

# The ultradian rhythm of glucocorticoid secretion and the time course of target gene regulation

V.M. Merkulov<sup>1</sup>, N.V. Klimova<sup>1</sup>, T.I. Merkulova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Glucocorticoid hormones (cortisol in humans and corticosterone in rodents) are secreted in discrete pulses during a day with a periodicity of approximately 1 h (ultradian rhythm), and this pattern is also maintained in plasma and extracellular fluid. However, the vast majority of studies on gene regulation by glucocorticoids typically assess gene responses regardless the ultradian rhythm. These experiments are usually performed using long-term stimulation with synthetic hormones (dexamethasone and triamcinolone), which form much more stable complexes with glucocorticoid receptor (GR) than natural hormones. This review summarizes the current scarce information, obtained in experiments mimicking the ultradian mode of natural hormone secretion in cultured cells and in animal models. The results of these experiments clearly demonstrate that ultradian stimulation by natural hormones induces rapid GR exchange with glucocorticoid response elements and leads to cyclic GR mediated transcriptional regulation (gene pulsing) at the level of nascent RNA. In contrast, synthetic glucocorticoids, having much higher receptor affinity, fail to disengage from nuclear receptors with sufficient speed to support the ultradian cycles, thereby uncoupling extracellular hormone fluctuations from appropriate receptor function at response elements. This alters RNA accumulation profiles dramatically. These findings suggest potentially important consequences of ultradian secretion. The transcriptional program induced by hormone pulses differs significantly from that generated by constant hormone treatment. Thus, treatment with synthetic glucocorticoids may not provide an accurate assessment of physiological hormone action.

**Key words:** glucocorticoid hormones; ultradian rhythm; target genes; transcription; dynamics.

## Внутрисуточный ритм секреции глюкокортикоидов и динамика генного ответа

В.М. Меркулов<sup>1</sup>, Н.В. Климова<sup>1</sup>, Т.И. Меркулова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Секреция глюкокортикоидных гормонов (кортизола у людей и кортикостерона у грызунов) надпочечниками в течение суток имеет пульсирующий характер, с периодом примерно в 1 ч (ультрадианный, или внутрисуточный ритм), что находит отражение в содержании их в плазме и межклеточной жидкости. Однако подавляющее большинство исследований по регуляции экспрессии генов глюкокортикоидами выполнено без учета внутрисуточных колебаний гормонального уровня с использованием синтетических гормонов (дексаметазон, триамценолон), характеризующихся на порядок более прочными комплексами с рецептором глюкокортикоидов (ГР), чем природные гормоны. В настоящем обзоре собраны результаты пока немногочисленных исследований, проведенных с помощью воспроизводящей ультрадианный ритм обработки природными глюкокортикоидами как культур клеток, так и адrenaлэктомированных животных. Анализ этих данных показывает, что в условиях физиологических пульсаций природных гормонов наблюдаются аналогичные часовые пульсации в связывании ГР со своими сайтами на ДНК (GREs) в ядрах клеток и такие же пульсации экспрессии генов на уровне первичных транскриптов как в культуре клеток, так и в разных органах экспериментальных животных. В противоположность этому, в результате циклической обработки синтетическим глюкокортикоидом дексаметазоном, так же как и в случае постоянного присутствия как природных, так и синтетических глюкокортикоидов, никаких пульсаций не происходит. Кроме того, количество зрелой мРНК исследованных генов оказывается существенно ниже в случае циклической обработки природными глюкокортикоидами по сравнению с циклическим введением дексаметазона или постоянным присутствием гормонов. Авторы проведенных исследований выдвигают предположение о том, что пульсация генов имеет большое значение для формирования правильного ответа на глюкокортикоидные гормоны и что постоянная гормональная стимуляция может приводить к искажению характера транскрипта клеток-мишеней и, следовательно, вызывать нежелательные физиологические последствия.

