



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## **Diversity of glucocorticoid receptor signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications**

Viho, E.M.G.

### **Citation**

Viho, E. M. G. (2023, September 7). *Diversity of glucocorticoid receptor signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3638839>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3638839>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

## SAMENVATTING

Glucocorticoïde stresshormonen zijn belangrijk voor de homeostase: het in evenwicht houden van alle processen in het lichaam. Deze hormonen worden gemaakt in de schors van de bijnier en hun aanmaak en afgifte worden bepaald door de hersenen, via de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as (HHB-as). De HHB-as volgt het 24-uursritme van de biologische klok en speelt zo een rol bij de coördinatie van een groot aantal biologische processen. Cortisol is het belangrijkste glucocorticoïde hormoon in de mens, terwijl de bijnieren van de muis uitsluitend corticosteron afscheiden. Beide hormonen binden aan de glucocorticoïde receptor (GR) en hebben zo talrijke effecten op gezondheid en ziekte. In **hoofdstuk 1** introduceren we de systemen die de fysiologische respons op stress regelen en de mechanismen die ten grondslag liggen aan de activiteit van de GR.

De GR is een waardevol therapeutisch doelwit voor verschillende metabole en psychiatrische ziekten die verband houden met stress of overmatige blootstelling aan cortisol. Een teveel aan cortisolwerking kan geremd worden met blokkers van de GR: GR-antagonisten. Mifepristone is de enige GR-antagonist die momenteel is goedgekeurd voor klinisch gebruik, maar heeft ongewenste kruisreactiviteit met receptoren voor geslachtshormonen. In **hoofdstuk 2** beschrijven wij een preklinische 'pijplijn' voor de screening van nieuwe, selectieve GR-antagonisten. Hiermee kunnen we de eigenschappen van deze stoffen onderzoeken en de beste verbindingen selecteren voor verdere (pre-)klinische evaluatie. Met behulp van deze pijplijn ontdekten we CORT125329 als een veelbelovende GR-antagonist. CORT125329 bleek selectief voor de GR, waardoor bijwerkingen die verband houden met de activiteit van geslachtshormoonreceptoren niet kunnen optreden. *In vivo* (in de muis) vertoonde CORT125329 niet alleen gunstige effecten in modellen van bovenmatige blootstelling aan glucocorticoïden, maar ook in modellen waarin de stofwisseling was verstoord door een dieet.

Het syndroom van Cushing is het beste voorbeeld van de pathologische gevolgen van een teveel aan glucocorticoïden. Het hypercortisolisme van deze patiënten wordt meestal veroorzaakt door een goedaardige tumor in de hypofyse of de bijnier (maar vergelijkbare klachten kunnen komen door overmatige blootstelling aan synthetische corticosteroiden). Chirurgie is de eerstelijnsbehandeling voor het syndroom van Cushing, maar dit niet altijd haalbaar of succesvol. In dat geval kan mifepristone worden gebruikt als medicamenteuze behandeling. Een nadeel van deze behandeling is dat mifepristone de negatieve terugkoppeling binnen de HHB-as verstoort, waardoor de cortisolsecretie (nog weer) sterk toeneemt. In **hoofdstuk**

**3** karakteriseerden wij in een reeks preklinische studies de nieuwe selectieve GR-antagonist relacorilant, in een directe vergelijking met mifepristone. Anders dan mifepristone verstoorde relacorilant slechts in bescheiden mate de negatieve terugkoppeling op de HHB-as bij muizen. De werking van relacorilant was dan ook minder krachtig dan mifepristone in hypofysecellen van muizen en vertoonde geen GR-antagonisme in de hersenen.

Wij denken dat deze verschillen tussen relacorilant en mifepristone (in cellen en in het hele organisme) verband houden met de interacties die ze bewerkstelligen tussen de GR en zogenaamde coregulator-eiwitten.

Niet-alcoholische vette leverziekte (NAFLD) is wereldwijd de meest voorkomende chronische leverziekte en een teveel aan glucocorticoïden kan de ziekte veroorzaken of verergeren. CORT118335 is een stof die aan de GR bindt en uit eerder onderzoek blijkt dat deze stof de lipidenstapeling in een muismodel voor NAFLD omkeert. In **hoofdstuk 4** hebben wij de moleculaire mechanismen ontleed die ten grondslag liggen aan de opmerkelijke eigenschappen van CORT118335. In de muizenlever vonden wij dat CORT118335 zowel GR-agonisme als -antagonisme vertoonde. Het is daarmee een 'Selectieve GR-Modulator'. In menselijke cellen bestudeerden we de interacties die optreden tussen de GR en andere eiwitten na behandeling met CORT118335 (het 'interactoom', waaronder de eerdergenoemde coregulatoren). CORT118335 induceerde een specifiek GR-interactoom waarin eiwitten ontbraken die betrokken waren bij gen-transactivatie en chromatineremodellering. Dit ging gepaard met een zwakkere inductie van chromatinetoegankelijkheid en -activering door de GR, in vergelijking met cortisol. Uit onze analyse van beschikbare *single-cell RNA sequencing* experimenten bleek dat GR-coregulatoren en downstream targetgenen heterogeen tot expressie komen in leverceltypes van de muis en de mens. Wij concludeerden dat de eigenschappen van CORT118335 kunnen berusten op een uniek GR-interactoom dat resulteert in celtype-specifieke genomische en epigenomische effecten. Zo kan de GR-signalering wellicht een therapeutisch effect hebben op het metabolisme van de vetten die betrokken zijn bij NAFLD-progressie.

