

ИЗОФОРМЫ РЕЦЕПТОРА ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ, ОБРАЗУЮЩИЕСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ СТАРТОВ ТРАНСЛЯЦИИ мРНК

В.М. Меркулов, Т.И. Меркулова

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, email: merkti@niboch.nsc.ru

Рецептор глюкокортикоидных гормонов (NR3C1) – **транскрипционный фактор, контролирующий** множество физиологических процессов в организме млекопитающих. По современным оценкам рецептор глюкокортикоидов участвует в регуляции экспрессии тысяч генов, однако наборы таких генов в различных типах клеток существенно отличаются. Различаются также амплитуда, направленность, временная и дозовая зависимость ответа на гормон как для одного и того же гена в разных типах клеток, так и для разных генов в одной и той же клетке. Такая специфичность действия рецептора глюкокортикоидов обусловлена, с одной стороны, особенностями организации регуляторных районов его генов-мишеней, а с другой – сложностью организации гена самого рецептора, имеющего 9 альтернативных промоторов и дающего начало множеству белковых изоформ за счет альтернативного сплайсинга мРНК и использования альтернативных стартов трансляции. В настоящем обзоре обобщены современные знания об изоформах рецептора глюкокортикоидов и механизмах их образования.

Ключевые слова: рецептор глюкокортикоидов, ген, промоторы, альтернативный сплайсинг, старты трансляции, изоформы белка.

Введение

Глюкокортикоидные гормоны контролируют множество физиологических процессов в организме позвоночных животных. Глюкокортикоиды участвуют в регуляции углеводного, белкового и липидного обмена, в поддержании водного и электролитного баланса, обладают противовоспалительным и иммуносупрессорным действием. Эти гормоны играют важную роль в адаптации организма к различным «стрессам», таким, как травма, тяжелые инфекционные заболевания, интоксикация и т. п. Они также вносят существенный вклад в регуляцию процессов размножения и поведения (Hierholze, Buhler, 1996; Sapolsky *et al.*, 2000). Глюкокортикоиды вовлечены в контроль пролиферации, дифференцировки и апоптоза многих типов клеток, при этом эффекты глюкокортикоидов в разных клетках могут быть прямо противоположными (Hierholze, Buhler, 1996). В частности, хорошо

известно, что эти гормоны оказывают антипролиферативное действие на большинство типов клеток (Fowden, Forhead, 2009), однако есть данные о стимулировании пролиферации некоторых из них, например клеток эпителия тонкого кишечника (Tutton, Barkia, 1988). Известно также, что глюкокортикоиды вызывают апоптоз макрофагов, моноцитов и Т-лимфоцитов, но оказывают антиапоптогенное действие на клетки эндометрия, эпителия молочной железы, фибробласты и гепатоциты (Viegas *et al.*, 2008).

Действие глюкокортикоидов на клетки-мишени реализуется через их связывание с внутриклеточным белком-рецептором. Рецептор глюкокортикоидов (ГР, NR3C1) является лиганд-активируемым фактором транскрипции из суперсемейства ядерных рецепторов (Смирнов, 2002). После связывания с гормоном и перехода из цитоплазмы в ядро клетки ГР осуществляет позитивную или негативную регуляцию генов,

присоединяясь к опознаваемым им участкам ДНК (элементы глюкокортикоидной регуляции, GREs) и/или вступая в белок-белковые взаимодействия с другими факторами транскрипции (Kumar, Thompson, 2005; Kassel, Herrlich, 2007).

В геноме млекопитающих имеется только один ген, кодирующий ГР. Обеспечивая огромное многообразие эффектов глюкокортикоидных гормонов, этот ген экспрессируется практически во всех типах клеток организма (Thompson, 1987), и продукт его является регулятором экспрессии множества генов. По грубым прикидкам, основанным на данных массового выявления контролируемых глюкокортикоидами генов в различных типах клеток, число генов-мишеней ГР в геноме человека может составлять до 10–20 % от всех генов (Lu *et al.*, 2007; Oakley, Cidlowski, 2011). Однако наборы таких генов в различных типах клеток существенно различаются (So *et al.*, 2007). Различаются также амплитуда, направленность, временная и дозовая зависимость ответа на гормон как для одного и того же гена в разных типах клеток, так и для разных генов в одной и той же клетке (John *et al.*, 2009).

Такая специфичность действия ГР обеспечивается целым рядом механизмов, среди которых можно выделить две основные группы. В основе механизмов первой группы лежит структура самого гена ГР, включающая наличие множества альтернативных промоторов (Cao-Lei *et al.*, 2011) и допускающая образование различных изоформ белка-рецептора за счет альтернативного сплайсинга мРНК и использования альтернативных стартов трансляции при синтезе белка (Oakley, Cidlowski, 2011). Основа второй группы механизмов заложена в организации регуляторных районов генов-мишеней ГР и включает как особенности структурной организации GREs (Merkulov, Merkulova, 2009), так и возможность взаимодействия ГР с другими транскрипционными факторами, сайты связывания которых могут находиться как вблизи GREs, так и на значительном удалении от них в тех же самых или в других регуляторных районах гена (Truss, Beato, 1993; Schoneveld *et al.*, 2004). В настоящем обзоре на примере гена ГР человека приводятся анализ и обсуждение механизмов первой группы.

1. Альтернативные промоторы гена ГР

Согласно последним данным, не менее половины генов человека имеют альтернативные промоторы – в среднем на ген приходится 3,1 промотора (Kimura *et al.*, 2006). Для гена ГР человека к настоящему времени идентифицировано 9 альтернативных промоторов. Эти промоторы сконцентрированы в двух районах: проксимальном, занимающем ~5 т.п.н. перед стартом трансляции, и дистальном, находящемся на расстоянии ~–30 т.п.н. относительно этого старта (Breslin *et al.*, 2001; Turner, Muller, 2005, Presul *et al.*, 2007; Cao-Lei *et al.*, 2011). Все промоторы расположены перед альтернативными первыми экзонами гена ГР (рис. 1). Соответствующие варианты мРНК образуются в результате соединения донорных сайтов сплайсинга этих экзонов с акцепторным сайтом сплайсинга экзона 2, в котором расположен стартовый кодон белок-кодирующей последовательности рецептора. Таким образом, формируется серия мРНК, кодирующих один и тот же белок, но различающихся по длине и структуре 5'-UTR. Число вариантов мРНК с различными 5'-UTR увеличивается из-за существования внутренних донорных сайтов сплайсинга в экзонах 1A (Breslin *et al.*, 2001) и 1C (Turner, Muller, 2005) (рис. 1).

