklusive RNA polymeras II (F), vilka binder till den s k TATA-boxen varifrån avläsningen av en gen styrs. Kommunikationen mellan de hormonaktiverade GR-molekylerna och de basala transkriptionsfaktorerna resulterar i en avläsning av den kortisolkänsliga genen och till syntes av det protein som genen kodar för.

Mekanismen för glukokortikoidreceptorns effekt på genuttrycket via glukokortikoidresponselement

Glukokortikoidreceptorn (GR) förmedlar den biologiska effekten av både naturliga (kortisol/hydrokortison) och syntetiska (t ex agonisterna dexametason, prednisolon och antagonisterna RU486 och ZK 98296) glukokortikoider. I frånvaro av sitt hormon finns GR latent i cellens cytoplasma komplexbunden till en rad proteiner såsom »heat shock»-proteinerna hsp90, hsp70, p23 och immunofilin p59 [3]. Hsp90 anses spela en viktig roll för receptorns stabilitet och livslängd i cellen och för dess förmåga att binda sitt hormon. När glukokortikoider (t ex kortisol) binder till den ligandbin-

dande domänen av GR sker en förändring av receptorns form varvid hsp90 och de andra associerade proteinerna släpper, vilket bl a medför att de hormonbundna glukokortikoidreceptorerna kan vandra in i cellkärnan via kärnans porer (Figur 3). Inne i cellkärnan binder sedan hormon-GR-molekylerna till specifika DNA-sekvenser, s k glukokortikoidresponselement (GRE) vilka vanligen är lokaliserade uppströms om den proteinkodande delen i en glukokortikoidresponsiv gen, till genens s k promotordel (Figur 3). Bindning av hormon-GR-komplexet till DNA leder bl a till en rekrytering av basala transkriptionsfaktorer och till att hastigheten varmed en gen avläses till budbärar-RNA (mRNA) förändras, antingen så att genen stimuleras till ökat

uttryck (induktion) eller till ett minskat uttryck (repression). Stimulering av genuttryck sker oftast via bindning till GRE med konsensus DNA-sekvensen

5'-GGTACAnnnTGTCT-3' medan repression sker via s k negativa GRE, som har en mer variabel sekvens. I de flesta fall räcker det dock inte bara med att hormonaktiverad GR binder till sitt GRE och rekryterar basala transkriptionsfaktorer för att en glukokortikoidkänslig gens uttryck skall förändras, utan effekten beror också på närvaron av andra både DNA-bindande och icke DNA-bindande proteiner (transkriptionsfaktorer respektive co-aktivatörer) och kvaliteten på interaktionen/kommunikationen mellan GR och dessa proteiner.

med på neutrofilers ansamling vid inflammationsstället.

Glukokortikoider reducerar antalet cirkulerande eosinofiler och basofiler. De minskar överlevnaden hos eosinofiler troligen genom att blockera effekten av IL-5 och GM-CSF (granulocyt-makrofagkolonistimulerande faktor), vilket leder till programmerad celldöd (apoptos). Dessutom reducerar glukokortikoider eosinofilers och mastcellers ackumulering till stället för allergiska reaktioner. Vidare påverkar glukokortikoider den IgE-beroende frisättningen av histamin och leukotrien C4 från basofiler.

Transkriptionell induktion

Antigenstimulerade T-celler visar transkriptionell induktion av ett antal interleukingener och en ökad produktion och sekretion av IL-1, -2, -3, -4 och -6, interferon- γ samt IL-2-receptorn.

Cytokiner och framförallt IL-2/IL-2-receptorn spelar en viktig roll för aktiveringen av T-celler och deras funktion. Glukokortikoider inhiberar både produktionen och den biologiska effekten av cytokiner, vilket resulterar i en blockering av T-cellsaktivering och T-cellers funktion. Dessutom orsakar glukokortikoider en övergående lymfocytopeni, vilket huvudsakligen anses bero på en omlokalisering av lymfocyter till benvävnad.