Glucocorticoïde hormonen hebben belangrijke effecten op de hersenfunctie, met name in de context van acute en chronische stress. Deze effecten kunnen nuttig (adaptief) zijn of juist de kans op ziekte verhogen (maladaptief). In **hoofdstuk 5** beschrijven wij de werking van GR-antagonisten en -modulatoren in diermodellen voor hersenfunctie en -pathologieën. Wij beargumenteren dat deze stoffen kunnen helpen bij de identificatie van moleculaire processen die verantwoordelijk zijn voor adaptieve en maladaptieve effecten van glucocorticoïden in de hersenen. Met name

de limbische structuren in de hersenen - waaronder de hippocampus - mediëren de effecten van stress en beïnvloeden daardoor de HHB-as. Vooral de hippocampus beschouwd als het belangrijkste functionele glucocorticoïde doelwit in de hersenen. De verstoring van GR-signalering in de hippocampus als gevolg van chronische stress of overmatige blootstelling aan glucocorticoïden kan de neurologische ontwikkeling verstoren, leiden tot neuropsychiatrische aandoeningen en neurodegeneratieve ziekten verergeren. Nieuwe GR-antagonisten en -modulatoren kunnen in dit kader mogelijk ook van nut zijn voor behandeling van dit soort aandoeningen.

Transcriptionele effecten van glucocorticoïden werden voorheen afgeleid uit 'bulk'-mRNA-metingen (bepalingen in een homogenaat van weefsel) of uit expressie van enkele genen met goede anatomische resolutie (in situ hybridisatie). Er zijn echter maar weinig gegevens die inzicht geven in glucocorticoïd-gestuurde gentranscriptie op celniveau. In **hoofdstuk 6** gebruikten we publiek beschikbare *single-cell RNA sequencing* data om de celtypespecificiteit van GR-signalering in de volwassen muishippocampus te beschrijven. De gegevens bevestigden dat de GR, de coregulatoren en receptoren voor neurotransmitters en neuropeptiden differentieel tot expressie komen in de verschillende populaties van neuronale en niet-neuronale cellen. Onze studie verschaft inzicht in de cellulaire basis van eerdere *bulk* mRNA-gegevens en maakt het mogelijk gerichtere hypothesen te formuleren over de effecten van glucocorticoïden op de functie van de hippocampus.

Glucocorticoïden hebben veel effecten op stemming en cognitie. Deze komen goeddeels voort uit de effecten die GR heeft op gentranscriptie in de hersenen. Op hun beurt hangen deze weer af van de interacties tussen GR en coregulatoren. In **hoofdstuk 7** onderzoeken we de interactie tussen GR en de transcriptionele coregulator UBE3A in een muismodel voor het Angelmansyndroom. In het Angelmansyndroom veroorzaakt de afwezigheid van UBE3A in zenuwcellen ernstige verstoring van de neurologische ontwikkeling. Muizen met het Angelmansyndroom vertonen angstig gedrag en hebben hippocampus-afhankelijke geheugenstoornissen.

Aan de hand van *in vitro* bepalingen stelden we een sterke cortisol-afhankelijke interactie vast tussen de GR en UBE3A. *In vivo* vonden we dat de muizen met Angelmansyndroom een andere activiteit van de HHB-as hadden, met lage tot niet-detecteerbare niveaus van corticosteron tijdens het dal van het circadiane ritme. Bovendien zagen we in de hippocampus van deze muizen een verhoogde gentranscriptierespons na acute behandeling met corticosteron. Onze resultaten suggereren dat UBE3A de GR-signalering beperkt, waarschijnlijk door een directe

interactie met de GR. Al met al wijst dit erop dat de stressresponsiviteit bij het Angelmansyndroom veranderd is, wat zou kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van angstsymptomen.

Tot slot hebben we in **hoofdstuk 8** de resultaten van dit proefschrift in de context van de huidige wetenschappelijke literatuur geplaatst en het belang besproken van een beter begrip van de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan GR-signalering. De GR is een waardevol therapeutisch doelwit bij stress- en glucocorticoïd-gerelateerde ziekten. Dit proefschrift toont niet alleen de potentie van selectieve GR-antagonisten en -modulatoren in de behandeling van deze ziekten, maar biedt bovendien nieuwe inzichten in de complexiteit van GR-signalering in gezondheid en ziekte.