Показано, что представленность вариантов мРНК с разными 5'-UTR может существенно варьировать в различных органах, тканях и типах клеток человека. В частности, при исследовании клеток крови и биопсийного материала из ряда органов было установлено, что мРНК, содержащая экзон 1D, обнаруживается исключительно в гиппокампе, при том, что гиппокамп оказался единственным органом, где были найдены все варианты мРНК с различными 5'-UTR. Транскрипты, содержащие экзоны 1E и 1F, экспрессируются преимущественно в клетках иммунной системы (Turner, Muller, 2005). Экспрессия транскриптов, включающих варианты экзона 1A, происходит в основном в клетках гемопоэтического ряда (Breslin *et al.*, 2001), тогда как транскрипт с экзоном 1G кроме этих клеток встречается также в печени, легких и сердечной мышце (Turner, Muller, 2005). Наиболее широко представленными в различных органах и типах клеток оказались транскрипты, содержащие экзоны 1B и 1C3 (Turner, Muller,

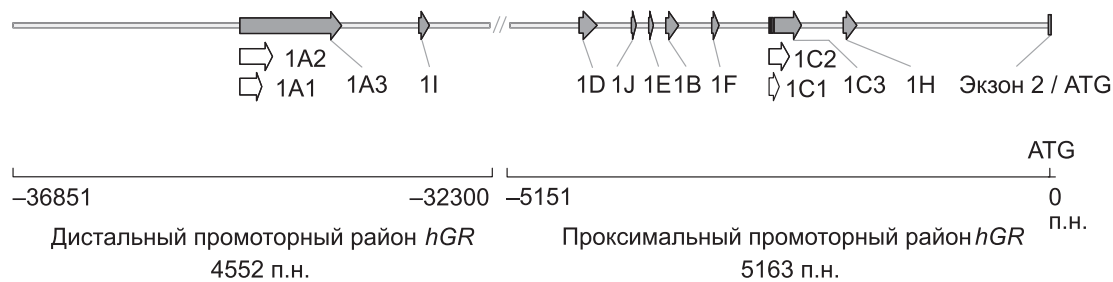


Рис. 1. Альтернативные нетранслируемые экзоны 1 гена GR человека (по: Presul *et al.*, 2007).

Экзоны показаны темными стрелками. Светлые стрелки – укороченные варианты экзонов 1А и 1С. АТG – старт трансляции.

2005). Причины тканевой специфичности использования различных промоторов пока не ясны. Скорее всего, они заключаются в специфике наборов регуляторных элементов (сайтов связывания транскрипционных факторов) в альтернативных промоторах гена GR. К настоящему времени выявлено уже немало таких сайтов как в проксимальном, так и дистальном регуляторных районах гена GR (см. обзор Turner *et al.*, 2010). Однако поскольку большая часть идентифицированных на данный момент сайтов принадлежит вездесущим факторам транскрипции (Sp1, AP1, AP2, YY1, NF-κB, GR), очевидно, что для выяснения механизмов тканевой специфичности требуется дальнейшее изучение этих районов.

Известно также, что содержание вариантов мРНК GR с разными 5'-UTR может по-разному изменяться под действием регуляторных сигналов. Показано, например, что уровень мРНК, содержащей варианты экзона 1А, резко изменяется в ответ на обработку клеточных линий СЕМ-С7 и ИМ-9 глюкокортикоидными гормонами, тогда как уровни мРНК, содержащих экзоны 1В и 1С3, не меняются. При этом оказалось, что под действием глюкокортикоидов содержание транскриптов, включающих 1А, возрастает в клетках линии СЕМ-С7 (выделена из Т-лимфоцитов больного острой лимфобластной лейкемией), где глюкокортикоидные гормоны вызывают апоптоз, и снижается в клетках В-лимфомы (ИМ-9), где этого не происходит (Breslin *et al.*, 2001). «Переключателем» индукции/репрессии служит расположенный в промоторе 1А композиционный элемент, включающий «полусайт» связывания GR – TGTTCT (Merkulov, Merkulova, 2009) и участок, с кото-

рым связываются либо с-Myb, либо PU.1 (Geng, Vedeckis, 2005). В клетках СЕМ-С7 с высоким уровнем экспрессии с-Myb и низким уровнем экспрессии PU.1 с композиционным элементом связывается комплекс с-Myb-GR, что приводит к усилению синтеза транскриптов, содержащих экзон 1А, а в ИМ-9 клетках, где ситуация обратная – связывание комплекса PU.1-GR с тем же элементом приводит к подавлению транскрипции (Geng, Vedeckis, 2005).

Такая сложная картина распределения мРНК GR с различными вариантами 5'-UTR, зависящая от типа и состояния клеток, ставит вопрос о том, какую функциональную нагрузку могут нести эти белок-некодирующие последовательности. В настоящее время предлагаются несколько возможных механизмов влияния альтернативных 5'-UTR на структуру и уровень экспрессии соответствующего белкового продукта.

Во-первых, альтернативные 5'-UTR могут формировать разные вторичные структуры и различаться по составу регуляторных сигналов, что может влиять на эффективность экспорта соответствующих мРНК из ядра, их стабильность и интенсивность трансляции. Существование этих механизмов показано на примере ряда генов (Derrigo *et al.*, 2000; Hughes, 2006). Для GR таких данных пока получить не удалось. Так, было показано, что в клетках линии СЕМ-С7 человека стабильность вариантов мРНК GR, содержащих экзоны 1В, 1С и 1А3, одинакова. Не отличалась также и интенсивность их трансляции, которая измерялась в экспериментах по трансфекции плазмидных конструкций, экспрессирующих эти варианты мРНК в E8.2 клетки мыши (Pederson *et al.*, 2004). Однако, поскольку другие варианты мРНК GR пока не

изучались, преждевременно отвергать возможность участия перечисленных механизмов в глюкокортикоидной регуляции.