Glukokortikoider har ingen direkt negativ effekt på B-cellers antikroppsproducerande förmåga. Men den inhiberande effekten glukokortikoider utövar på uttrycket och produktionen av cytokiner och på differentieringen och funktionen hos T-celler kan på längre sikt påverka antikroppsproduktionen eftersom utmognaden av aktiverade B-celler till antikroppsproducerande B-celler är beroende av samverkan mellan

B- och hjälp-T-celler och cytokinsekretionen från hjälp-T-celler och makrofager.

Kärlendotelceller

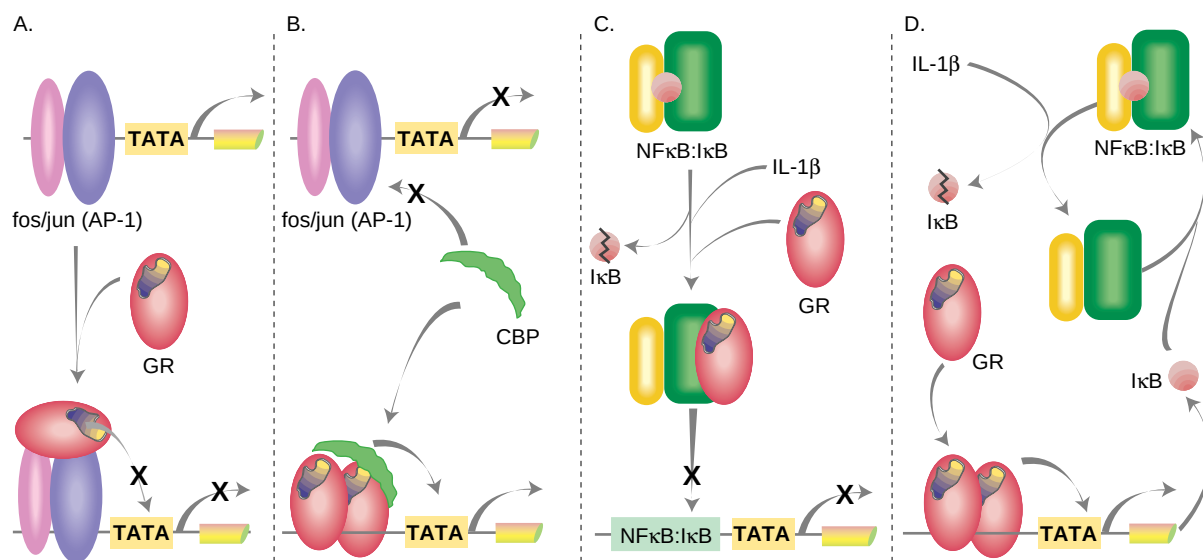
Endotelceller fungerar som en barriär mellan blodbanan och övrig vävnad och som ett filter varigenom leukocyter, monocyter och lymfocyter kan passera som svar på ett inflammatoriskt och immunologiskt tillstånd orsakat av en skada i vävnaden. Leukocyter penetrerar detta filter stimulerade av frisättningen av kemotaktiska molekyler från endotelceller och andra celler i eller kring den skadade vävnaden. En förutsättning för att leukocyterna skall kunna penetrera kärlväggen är dock förekomsten av s k adhesionsproteiner på cellytan hos både endotelcellerna och leukocyterna [4, 8].

På ytan av endotelcellerna spelar bl a adhesionsproteinerna ICAM-1 (inter-

Figur 4. Schematiska modeller för hur man tänker sig att glukokortikoidaktiverad GR hämmar uttrycket av inflammatoriska gener styrda av transkriptionsfaktorerna AP-1 och NFκB. (A) AP-1(fos/jun)-beroende gentranskription hämmas av glukokortikoidaktiverad GR genom att GR bildar ett inhibitoriskt komplex med AP-1 sittande på sitt AP-1-responselement eller (B) genom att GR och AP-1 tävlar om att attrahera co-

aktivatorn CBP. (C) NFκB (p50:Rel) är lokaliserad till cytoplasman komplexbunden med inhibitorproteinet IκB i sitt inaktiva tillstånd. Vid stimulering av cellen med cytokiner, t ex IL-1β, aktiveras NFκB genom att IκB fosforyleras och bryts ned varvid NFκB kan vandra in i cellkärnan. Om cellerna samtidigt exponeras för glukokortikoider kommer GR att kunna bilda ett inhibitoriskt komplex med RelA-enheten i NFκB och på så sätt

hindra att NFκB binder till sitt responselement och aktiverar uttrycket av inflammatoriska gener. (D) Glukokortikoider har även beskrivits kunna hämma NFκB-beroende uttryck av inflammatoriska gener genom att glukokortikoidaktiverad GR kan stimulera syntesen av inhibitorproteinet IκB, vilket komplexbinder och återför aktiverad NFκB till cytoplasman.