**Ключевые слова:** глюкокортикоидные гормоны; внутрисуточный ритм; гены-мишени; транскрипция; динамика.

### HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Merkulov V.M., Klimova N.V., Merkulova T.I. The ultradian rhythm of glucocorticoid secretion and the time course of target gene regulation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(2):214–221. DOI 10.18699/VJ15.027

### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Меркулов В.М., Климова Н.В., Меркулова Т.И. Внутрисуточный ритм секреции глюкокортикоидов и динамика генного ответа. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015;19(2):214–221. DOI 10.18699/VJ15.027

DOI 10.18699/VJ15.027

УДК 577.171:577.2:57.034

Received 15.12.2014 г.

Accepted for publication 09.02.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

e-mail: merkti@niboch.nsc.ru

Глюкокортикоидные гормоны являются регуляторами основных процессов жизнедеятельности организма позвоночных животных – координированного роста, дифференцировки, размножения, адаптации, поведения. Глюкокортикоиды участвуют в регуляции углеводного, белкового и липидного обмена, в поддержании водного и электролитного баланса, вовлечены в контроль пролиферации, дифференцировки и апоптоза многих типов клеток, 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 (Hierholzer, Buhler, 1996).

Действие глюкокортикоидов на клетки-мишени реализуется через их связывание с внутриклеточным белком-рецептором. Рецептор глюкокортикоидов (ГР, NR3C1) является лиганд-активируемым фактором транскрипции, принадлежащим суперсемейству ядерных рецепторов (Mangelsdorf et al., 1995). В отсутствие гормона ГР удерживается в цитоплазме клетки в составе мультибелкового комплекса, включающего несколько молекулярных шаперонов (Pratt et al., 2004). После связывания с гормоном ГР претерпевает изменения конформации, приводящие к диссоциации комплекса, высвобождению сигналов ядерной локализации (NLS) рецептора и переходу его в клеточное ядро (Nishi, Kawata, 2006). В ядре клетки ГР связывается со специфическими участками ДНК – элементами глюкокортикоидной регуляции (GREs) (Schoneveld et al., 2004; Merkulov, Merkulova, 2009), где взаимодействует с рядом других факторов транскрипции, кофакторными белками (включая гистонацетилазные и гистондеацетилазные комплексы), медиаторными и хроматинре моделирующими комплексами, что в итоге приводит к активации либо репрессии генов под действием глюкокортикоидных гормонов (Kino et al., 1999; Wallberg et al., 2000; Schoneveld et al., 2004; Merkulov, Merkulova, 2009).

Известно, что секреция глюкокортикоидных гормонов (кортизола у людей и кортикостерона у грызунов) надпочечниками и, соответственно, их уровень в плазме крови подчиняются суточному (циркадному) ритму. Этот ритм характеризуется низким уровнем гормонов в начале биологической ночи, что соответствует времени засыпания, его резким подъемом к середине биологической ночи, достижением максимума к моменту пробуждения и постепенным снижением гормонального уровня до момента начала нового суточного цикла (Morris et al., 2012). Более того, секреция глюкокортикоидных гормонов в течение суток имеет пульсирующий характер, с периодом примерно в 1 ч (ультрадианный, или внутрисуточный, ритм), что также находит отражение в их содержании в плазме и межклеточной жидкости (Lightman, 2006; Droste et al., 2008; Lightman et al., 2008; Qian et al., 2012). Однако влияние происходящих в организме пульсаций гормонального уровня как на поведение самого ГР, так и на экспрессию контролируемых им генов, до сих пор остается весьма слабо изученным. Большинство исследований по регуляции экспрессии генов глюкокортикоидами выполнено на достаточно далеких от физиологических условий моделях

одноразовой обработки синтетическими гормонами либо изолированных клеток, либо адреналэктомированных экспериментальных животных, у которых отсутствуют эндогенные глюкокортикоиды. В настоящем обзоре проведен анализ пока немногочисленных данных, полученных с использованием природных глюкокортикоидов в экспериментах, воспроизводящих физиологические пульсации уровня этих гормонов.