Во-вторых, альтернативные 5'-UTR за счет специфики их пространственной структуры могут влиять на альтернативный сплайсинг белок-кодирующих экзонов и, соответственно, на продукцию разных изоформ белка (Hughes, 2006). Сами альтернативные промоторы также могут влиять на выбор вариантов сплайсинга, что обусловлено физическими контактами транскрипционной машины и сплайсосомы (Maniatis, Reed, 2002; Kornblihtt, 2005). Показано, в частности, что связывание специфических наборов факторов транскрипции в промоторном районе гена может определять выбор того или иного варианта сплайсинга (Nogues *et al.*, 2002; Rosonina *et al.*, 2003). В настоящее время уже есть несколько примеров, когда образование определенных изоформ ГР за счет альтернативного сплайсинга определяется либо структурой 5'-UTR мРНК, либо использованием определенных промоторов в процессе транскрипции (приведены в Разделе 2).

В-третьих, альтернативные 5'-UTR могут влиять на выбор сайтов инициации трансляции (Hughes, 2006). В гене ГР идентифицировано 8 альтернативных сайтов инициации трансляции и, соответственно, выявлено 8 трансляционных

изоформ белка (Lu, Cidlowski, 2006). Однако вопрос о связи альтернативных 5'-UTR мРНК ГР с продукцией его трансляционных изоформ до сих пор остается почти неизученным. На настоящий момент лишь в единственной работе имеются сведения об усилении продукции одной из изоформ ГР при использовании конкретного промотора (приводятся в Разделе 3).

2. Изоформы ГР, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга мРНК

Альтернативный сплайсинг мРНК является одним из основных механизмов образования нескольких белковых продуктов с одного гена. По современным оценкам мРНК 92–94 % мультиэкзонных генов человека подвержены альтернативному сплайсингу, и в среднем на каждый ген приходится 3 изоформы белка, образующиеся с использованием этого механизма (Pan *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Для ГР в настоящее время известны 8 таких изоформ (рис. 2, 3), в формировании которых участвуют 8 транслируемых экзонов кодирующего этот белок гена – экзоны 2–9 (Encio *et al.*, 1991).

Первый транслируемый экзон (экзон 2) кодирует аминокислотный терминальный (NTD) или так называемый иммуногенный домен ГР (а.о. 1–419),

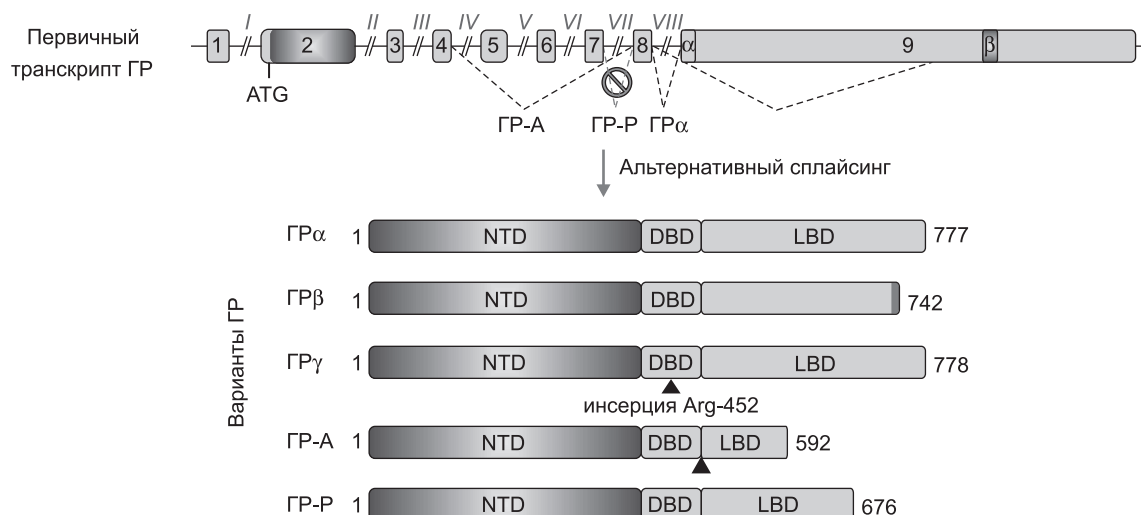


Рис. 2. Изоформы ГР, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга (по: Oakley, Cidlowski, 2011).

Экзоны обозначены арабскими цифрами, интроны – римскими. α и β – участки экзона 9, кодирующие С-конец ГР α и ГР β соответственно. NTD – аминокислотный терминальный домен, DBD – ДНК-связывающий домен, LBD – лиганд-связывающий домен; цифры справа – длина белковой молекулы в а.о.

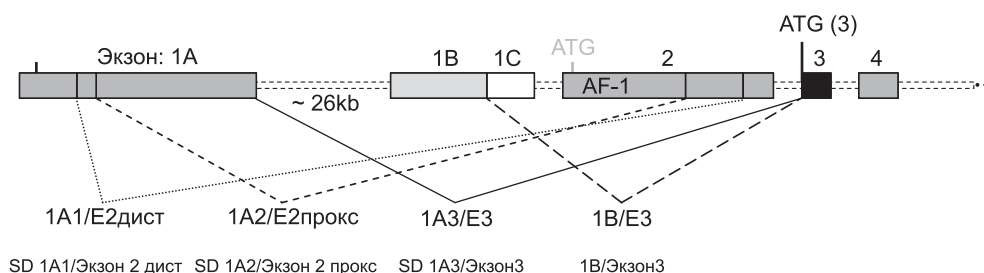


Рис. 3. Варианты альтернативного сплайсинга мРНК ГР человека с делециями экзона 2 различной длины (по: Geng *et al.*, 2005).

1A1/E2дист – соединение донорного сайта сплайсинга экзона 1A1 с внутренним дистальным акцепторным сайтом сплайсинга экзона 2; 1A2/E2прокс – соединение донорного сайта сплайсинга экзона 1A2 с внутренним проксимальным акцепторным сайтом экзона 2; 1A3/E3 – соединение донорного сайта сплайсинга экзона 1A3 с акцепторным сайтом экзона 3; 1B/E3 – соединение донорного сайта сплайсинга экзона 1B с акцепторным сайтом экзона 3. AF1 – ответственный за трансактиваторные функции участок аминокотерминального домена.