Mekanismen för glukokortikoiders anti-inflammatoriska effekter:

Inhibition av transkriptionsfaktorn AP-1

AP-1 är en familj av transkriptionsfaktorer [13] som via AP-1-bindande DNA-sekvenser (5'-TGAGTCAG-3') reglerar uttrycket från gener essentiella för aktivering av de immunogena och inflammatoriska svaren. Den mest studerade formen av AP-1 är ett komplex bestående av de två proteinerna c-jun och c-fos. Den transkriptionella aktiviteten hos AP-1 regleras av tillväxtfaktorer, cytokiner, carcinogener och andra stimuli som aktiverar cellens signaltransduktionssystem.

Glukokortikoiders repression av den transkriptionella aktiviteten hos AP-1 har visats vara medierad via GR, antingen genom att glukokortikoidaktiverad GR bildar ett protein:protein-komplex direkt med AP-1 (Figur 4 A) [11, 14] och/eller genom att GR och AP-1 konkurrerar om att kunna attrahera den i mängd begränsade co-aktivatorn CBP (CREB binding protein) [15] (Figur 4 B), vilken är essentiell för den transkriptionella aktiviteten hos ett flertal olika transkriptionsfaktorer.

Inhibition av transkriptionsfaktorn NFκB

Transkriptionsfaktorn NFκB är medlem av Rel-familjen av transkriptionsfaktorer. Liksom AP-1 är NFκB en heterodimer mellan två olika proteiner, p50 och RelA (p65) [16, 17]. En rad olika stimuli som t ex virusinfektion, inflammatoriska cytokiner, antigener, UV-bestrålning och oxidativ stress leder till snabb aktivering av NFκB genom fosforylering och proteolys av inhibitoriska IκB. Anti-oxidanter av olika slag (t ex vitamin E) kan effektivt hämma nedbrytningen av IκB och därmed aktiveringen av NFκB. Vetenskapliga data antyder att proteolysen av IκB och därmed aktiveringen av NFκB fysiologiskt kontrolleras av koncentrationen av reaktiva syremolekyler (t ex O₂- och H₂O₂) i cellen [17]. NFκB reglerar uttrycket av en rad olika gener som förmedlar och potentierar kroppens immun- och inflammationsförsvar via bindning till DNA med konsensus-sekvensen 5'-GGGpNNPyPyCC-3'.

Exempel på gener där NFκB spelar en viktig transkriptionsstimulerande roll är generna för: immunoreceptorer (t ex MHC klass I och II och receptorn för IL-2), adhesionsproteiner (t ex ICAM-1 och ELAM-1), cytokiner (t ex IL-2, IL-6 och

TNFα) och hematopoetiska tillväxtfaktorer (t ex GM-CSF) [17]. NFκB har även en stimulerande effekt på genuttrycket från vissa virus (t ex HIV-1) och på generna för COX-2 och iNOS. Vidare bör nämnas att NFκB förefaller vara intimt förknippad med aktiveringen av T-celler samt ha en centralt koordinerande roll för uttrycket av en rad cytokingener i samband med aktiveringen av monocyter/makrofager.

Glukokortikoider inhiberar NFκBs transkriptionsstimulerande effekt genom att GR bildar ett protein:protein-komplex med RelA-enheten i NFκB (Figur 4 C) och därigenom blockerar NFκBs förmåga att binda till sitt DNA-responselement [12].

Förutom denna modell för glukokortikoiders inhibition av NFκB har resultat presenterats vilka antyder att glukokortikoider även hämmar NFκB-beroende gentranskription genom att stimulera uttrycket av inhibitorproteinet IκB (Figur 4 D) [18].