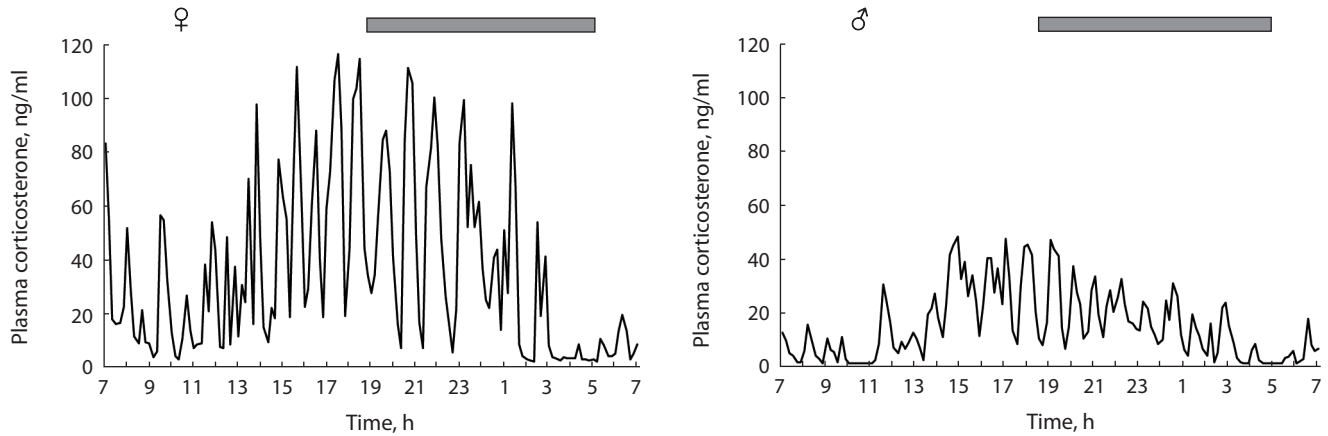
### Влияние пульсаций уровня глюкокортикоидов на взаимодействие ГР с GREs и транскрипцию генов-мишеней на модели клеточной линии 3617

На рис. 1 приведен типичный пример внутрисуточных изменений содержания глюкокортикоидных гормонов в плазме крови, определявшихся у самцов и самок крыс линии Спрэг-Дуули.

Хорошо видны пульсации уровня кортикостерона, когда его содержание в течение, примерно, часа возрастает от очень низких до относительно высоких, характерных для данного периода суток значений, и возвращается к исходному уровню. При этом известно, что характер пульсаций гормонального уровня в норме может модулироваться в зависимости от генотипа организма, его пола и возраста (Conway-Campbell et al., 2012). Особенно сильные вариации как в частоте гормональных пульсаций, так и в их амплитуде и объеме, могут происходить при различных патологических состояниях, таких как депрессия (Young et al., 2001), болезни Альцгеймера и Паркинсона (Hartmann et al., 1997), хронический стресс (Young et al., 2004; Henley et al., 2009) и др.

Для изучения влияния «типичных» часовых пульсаций уровня глюкокортикоидов на взаимодействие ГР с GREs была использована линия клеток 3617. В геноме клеток этой линии встроены тандем повторов LTR MMTV с множественными GREs (всего 800–1200 GREs в одном месте). Также данная линия экспрессирует ГР, слитый с флюоресцирующим белком GFP (Walker et al., 1999). Создание такой линии позволило изучить динамику связывания ГР с GREs в живой клетке. Клетки инкубировали в условиях периодической смены культуральной среды, содержащей и не содержащей кортикостерон, таким образом, чтобы полный цикл добавления гормона/отмывки составлял один час (рис. 2).

Было показано, что в отсутствие гормона флюоресценция GFP наблюдается только в цитоплазме (рис. 2). После добавления в культуральную среду кортикостерона ГР-GFP переходил в ядро клетки и формировал яркое флюоресцирующее пятно в месте компактной локализации сотен GREs. Это пятно исчезало после отмывки клеток от гормона. При повторном добавлении и отмывке гормона наблюдался следующий цикл связывания рецептора со специфическими сайтами на ДНК и удаления его с этих сайтов (рис. 2, а, б). Важно отметить, что, когда в данном эксперименте использовали синтетический глюкокортикоид дексаметазон, несмотря на смену культуральной среды, содержащей и не содержащей гормон, флюоресцирующее пятно на участке локализации GREs оставалось неизменным, т. е. никаких циклов в связывании/диссоциации ГР не наблюдалось (Stavreva et al., 2009).