основной функцией которого является активация транскрипции генов-мишеней рецептора за счет взаимодействия с компонентами базальной транскрипционной машины (Ford *et al.*, 1997) и/или с коактиваторными белками (Robyr *et al.*, 2000). Ответственный за эти функции участок τ_1 , он же AF-1, расположен в районе 77–262 а.о. аминокотерминального домена (Miesfeld *et al.*, 1987). Экзоны 3 и 4 кодируют ДНК-связывающий домен ГР (DBD; 420–480 а.о.), при этом каждый из цинковых пальцев этого домена кодируется отдельным экзоном. Экзоны 5–8 и 5'-конец экзона 9 совместно кодируют гормон-связывающий домен (LBD) ГР. Помимо связывания гормона этот домен также осуществляет ряд других функций. Во-первых, в отсутствие глюкокортикоидов он обеспечивает связывание ГР с белками теплового шока, что необходимо для локализации свободного рецептора в цитоплазме клетки (Pratt, 1993). Во-вторых, домен содержит сигналы ядерной локализации и участвует в транспорте гормон-рецепторного комплекса в ядро клетки и его димеризации (Picard, Yamamoto, 1987). И наконец, гормон-связывающий домен ГР, так же, как и его иммуногенный домен, содержит трансактиваторные участки: τ_2 и AF-2 (Hollenberg, Evans, 1988; Danielian *et al.*, 1992), опознаваемые рядом коактиваторных белков. За счет альтернативного сплайсинга формируются изоформы ГР, укороченные с С- или N-конца, а также изоформы с внутренними делецией и вставкой.

2.1. ГР α и ГР β

ГР α и ГР β образуются в результате использования альтернативных акцепторных сайтов сплайсинга в экзоне 9 (рис. 2) Эти изоформы рецептора идентичны вплоть до аминокислотного остатка 727, после которого ГР α содержит 50 уникальных а.о., а ГР β – 15 а.о. ГР α представляет собой классический рецептор глюкокортикоидов, в отсутствие гормона находится в цитоплазме клетки в комплексе с белками теплового шока и функционирует как лиганд-зависимый транскрипционный фактор. Специфичный для ГР α участок кодирует фрагмент лиганд-связывающего домена, необходимый для связывания глюкокортикоидов, для взаимодействия с белками теплового шока, а также для трансактиваторной функции рецептора (район AF2). ГР β не способен связываться с гормоном, постоянно находится в ядре клетки и является доминантным ингибитором ГР α (Oakley *et al.*, 1996, 1997). Предложено несколько механизмов антагонистического действия ГР β , которые включают его конкуренцию с ГР α за места посадки в регуляторных районах генов (GREs), конкуренцию за коактиваторы, а также образование неактивных гетеродимеров ГР α /ГР β (Oakley *et al.*, 1999).

Так же, как и мРНК ГР α , мРНК ГР β обнаруживается повсеместно (Bamberger *et al.*, 1995; Oakley *et al.*, 1996), хотя выявляется на существенно более низком уровне. При этом в норме в большинстве тканей и клеточных линий содержание β изоформы белка либо в десятки

раз ниже, чем содержание нормального рецептора, либо она вообще не детектируется (Oakley *et al.*, 1997; Pujols *et al.*, 2002). Поэтому какое-то время существовало мнение, что изоформа ГРβ может вообще не иметь функционального значения (Hecht *et al.*, 1997). Однако в некоторых типах клеток, таких, как нейтрофилы и клетки эпителия желчных протоков печени и терминальных бронхиол легких, ГРβ экспрессируется на весьма высоком уровне (Oakley *et al.*, 1997; Oakley, Cidlowski, 2011). Показано также, что β изоформа ГР может стать доминирующей при обработке клеток провоспалительными цитокинами TNFα и IL1, и это может быть механизмом развития нечувствительности к глюкокортикоидным гормонам (Webster *et al.*, 2001). Напротив, агенты, увеличивающие относительный уровень экспрессии α изоформы (например, метотрексат, широко используемый для лечения аутоиммунных заболеваний и воспаления), повышают чувствительность клеток к глюкокортикоидам (Goecke *et al.*, 2007). Высокий уровень ГРβ наблюдается у ряда пациентов с нечувствительными к гормональной терапии формами астмы, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, острой лимфобластной лейкемией и др. (Lewis-Tuffin, Cidlowski, 2006). Массовые анализы экспрессии генов показали, что ГРβ может индуцировать и репрессировать множество генов, нерегулируемых ГРα, т. е. помимо ингибирования действия α изоформы ГР, ГРβ обладает собственными регуляторными функциями (Lewis-Tuffin *et al.*, 2007; Kino *et al.*, 2009).

Причины повышенной продукции ГРβ-изоформы пока до конца не выяснены. Однако установлено, что в нейтрофилах это явление связано с преобладанием одного белка из группы серин-аргинин-обогащенных факторов сплайсинга – SRp30c. Показано, что подавление экспрессии этого белка с помощью РНК-интерференции приводит к существенному снижению содержания ГРβ при возрастании концентрации ГРα (Xu *et al.*, 2003). Такие же результаты получены на клеточной линии рака предстательной железы (Zhu *et al.*, 2007). Другой известной причиной является встречающийся у людей полиморфизм (A3669G), разрушающий участок дестабилизации AUUUA в мРНК ГРβ, что приводит к увеличению продолжительности ее жизни и,

соответственно, накоплению данной изоформы рецепторного белка (Schaaf, Cidlowski, 2002).

2.2. ГР-Π

Кроме ГРβ известна еще одна изоформа ГР, укороченная с С-конца, – ГР-Π. Причиной ее образования является нарушение в процессе сплайсинга, когда расположенный между экзонами 7 и 8 интрон VII не вырезается (рис. 2). В самом начале этого интрона в рамке считывания расположен стоп-кодон, что приводит к синтезу белка с укороченным на 101 о.а. лиганд-связывающим доменом, не способным связывать глюкокортикоидные гормоны. Изоформа первоначально была обнаружена в клетках гормон-нечувствительной множественной миеломы (Moalli *et al.*, 1993). У ряда пациентов в этих клетках содержание мРНК ГР-Π превышает содержание мРНК ГР-α. мРНК ГР-Π найдена также в клетках некоторых других злокачественных опухолей и даже в нормальных лимфоцитах, где ее содержание составляет менее 20 % от суммарной мРНК ГР. В экспериментах по котрансфекции показано, что в зависимости от используемой клеточной линии присутствие ГР-Π может оказывать как позитивный, так и негативный эффект на опосредуемую ГР-α глюкокортикоидную индукцию (de Lange *et al.*, 2001).

Важно отметить, что продукция ГР-Π связана с использованием одного из альтернативных промоторов гена ГР человека. Так, на клеточной линии лимфоцитов показано, что при образовании этой изоформы преимущественно используется промотор 1С, в то время как для продукции классического ГР (ГРα) – промотор 1В (Russcher *et al.*, 2007).