Nysyntetiserad IκB kan bilda inhibitoriskt komplex med p50:RelA-heterodimerer (NFκB) i cytoplasman men även terminera pågående NFκB-beroende gentranskription genom att destabilisera NFκBs interaktion med DNA.

cellular cell adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) och ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1) en viktig roll för att leukocyterna, via sina motsvarande adhesionsproteiner, t ex »leukocyte/lymphocyte function-associated antigen-1» (LFA-1) och »very late antigen-4» (VLA-4), skall kunna fästa vid kärlväggen och för att de skall kunna penetrera kärlväggen på väg mot den inflammatoriska vävnaden. Glukokortikoider kan påverka kärlväggsspermeabiliteten och på så sätt dramatiskt hämma ansamlingen av leukocyter vid inflammationsstället. De reglerar denna funktion genom att hämma det cytokinstimulerade uttrycket av bl a adhesionsproteinerna på endotelcellernas yta, med konsekvensen att infångandet och förankringen av leukocyter till kärlväggen förhindras.

Fibroblaster

Fibroblaster deltar i inflammationsprocessen och utgör en av flera sorters målceller för glukokortikoiders modulerande effekt på inflammationsförloppet [4]. Glukokortikoider inhiberar bl a den TNF α -inducerade produktionen av metalloproteinaser (kollagenas och stromelysin) och produktionen av proinflammatoriska prostaglandiner från arakidonsyra. Hämmning av prostaglandinsyntesen sker på två sätt: dels genom att glukokortikoider påverkar typ II-fosfolipas A2-aktiviteten i cellerna, antingen genom att minska den cytokinstimulerade syntesen av fosfolipas A2-enzymet och/eller genom att inducera produktionen av fosfolipas A2-inhibitor lipocortin-1, dels genom att hämma uttrycket från den cytokininducerbara genen för enzymet cyklooxygenas-2 (COX-2), som katalyserar det hastighetsbestämmande steget vid syntesen av prostaglandiner.

Lungvävnad

Pro-inflammatoriska cytokiner stimulerar uttrycket av den inducerbara genen för kväveoxidsyntas (iNOS) i ett stort antal celler, bl a kärlendotel, makrofager och lungepitelceller, vilket orsakar en ökad produktion av NO. Förhöjd NO-produktion i lungvävnad ökar blodflödet och utsöndringen av vätska i lungvävnaden (ödem) hos astmatiska patienter [6]. NO har möjligen även andra pro-inflammatoriska effekter som bl a leder till ansamling av eosinofiler till inflammationsstället i luftvägarna. Även uttrycket av den inducerbara COX-2-genen och syntesen av proinflammatoriska prostaglandiner är förhöjda i lungepitelceller hos patienter med astma. Uttrycket av adhesionsprotein av typen ICAM, på kärlendotel och lungepitelceller spelar en avgörande

roll för infångandet och infiltrationen av inflammatoriska celler (bl a leukocyter) i lungvävnaden.

Glukokortikoider har en kraftig inhibitorisk effekt på cytokinstimulerad expression av både iNOS, COX-2 och ICAM, vilket är en del av förklaringen till glukokortikoiders goda egenskaper vid och dämpande effekt på astmasymtomen [6]. Dessutom nedreglerar glukokortikoider uttrycket och sekretionen av bl a cytokinerna IL-5, IL-8 och RANTES från epitelcellerna i luftvägarna och frisättningen av cytokiner från Th2-lymfocyter [6, 9].

β_2 -adrenoreceptorn och β_2 -agonister

Behandling av astmapatienter med β_2 -agonister är ett av de effektivaste sätten att orsaka dilatation av luftvägarna. Det har länge ansetts att de glatta muskelcellerna i luftvägarna är de enda målcellerna för den gynnsamma effekten av β_2 -agonistbehandlingen av astmapatienter.

Men även mastceller har β_2 -adrenoreceptorer på cellytan, och β_2 -agonister har visats hämma frisättningen av ämnen från mastcellerna vilka orsakar sammandragning av luftvägarna [10]. Under alla omständigheter leder dessvärre kronisk behandling med β_2 -agonister till nedreglering av antalet β_2 -adrenoreceptorer på cellytan och till att många patienter utvecklar tolerans. Glukokortikoider har en stimulerande effekt på avläsningen av β_2 -adrenoreceptorgen, vilket resulterar i ett ökat antal receptorer på ytan av cellerna i lungvävnaden [10].