2.3. Изоформы ГР-А и ГРγ

Известны также одна изоформа с делецией внутренних районов ГР и одна – со вставкой в район экзона 4. ГР-А-изоформа образуется в результате присоединения донорного сайта сплайсинга в конце экзона 4 к акцепторному сайту в начале экзона 8 без нарушения рамки считывания, в результате чего в белке отсутствует часть гормон-связывающего домена, кодируемая экзонами 5, 6, и 7 (рис. 2). Эта

изоформа не способна связывать гормон и обнаружена в клетках гормон-нечувствительной множественной миеломы (Moalli *et al.*, 1993).

Причиной образования γ -изоформы ГР является использование альтернативного донорного сайта сплайсинга в начале интрона III, в результате чего экзон 3 удлиняется на 3 нуклеотида и в белке появляется вставка остатка аргинина между цинковыми пальцами ДНК-связывающего домена. ГР γ не отличается от ГР α по способности связывать гормон и взаимодействовать с GREs, но характеризуется пониженной способностью активировать экспрессию большинства генов-мишеней (Ray *et al.*, 1996; Meijsing *et al.*, 2009). Однако для некоторых генов ГР γ оказывается более сильным активатором (Meijsing *et al.*, 2009). С экспрессией ГР γ связывают нечувствительность к глюкокортикоидной терапии кортикотрофных аденом и детской острой лимфобластной лейкемии (Ray *et al.*, 1996; Beger *et al.*, 2003).

2.4. Укороченные с N-конца изоформы ГР

Все найденные на настоящий момент укороченные с N-конца изоформы ГР образуются при участии лишь некоторых из альтернативных экзонов 1. Во-первых, обнаружены варианты мРНК с пропущенным экзоном 2, получающиеся в результате присоединения донорных сайтов сплайсинга экзонов 1B и 1A3 к акцепторному сайту сплайсинга экзона 3, что приводит к появлению варианта ГР, лишённого иммуногенного домена (рис. 3). Еще 2 укороченные с N-конца изоформы ГР образуются за счет использования альтернативных акцепторных сайтов сплайсинга экзона 2. Показано, что донорный сайт экзона 1A1 может присоединяться к дистальному акцепторному сайту, а донорный сайт экзона 1A2 – к проксимальному (Geng *et al.*, 2005). Описанные варианты мРНК имеются в небольших количествах в клетках СЕМ-С7 и ИМ-9. **Продукцируемые** с них белковые изоформы находятся в клеточном ядре вне зависимости от присутствия глюкокортикоидных гормонов (Geng *et al.*, 2005).

3. Трансляционные изоформы ГР

Помимо альтернативного сплайсинга пре-мРНК, к образованию различных изоформ белка может приводить использование альтернатив-

ных стартов трансляции зрелой мРНК (Kochetov, 2008). Согласно работам лаборатории Дж.А. Цидловски (Yudt, Cidlowski, 2001; Lu, Cidlowski, 2005, 2006; Oakley, Cidlowski, 2011), с мРНК ГР α считываются несколько форм белка, отличающихся по размеру N-концевого района. Авторы показали, что синтез этих форм осуществляется за счет инициации трансляции на нескольких альтернативных стартовых кодонах AUG в позициях: (1) – форма А, (27) – форма В, (86, 90, 98) – форма С (С1-С3), (316, 331, 336) – форма D (D1-D3) (рис. 4). **Все трансляционные** изоформы сохраняют гормон-связывающий домен и демонстрируют одинаковое сродство к глюкокортикоидным гормонам (Lu *et al.*, 2007). Все они, кроме изоформы D, в отсутствие гормона локализованы в цитоплазме клеток и переходят в ядро после образования гормон-рецепторных комплексов. Изоформы серии D (D1-D3) локализованы в клеточном ядре независимо от присутствия гормона (Lu, Cidlowski, 2005). Все изоформы способны распознавать GRE и стимулировать экспрессию GRE-содержащих репортерных конструкций, однако они различались по эффективности глюкокортикоидной индукции. Наиболее активной в стимуляции транскрипции под действием глюкокортикоидов оказалась изоформа С, наименее – D (Lu, Cidlowski, 2005).

С использованием культур клеток человека было показано, что разные трансляционные изоформы ГР есть практически везде, хотя их соотношение различно в линиях клеток разного происхождения. Аналогичные результаты были получены при изучении представленности трансляционных изоформ ГР крысы в различных органах. В частности, было показано, что изоформа D преобладает в селезенке, где на ее долю приходится около половины всего ГР, а в печени и тимусе наиболее представленной является изоформа В. Содержание изоформы С во всех органах было ниже, чем содержание других изоформ, при этом в легких и поджелудочной железе этой изоформы было больше, чем в других органах (Lu, Cidlowski, 2005).

Были установлены и различия в биологических эффектах трансляционных изоформ ГР человека. Так, было показано, что апоптоз клеток остеосаркомы индуцируется с различной эффективностью различными изоформами ГР:

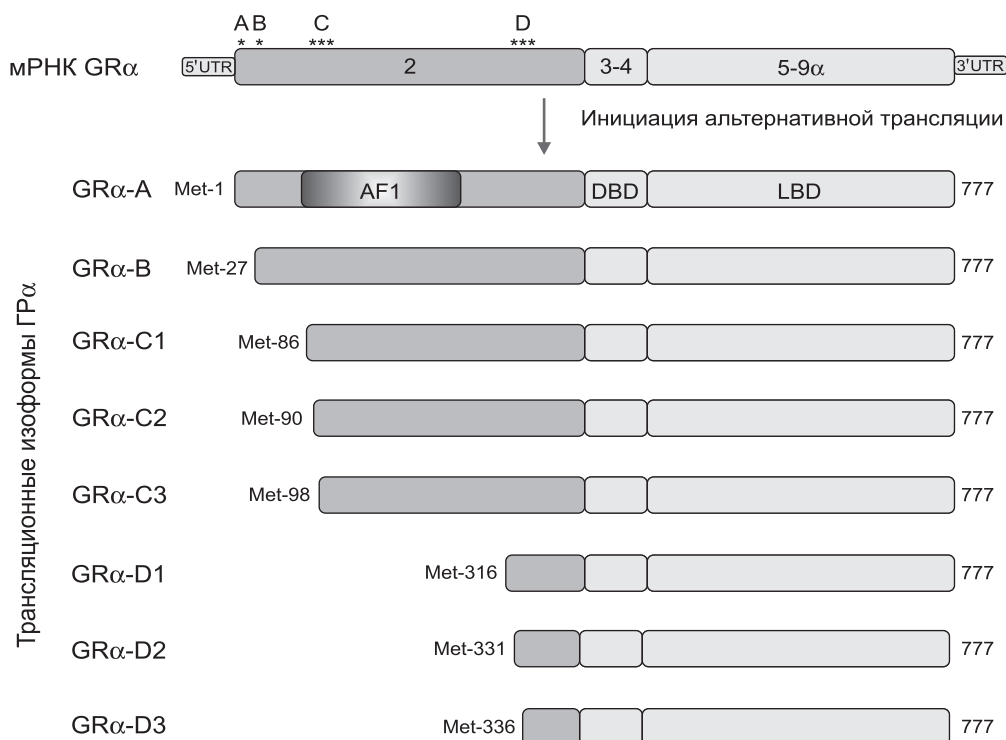


Рис. 4. Трансляционные изоформы GRα (по: Oakley, Cidlowski, 2011).

Звездочками указано положение альтернативных AUG кодонов в мРНК, цифры внутри – номера экзонов. AF1 – ответственный за транскрипторные функции участок аминотерминального домена, DBD – ДНК-связывающий домен, LBD – лиганд-связывающий домен.

экспрессия изоформы С значительно быстрее и чаще приводила к апоптозу в сравнении с изоформами А и В, тогда как экспрессия изоформы D обладала очень слабым апоптогенным действием (Lu *et al.*, 2007). С помощью микрочипового анализа удалось установить, что наборы генов, контролируемых отдельными изоформами GR в этих клетках, существенно различаются. При этом оказалось, что экспрессия почти 2200 генов меняется под действием хотя бы одной из изоформ GR, а 189 генов одинаково регулировались всеми изоформами (Lu, Cidlowsky, 2005).

Таким образом, есть все основания предполагать, что функции трансляционных изоформ GR существенно различаются. Поэтому большой интерес представляет поиск механизмов, контролирующих продукцию тех или иных трансляционных вариантов этого белка. Пока об этих механизмах практически ничего неизвестно. Лишь в одной работе была показана возможность связи между альтернативными

5'UTR мРНК GR и образованием определенных трансляционных изоформ. Оказалось, что если 5'UTR соответствует экзону 1A3, то в этом случае возрастает относительное количество изоформы GR В по сравнению с вариантами мРНК, где 5'UTR представлена экзонами 1B и 1C (Pederson *et al.*, 2004).

Заключение

Рецептор глюкокортикоидных гормонов так же, как и другие транскрипционные факторы, осуществляет регуляцию транскрипции генов, находясь в составе сложных мультибелковых комплексов, собирающихся в регуляторных районах генов. Набор белков, формирующих такие комплексы, включает другие факторы транскрипции, коактиваторы/корепрессоры, медиаторы, хроматин-ремоделирующие белки и зависит как от первичной структуры конкретного регуляторного района гена, так и от типа и состояния клетки, где этот ген экспрессируется

(Panne, 2008; Hager *et al.*, 2009; Tsai, Nussinov, 2011). Таким образом, для осуществления регуляции транскрипции ГР вступает во множество белок-белковых взаимодействий, специфичных для регуляторных районов различных генов. Например, в регуляторных районах генов, экспрессирующихся в печени, сайты связывания ГР–GREs соседствуют с сайтами связывания так называемых «печень-обогащенных» факторов – представителей семейств HNF1, HNF3 (по новой номенклатуре FoxA), HNF4, HNF6 и C/EBP, и соответствующие белковые ансамбли обеспечивают глюкокортикоидную индукцию этих генов в печени (Schoneveld *et al.*, 2004). А в генах, экспрессирующихся в ряде структур мозга, партнерами ГР чаще всего оказываются представители семейств AP1- и CREB-факторов транскрипции, а также специфичный для тканей мозга представитель семейства Oct1 (Brm2) и специфичный для гипофиза фактор Pit1 (Subramanian *et al.*, 1988; Diaz-Gallardo *et al.*, 2010). Иногда взаимодействие ГР с белком-партнером изначально необходимо для достижения нужного сродства рецептора к определенному участку ДНК. Это происходит, когда сайт связывания ГР на ДНК содержит лишь половину классического GRE (AGAACA_nTTCT) – гексануклеотид TGTCT, с которым взаимодействует мономер рецепторного белка, в отличие от связывания димера ГР с классическим сайтом (Merkulov, Merkulova, 2009). В подобных случаях связывание ГР с его сайтом стабилизируется другим транскрипционным фактором: XGRAF – в промоторной области гена γ -фибриногена шпорцевой лягушки (Morin *et al.*, 2001); Ets2 – в промоторном районе гена CYP27 крысы (Mullick *et al.*, 2001); PTF1-промотор – в гене α -амилазы 2 мыши (Slater *et al.*, 1993).

Можно предполагать, что наборы белков-партнеров, с которыми способна взаимодействовать та или иная изоформа ГР, различаются, что неизбежно должно отражаться как на специфике множеств генов-мишеней для различных изоформ, так и на характере регуляции отдельных генов. Сравнение состава генов-мишеней для ГР α и ГР β (Lewis-Tuffin *et al.*, 2007; Kino *et al.*, 2009), а также для различных трансляционных изоформ ГР α (Lu, Cidlowsky, 2005) подтверждает такое предположение. Поскольку продукция отдельных изоформ ГР

характеризуются как определенной тканеспецифичностью, так и различиями в реакции на внешние стимулы, представляется очевидным, что, обладая различным регуляторным потенциалом, изоформы рецептора глюкокортикоидных гормонов могут вносить существенный вклад в специфику гормональной регуляции.

Литература

- Смирнов А.Н. Ядерные рецепторы: номенклатура, лиганды, механизмы влияния на экспрессию генов // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 1157–1181.
- Bamberger C.M., Bamberger A.M., de Castro M., Chrousos G.P. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans // J. Clin. Invest. 1995. V. 95. P. 2435–2441.
- Beger C., Gerdes K., Lauten M. *et al.* Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach // Br. J. Haematol. 2003. V. 122. P. 245–252.
- Breslin M.B., Geng C.D., Vedeckis W.V. Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids // Mol. Endocrinol. 2001. V. 8. P. 1381–1395.
- Cao-Lei L., Leija S.C., Kumsta R. *et al.* Transcriptional control of the human glucocorticoid receptor: identification and analysis of alternative promoter regions // Hum. Genet. 2011. V. 129. P. 533–543.
- Danielian P.S., White R., Lees J.A., Parker M.G. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors // The EMBO J. 1992. V. 11. P. 1025–1033.
- de Lange P., Segeren C.M., Koper J.W. *et al.* Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells // Cancer Res. 2001. V. 61. P. 3937–3941.
- Derrigo M., Cestelli A., Savettieri G., Di Liegro I. RNA-protein interactions in the control of stability and localization of messenger RNA // Int. J. Mol. Med. 2000. V. 5. P. 111–123.
- Diaz-Gallardo M.Y., Cote-Velez A., Charli J.L., Joseph-Bravo P. The rapid interference between glucocorticoids and cAMP activating signalling in hypothalamic neurons prevents binding of phosphorylated cAMP binding protein and glucocorticoid receptor at CRE-like and composite GRE sites of thyrotrophin-releasing hormone gene promoter // J. Neuroendocrinol. 2010. V. 22. P. 282–293.

- Encio I.J., Detera-Wadleigh S.D. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 7182–7188.
- Ford J., McEwan I.J., Wright A.P., Gustafsson J.A. Involvement of the transcription factor IID protein complex in gene activation by the N-terminal transactivation domain of the glucocorticoid receptor *in vitro* // *Mol. Endocrinol.* 1997. V. 11. P. 1467–1475.
- Fowden A.L., Forhead A.J. Endocrine regulation of feto-placental growth // *Horm. Res.* 2009. V. 72. P. 257–265.
- Geng C.D., Pedersen K.B., Nunez B.S., Vedeckis W.V. Human glucocorticoid receptor alpha transcript splice variants with exon 2 deletions: evidence for tissue- and cell type-specific functions // *Biochemistry.* 2005. V. 44. P. 7395–7405.
- Geng C.D., Vedeckis W.V. c-Myb and members of the c-Ets family of transcription factors act as molecular switches to mediate opposite steroid regulation of the human glucocorticoid receptor 1A promoter // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 43264–43271.
- Goecke I.A., Alvarez C., Henríquez J. *et al.* Methotrexate regulates the expression of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in normal human peripheral mononuclear cells and human lymphocyte cell lines *in vitro* // *Mol. Immunol.* 2007. V. 44. P. 2115–2123.
- Hager G.L., McNally J.G., Mistell T. Transcription dynamics // *Mol. Cell.* 2009. V. 35. P. 741–752.
- Hecht K., Carlstedt-Duke J., Stierna P. *et al.* Evidence that the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor does not act as a physiologically significant repressor // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 26659–26664.
- Hierholzer K., Buhler H. Metabolism of cortical steroid hormones and their general mode of action // *Comprehensive Human Physiology / Eds R. Greger, U. Windhorst. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1996. P. 79–93.*
- Hollenberg S.M., Evans R.M. Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor // *Cell.* 1988. V. 55. P. 899–906.
- Hughes T.A. Regulation of gene expression by alternative untranslated regions // *Trends Genet.* 2006. V. 22. P. 119–122.
- John S., Johnson T.A., Sung M.H. *et al.* Kinetic complexity of the global response to glucocorticoid receptor action // *Endocrinology.* 2009. V. 150. P. 1766–1774.
- Kassel O., Herrlich P. Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007. V. 275. P. 13–29.
- Kimura K., Wakamatsu A., Suzuki Y. *et al.* Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes // *Genome Res.* 2006. V. 1. P. 55–65.
- Kino T., Manoli I., Kelkar S. *et al.* Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GR-alpha-independent transcriptional activity // *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 381. P. 671–675.
- Kochetov A.V. Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs // *BioEssays.* 2008. V. 30. P. 683–691.
- Kornblihtt A.R. Promoter usage and alternative splicing // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2005. V. 17. P. 262–268.
- Kumar R., Thompson E.B. Gene regulation by glucocorticoid receptor: Structure: function relationship // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 94. P. 310–319.
- Lewis-Tuffin L.J., Cidlowski J.A. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006. V. 1069. P. 1–9.
- Lewis-Tuffin L.J., Jewell C.M., Bienstock R.J. *et al.* Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 27. P. 2266–2282.
- Lu N.Z., Cidlowski J.A. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes // *Mol. Cell.* 2005. V. 18. P. 331–342.
- Lu N.Z., Cidlowski J.A. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity // *Trends Cell. Biol.* 2006. V. 16. P. 301–307.
- Lu N.Z., Collins J.B., Grissom S.F., Cidlowski J.A. Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 20. P. 7143–7160.
- Maniatis T., Reed R. An extensive network of coupling among gene expression machines // *Nature.* 2002. V. 416. P. 499–506.
- Meijsing S.H., Pufall M.A., So A.Y. *et al.* DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity // *Science.* 2009. V. 324. P. 407–410.
- Merkulov V.M., Merkulova T.I. Structural variants of glucocorticoid receptor binding sites and different versions of positive glucocorticoid responsive elements: Analysis of GR-TRRD database // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2009. V. 115. P. 1–8.
- Miesfeld R., Godowski P.J., Maler B.A., Yamamoto K.R. Glucocorticoid receptor mutants that define a small region sufficient for enhancer activation // *Science.* 1987. V. 236. P. 423–427.
- Moalli P.A., Pillay S., Krett N.L., Rosen S.T. Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells // *Cancer Res.* 1993. V. 53. P. 3877–3879.