Det har visats i djurstudier att glukokortikoider motverkar β_2 -agonistmediert nedreglering av β_2 -adrenoreceptornivåerna, vilket antyder att glukokortikoider skulle kunna motverka uppkomsten av β_2 -agonisttolerans vid kronisk behandling [10].

Mekanismen bakom de anti-inflammatoriska effekterna

Faktaruta 1 har kort beskrivits hur en hormonaktiverad glukokortikoidreceptor (GR) kan påverka avläsningen och uttrycket av glukokortikoidkänsliga målgener via s k glukokortikoidresponselement(GRE)-sekvenser. Längre trodde man att den GR-beroende hämmande effekten av glukokortikoider på uttrycket av gener som kodar för cytokiner och andra proteiner, som på ett eller annat sätt förmedlar eller förstärker det inflammatoriska svaret, var medierad via bindning av den hormonaktiverade receptorn till s k negativa GRE. Under de senaste åren har det dock visat sig att de flesta av dessa gener inte innehåller några GR-bindande DNA-sekvenser utan mekanismen bakom

glukokortikoiders anti-inflammatoriska effekter är snarare indirekt, bestående i att GR via protein:protein-interaktion neutraliserar andra transkriptionsfaktors förmåga att aktivera gener som orkestrerar det inflammatoriska svaret.

Det är framförallt två intracellulära transkriptionsfaktorer, »activator protein-1» (AP-1) [11] och »nuclear factor kappa B» (NF κ B) [12], som hämmas av hormonaktiverad GR. Både AP-1 och NF κ B spelar en avgörande roll för transkriptionell aktivering av cytokin-generna, genen för iNOS, COX-2, adhesionsproteinerna, generna för metalloproteinaser m fl efter stimulus från någon av cytokinerna via sina respektive receptorer på cellytan.

Glukokortikoidresistens

Mekanismen för glukokortikoidresistens är ännu oklar men har troligen flera förklaringar och orsaker. Glukokortikoidresistens förefaller kunna bero dels på en genetisk defekt (familjär glukokortikoidresistens) som anses bestå i att GR inte uttrycks eller är muterad, dels på indirekta effekter av behandlingen eller sjukdomen (sekundär resistens) [6, 10] där det inte anses föreligga någon defekt i GRs uttryck, receptorproteinet eller bindning av glukokortikoider till receptorn.

Däremot har vissa studier påvisat minskad förmåga hos GR att binda till GRE vid sekundär glukokortikoidresistens, vilket skulle kunna förklaras av en överstimulering av AP-1- och/eller NF κ B-aktiviteten i cytokin(IL-1 och TNF α)-stimulerade celler. Förhöjd AP-1 och NF κ B-aktivitet kan resultera i ett minskat antal funktionella GR-molekyler orsakat av protein:protein-komplexbildning AP-1:GR respektive NF κ B:GR och därmed i en minskad glukokortikoidkänslighet. I ett in vitro-modellsystem har man visat att överuttryck av AP-1 leder till glukokortikoidresistens med påföljden att den transkriptionella aktiviteten hos en glukokortikoidkänslig gen minskade och till hämning av GRs bindning till GRE [6].

β_2 -agonistmediert resistens

Höga nivåer av β_2 -agonister uppreglerar via bindning till β_2 -adrenerga receptorn aktiviteten av CREB (cAMP response element binding protein) i inflammatoriska celler [6, 10]. Förhöjd CREB-aktivitet har rapporterats kunna blockera GRs bindning till GRE genom att CREB bildar ett protein:protein-komplex med GR [6, 10]. En annan möjlig förklaring är att CREB tävlar med GR om det begränsade antalet CREB binding protein(CBP)-molekyler i cellerna [15] (se Faktaruta 2). Både

CREB och GR har föreslagits kunna vara beroende av CBP för full aktivitet som transkriptionsfaktorer.