- Morin B., Woodcock G.R., Nichols L.A., Holland L.J. Heterodimerization between the glucocorticoid receptor and unrelated DNA-binding protein *Xenopus* glucocorticoid receptor accessory factor // *Mol. Endocrinol.* 2001. V. 15. P. 458–466.
- Mullick J., Anandatheerthavarada H.K., Amuthant G. *et al.* Physical interaction and functional synergy between glucocorticoid receptor and Ets2 proteins for transcription activation of the rat cytochrome P-450c27 promoter // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 18007–18017.
- Nogues G., Kadener S., Cramer P. *et al.* Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 43110–43114.
- Oakley R.H., Cidlowski J.A. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 3177–3184.
- Oakley R.H., Jewell C.M., Yudt M.R. *et al.* The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 27857–27866.
- Oakley R.H., Sar M., Cidlowski J.A. The human glucocorticoid receptor β -isoform: expression, biochemical properties, and putative function // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 9550–9559.
- Oakley R.H., Webster J.C., Sar M. *et al.* Expression and subcellular distribution of the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor // *Endocrinology.* 1997. V. 138. P. 5028–5038.
- Pan Q., Shai O., Lee L.J. *et al.* Deep surveying of alternative splicing complexity in human transcriptome by high-throughput sequencing // *Nat. Genet.* 2008. V. 40. P. 1413–1415.
- Panne D. The enhancesome // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008. V. 18. P. 236–242.
- Pedersen K.B., Geng C.D., Vedeckis W.V. Three mechanisms are involved in glucocorticoid receptor autoregulation in a human T-Lymphoblast cell line // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 10851–10858.
- Picard D., Yamamoto K.R. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 3333–3340.
- Pratt W.B. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 21455–21458.
- Presul E., Schmidt S., Kofler R., Helmberg A. Identification, tissue expression, and glucocorticoid responsiveness of alternative first exons of the human glucocorticoid receptor // *J. Mol. Endocrinol.* 2007. V. 38. P. 79–90.
- Pujols L., Mullol J., Roca-Ferrer J. *et al.* Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues // *Am. J. Cell. Physiol.* 2002. V. 283. P. C. 1324–C1331.
- Ray D.W., Davis J.R., White A., Clark A.J. Glucocorticoid receptor structure and function in glucocorticoid-resistant small cell lung carcinoma cells // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 3276–3280.
- Robyr D., Wolffe A.P., Wahli W. Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity of steroid tasks // *Mol. Endocrinol.* 2000. V. 14. P. 329–347.
- Rosonina E., Bakowski M.A., McCracken S., Blencowe B.J. Transcriptional activators control splicing and 3'-end cleavage levels // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 43034–43040.
- Russcher H., Dalm V.A., de Jong F.H. *et al.* Associations between promoter usage and alternative splicing of the glucocorticoid receptor gene // *J. Mol. Endocrinol.* 2007. V. 38. P. 91–98.
- Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions // *Endocrinol. Rev.* 2000. V. 21. P. 55–89.
- Schaaf M.J., Cidlowski J.A. AUUUA motifs in the 3' UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression // *Steroids.* 2002. V. 67. P. 627–636.
- Schoneveld O.J., Gaemers I.C., Lamers W.H. Mechanisms of glucocorticoid signaling // *Biochem. Biophys. Acta.* 2004. V. 1680. P. 114–128.
- Slater E.P., Hesse H., Muller J.M., Beato M. Glucocorticoid receptor binding site in the mouse alpha-amylase 2 gene mediates response to the hormone // *Mol. Endocrinol.* 1993. V. 7. P. 907–914.
- So A.Y., Chaivorapol C., Bolton E.C. *et al.* Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor // *PLoS Genet.* 2007. V. 3. e94.
- Subramanian N., Cairns W., Okret S. Glucocorticoids repress transcription from a negative glucocorticoid response element recognized by two homeodomain-containing proteins Pbx and Oct1 // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 273. P. 23567–23574.
- Thompson E.B. The structure of the human glucocorticoid receptor and its gene // *J. Steroid Biochem.* 1987. V. 27. P. 105–108.
- Turner J.D., Alt S.R., Cao L. *et al.* Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more // *Biochem. Pharmacol.* 2010. V. 80. P. 1860–1868.
- Turner J.D., Muller C.P. Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5'-untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1 // *J. Mol. Endocrinol.* 2005. V. 35. P. 283–292.

- Truss M., Beato M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribo-nucleic acids and transcription factors // *Endocrine Rev.* 1993 V. 14. P. 459–478.
- Tsai C.-J., Nussinov R. Gene specific transcription activation via long-range allosteric shape-shifting // *Biochem. J.* 2011. V. 439. P. 15–25.
- Tutton P.J., Barkla D.H. Steroid hormones as regulators of the proliferative activity of normal and neoplastic intestinal epithelial cells // *Anticancer Res.* 1988. V. 8. P. 451–456.
- Viegas L.R., Hoijman E., Beato M., Pecci A. Mechanisms involved in tissue-specific apoptosis regulated by glucocorticoids // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2008. V. 109. P. 273–278.
- Wang E.T., Sandberg R., Luo S. *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes // *Nature.* 2008. V. 456. P. 470–476.
- Webster J.C., Oakley R.H., Jewell C.M., Cidlowski J.A. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 6865–6870.
- Xu Q., Leung D.Y., Kisich K.O. Serine-arginine-rich protein p30 directs alternative splicing of glucocorticoid receptor pre-mRNA to glucocorticoid receptor beta in neutrophils // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 27112–27118.
- Yudt M.R., Cidlowski J.A. Molecular identification and characterization of A and B forms of the glucocorticoid receptor // *Mol. Endocrinol.* 2001. V. 15. P. 1093–1103.
- Zhu J., Gong J.Y., Goodman O.B. Jr. *et al.* Attenuates pre-mRNA splicing of glucocorticoid receptor by regulating the expression of serine-arginine protein p30c (SRp30c) in prostate cancer cells // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1773. P. 1087–1094.

GLUCOCORTICOID RECEPTOR ISOFORMS GENERATED BY ALTERNATIVE SPLICING AND ALTERNATIVE TRANSLATION INITIATION

V.M. Merkulov, T.I. Merkulova

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: merkti@niboch.nsc.ru

Summary

The glucocorticoid hormone receptor (NR3C1) is a transcription factor controlling a large variety of physiological processes in mammals. According to modern estimates, the glucocorticoid receptor regulates the expression of thousands of genes; however, the sets of glucocorticoid-controlled genes in different cell types are different. The magnitude, direction, and kinetics of the hormone response are broadly variable both for the same gene in various cell types and for different genes in the same cell. The specificity of glucocorticoid receptor action is determined, on the one hand, by the features of the sequence and architecture of target gene regulatory regions and on the other hand, by the complex organization of the glucocorticoid receptor gene itself. The gene has nine alternative promoters and produces numerous protein isoforms as a result of alternative splicing and alternative translation initiation. Here we describe the recent knowledge on the origin and properties of glucocorticoid receptor isoforms.

Key words: glucocorticoid receptor, gene, promoters, alternative splicing, alternative translation initiation, protein isoforms.