Glukokortikoiders effekter på CNS

Ett område där glukokortikoider och GR diskuteras intensivt är CNS. Bl a har det hävdats att glukokortikoider är involverade i kontroll av sinnesstämning samt att glukokortikoider kan initiera neurodegenerativa processer. En del forskare har lanserat hypotesen att stressinducerad nedreglering av GR i hippocampus skulle leda till en neuroendokrin kaskad inkluderande höga kortisolnivåer i blodet med ökad känslighet för neurodegenerativa förändringar samt risk för depression. Intressant nog har följaktligen GR ansetts vara en potentiell mål molekyl för långverkande antidepressiva som bl a tycks uppreglera såväl GR som mineralokortikoidreceptorn (MR) i hjärnan. Denna effekt är speciellt intressant eftersom den också kan påvisas hos vävnadsodlade celler, vilket visar att antidepressivumet direkt påverkar GRs genuttryck. Att MR också kan spela en roll stöds av iakttagelsen att långtidsbehandling med antidepressivumet amitriptylin selektivt ökade uttrycket av MR hos unga råttor.

Den neurodegenerativa effekten av glukokortikoider är komplicerad och tycks huvudsakligen vara lokaliserad till hippocampus CA3-region, där Sapolsky påvisat förlust av hippocampusceller i samband med långtidsstillförsel av höga doser glukokortikoider; hos apor ses liknande effekter till följd av kronisk psykosocial stress. Å andra sidan verkar dessa effekter vara uttalat regionspecifika. Sålunda är CA1-neuron ganska motståndskraftiga mot skada, och frånvaro av glukokortikoider ökar graden av apoptos i gyrus dentatus. Orsaken till denna regionala skillnad mellan CA1 och CA3 är okänd men skulle kunna bero på olikheter i den cellulära kvoten MR till GR, vilken är regionspecifik i hippocampus (högre MR till GR-kvot i CA1 än i CA3).

Systemiska sidoeffekter av glukokortikoidbehandling

Långtidsbehandling med glukokortikoider för att dämpa immunologiska och inflammatoriska sjukdomstillstånd har inte bara positiva effekter utan kan också ge mer eller mindre allvarliga sidoeffekter.

En av de mer allvarliga oönskade effekterna är osteoporos, vilken är mest uttalad i trabekulärt ben [4, 19]. Förlusten av ben varierar mellan 10 och 40 procent, mycket beroende på dosen och längden av hormonbehandlingen. Ca

1/3 av patienterna som står på glukokortikoidbehandling drabbas av kotfrakturer, och risken att de skall drabbas av höftfraktur är 50 procent högre än normalfrekvensen [19]. Glukokortikoiders effekter på benmetabolismen är både direkta och indirekta. Den huvudsakliga indirekta effekten beror på minskat upptag av kalcium från tarmen och minskad reabsorption av kalcium från njurarna. Detta leder i sin tur troligen till kompensatorisk sekundär hyperparatyreoidism och en ökad aktivitet hos osteoklasterna och därmed till ökad resorption av ben [19].

Glukokortikoider påverkar också nyrekryteringen av osteoblaster och inhiberar syntesen av matrixproteiner från osteoblasterna. Histomorfometriskastudier har dessutom visat att glukokortikoider minskar mineraliseringen av ben [19]. Sammantaget leder glukokortikoidbehandling till en obalans mellan benuppyggnad och benresorption, vilket resulterar i en snabb förlust av ben som i stort sett är irreversibel.

Systemisk behandling med glukokortikoider kan också leda till binjurebarksinsufficiens, vilket kan få dramatiska konsekvenser (cirkulatorisk kollaps på grund av t ex stress och infektion) vid för snabbt utsättande av glukokortikoidbehandlingen. Vidare leder i regel behandling med glukokortikoider till ökad aptit och viktökning och till ökad infektionskänslighet. Dessutom kan glukokortikoidbehandling resultera i diabetessymtom och muskelförsvagning [4].

Dessa och andra negativa effekter av glukokortikoider kräver noggrant övervägande om och när glukokortikoidbehandling skall sättas in. Dessutom pekar biverkningsproblemen på behovet av utvecklingen av nya och förbättrade syntetiska anti-inflammatoriska glukokortikoider med en bättre terapeutisk profil.

Utveckling av nya anti-inflammatoriska glukokortikoider

Dagens syntetiska glukokortikoider för behandling av inflammatoriska och immunologiska sjukdomstillstånd är mycket potenta och effektiva glukokortikoidagonister, både som transkriptionsaktivatorer via GRE och som anti-inflammatorika via protein:protein-interaktion med AP-1 respektive NFκB. Önskvärt vore att utveckla glukokortikoider som är potenta och effektiva anti-inflammatorika men lågeffektiva som aktivatorer av GR till en DNA-bindande transkriptionsfaktor och modulator av glukokortikoidkänsliga gener. Deflazacort är en syntetisk glukokortikoid som är ett oxazolinderivat av prednisolon [20]. Deflazacort har visat sig ha nästan lika hög terapeutisk potens

och effektivitet som prednison (prednisolon) med avseende på reumatoid artrit men betydligt mindre uttalade negativa effekter än prednison (prednisolon) avseende hämning av syntesen av kortisol i binjurebarken och utsöndring av kalcium i njurarna [20]. Deflazacort förefaller även ha mindre negativ effekt på benmetabolismen än övriga anti-inflammatoriska glukokortikoider som används kliniskt idag [20]. Den exakta mekanismen för deflazacorts mer gynnsamma terapeutiska profil in vivo är dock ännu ej helt utredd.

Ny kunskap om glukokortikoiders verkningsmekanismer, samverkan mellan olika transkriptionsfaktorer och coaktivatorer och samverkan mellan olika signaltransduktionsvägar leder till ökad insikt om hur nya anti-inflammatoriska glukokortikoiders biologiska egenskaper bör vara för att uppnå bästa möjliga effekt samtidigt som man kan undvika allvarliga sidoeffekter. En annan mycket viktig kunskap för utveckling av framtidens anti-inflammatoriska glukokortikoider blir kunskapen om glukokortikoidreceptorns tredimensionella struktur och vetenskapen om hur olika glukokortikoidagonister/antagonister binder till och samverkar med receptorn.

Läkemedel med datorstöd

Datorstödd läkemedelsdesign utnyttjas idag för att skapa och optimera kemiska strukturer. Med kunskap om glukokortikoidagonisters/antagonisters strukturer och biologiska aktivitet kan man med datorns hjälp bygga s k pharmacophormodeller som sedan kan vara till hjälp vid design av nya strukturer med en förhöjd/mer selektiv biologisk aktivitet eller till att via datorn söka i kemiska databanker efter strukturer som passar pharmacophormodellen. Även kunskapen om den ligandbindande fickans koordinater kan utnyttjas i datorn till att skapa nya kemiska strukturer och till att optimera kända kemiska strukturer biologiska egenskaper.

De senaste årens snabba utveckling inom molekylärbiologin har möjliggjort utvecklingen av biologiska verktyg med vilka man snabbt kan testa stora kemiska bibliotek med avseende på förekomst av nya glukokortikoider med anti-inflammatorisk aktivitet. Genom att karakterisera dessa kemiska molekyler (både steroider och icke-steroider) biologiska effekt på olika celltyper (exempelvis inflammatoriska celler och benceller) in vitro kan man få en bra uppfattning om huruvida de uppfyller kraven för att utvecklas som läkemedel, dvs om de effektivt kan trycka ned ett inflammatoriskt stimulus samtidigt som de visar minskad tendens till negativa effekter.

Referenser

1. Gronemeyer H, Laudet V. Transcription factors 3: Nuclear receptors. *Protein Profile* 1995; 2: 1167-322.
2. Beato M, Herrlich P, Schütz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 1995; 83: 851-7.
3. Smith DF, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 4-11.
4. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 1993; 119: 1198-208.
5. Nelson PJ, Kim HT, Manning WC, Goralski TJ, Krensky AM. Genomic organization and transcriptional regulation of the rantes chemokine gene. *J Immunol* 1993; 151: 2601-12.
6. Barnes PJ. Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids. *Biochem Soc Trans* 1995; 23: 940-5.
7. Aronin N. Substance P and the tachykinins. In: Becker KL, Bilezikian JP, Bremner WJ, Hung W, Kahn CR, Loriaux DL et al, eds. *Principles and practice of endocrinology and metabolism*. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1985: 1446-9.
8. Parekh RB, Edge CJ. Selectins – glycoprotein targets for therapeutic intervention in inflammation. *Trends in Biotechnology* 1994; 12: 339-45.
9. Barnes PJ. Anti-inflammatory therapy for asthma. *Annu Rev Med* 1993; 44: 229-42.
10. Barnes PJ. Molecular mechanisms of anti-asthma therapy. *Ann Med* 1995; 27: 531-5.
11. Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato ACB, Gebel S, Ponta H et al. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (fos/jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 1990; 62: 1189-204.
12. Caldenhoeven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L et al. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 401-12.
13. Angel P, Karin M. The role of jun, fos and the AP-1 complex in cellproliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072: 129-57.
14. Heck S, Kullman M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P et al. A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J* 1994; 13: 4087-95.
15. Kamei Y, Xu L, Heinzel T, Torchia J, Kurukawa R, Gloss B et al. A CBP integrator complex mediates transcription activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 1996; 85: 403-14.
16. Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF- κ B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072: 63-80.
17. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-79.
18. Auphan N, Didonato JA, Rosette C, Hemberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I- κ B synthesis. *Science* 1995; 270: 286-90.
19. Tohme JF, Cosman F, Lindsay R. Osteopo-

rosis. In: Becker KL, Bilezikian JP, Bremner WJ, Hung W, Kahn CR, Loriaux DL et al, eds. *Principles and practice of endocrinology and metabolism*. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1985: 567-85.

20. Gray RES, Doherty SM, Galloway J, Coulton L, de Broe M, Kanis JA. A double-blind study of deflazacort and prednisone in patients with chronic inflammatory disorders. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 287-95.

Summary

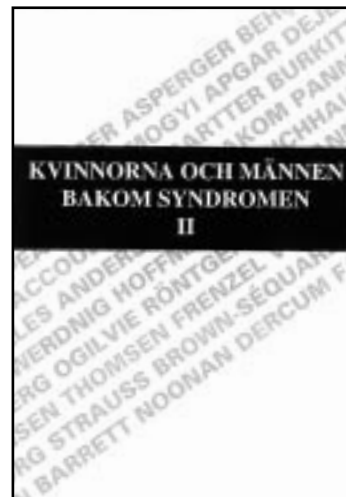
New glucocorticoids are more selective; serious side-effects can now be eliminated.

Stefan Nilsson, Jan-Åke Gustafsson.

Läkartidningen 1997; 94: 2465-71.

Glucocorticoids have been used as anti-inflammatory, anti-allergic and immunosuppressive agents since the beginning of the 1940s, and during recent years the mechanisms by which they exert their anti-inflammatory effects have begun to be better understood. Inhibition of inflammatory response is primarily mediated via the glucocorticoid receptor and the two transcription factors, AP-1 and NF κ B, which are of crucial importance for the expression of pro-inflammatory cytokines and other genes involved in the inflammatory process. Unfortunately, long-term treatment with glucocorticoids is associated with a series of adverse effects such as hypertension, bone fragility, diabetes, dermatopathy and personality changes. However, owing to advances in biotechnology and recent clarification of the molecular mechanisms involved, it is now becoming possible to develop new glucocorticoids with a more selective anti-inflammatory effect without serious side-effects.

Correspondence: Stefan Nilsson, M.D., Deputy Director of Research, Karo Bio AB, Novum, S-141 57 Huddinge, Sweden



Helt ny bok om syndrom!

• Boken "Männan bakom syndromet" har fått en helt ny efterföljare: "Kvinnorna och männen bakom syndromen" med 70 artiklar som publicerats i *Läkartidningen* under perioden 1990–1996. Den tar upp namn som Asperger, Bichat, Fancioni och Waldenström. Här finns också män "bakom metoden", exempelvis Doppler och Röntgen.

• Denna nya bok omfattar 248 sidor och är rikt illustrerad, även med färgbilder. Därtill finns en sammanställning (i förminskat utförande) av de uppskattade tidningsomslag som hör till serien. Priset är 190 kronor + porto (60 kronor).

Beställ här:

..... ex "Kvinnorna och männen bakom syndromen" à 190 kronor + porto.

BESTÄLLARE.....

ADRESS.....

POSTNUMMER/POSTADRESS

Insändes till *Läkartidningen*,
Box 5603, 114 86 Stockholm.
Telefax 08-20 76 19