**Fig. 1.** Diurnal plasma corticosterone variation in female and male Sprague-Dawley rats.

Plasma corticosterone (ng/ml) was measured for 24 h at 10-min intervals. Hours of darkness (19.00–05.00) are shown with a hatched bar. Adapted from (Seale et al., 2004).

Наблюдаемое различие, вероятно всего, связано с тем, что дексаметазон образует долгоживущие комплексы с ГР (время полужизни около 8–10 ч), в отличие от природных глюкокортикоидов кортикостерона и кортизола, для которых время полужизни комплексов с ГР составляет около 15 мин (Stavreva et al., 2009).

На клеточной линии 3617 было также проведено изучение влияния часовых гормональных пульсаций на характер транскрипции нескольких известных индуцируемых глюкокортикоидами генов: *Suox*, *Tsc22d3*, *Tgm2*, *MT2* и *Per1*. Измерение количества первичных транскриптов этих генов (с использованием праймеров на экзон-интронные границы) показало, что оно изменяется в точном соответствии с пульсациями кортикостерона и динамикой взаимодействия ГР-GFP с GREs. Для каждого исследованного гена количество первичного транскрипта быстро увеличивалось в результате подачи гормона и снижалось до исходного уровня после его удаления. В ходе данного эксперимента было проведено 8 часовых циклов подачи/удаления кортикостерона и, соответственно, наблюдалось 8 часовых циклов изменения уровня транскрипции для всех исследованных генов. Авторы назвали открытое ими явление пульсацией генов (**gene pulsing**) (Stavreva et al., 2009).

Важно отметить, что при постоянном присутствии кортикостерона в культуральной среде пульсации в синтезе первичных транскриптов с этих генов не наблюдалось, но в целом уровень их экспрессии был выше, чем в условиях периодического добавления/отмывки гормона. Более высокий уровень экспрессии генов при отсутствии их пульсации регистрировался и в том случае, если в экспериментах по периодическому добавлению/отмывке гормона вместо кортикостерона использовали синтетический глюкокортикоид дексаметазон, образующий долгоживущие комплексы с ГР (Stavreva et al., 2009).

### Влияние гормональных пульсаций на уровень зрелой мРНК

Поскольку синтез первичного транскрипта является первой стадией процесса генной экспрессии, эффектив-

ность которого в значительной мере зависит также от последующих стадий, возникает закономерный вопрос о влиянии внутрисуточных пульсаций уровня глюкокортикоидных гормонов на количество зрелой мРНК индуцируемых этими гормонами генов. Хотя исследование зависимости уровня мРНК и динамики его изменений от способа гормональной обработки было проведено на небольшом числе генов (*MT2*, *Per1* и *Fkbp5*), его результаты представляют значительный интерес. В частности, было показано, что для гена *Per1* часовые пульсации в обработке клеток кортикостероном приводят не только к волнообразной динамике синтеза первичного транскрипта, но и подобному волнообразному изменению уровня зрелой мРНК. В противоположность этому, пульсации первичного транскрипта гена *MT2* оказались полностью сглаженными на уровне постепенного накопления зрелой мРНК этого гена. Такую же динамику накопления демонстрировала мРНК гена *Fkbp5* (Stavreva et al., 2009). Таким образом, явление пульсации генов на уровне зрелой мРНК в настоящий момент продемонстрировано только для гена *Per1*. Это, очевидно, связано с очень коротким временем полужизни его мРНК (менее 30 мин, Hardin et al., 1992). Можно ожидать, что для других индуцируемых глюкокортикоидами генов с короткоживущими мРНК будет также выявлено волнообразное изменение содержания зрелых транскриптов, повторяющее природные гормональные пульсации.

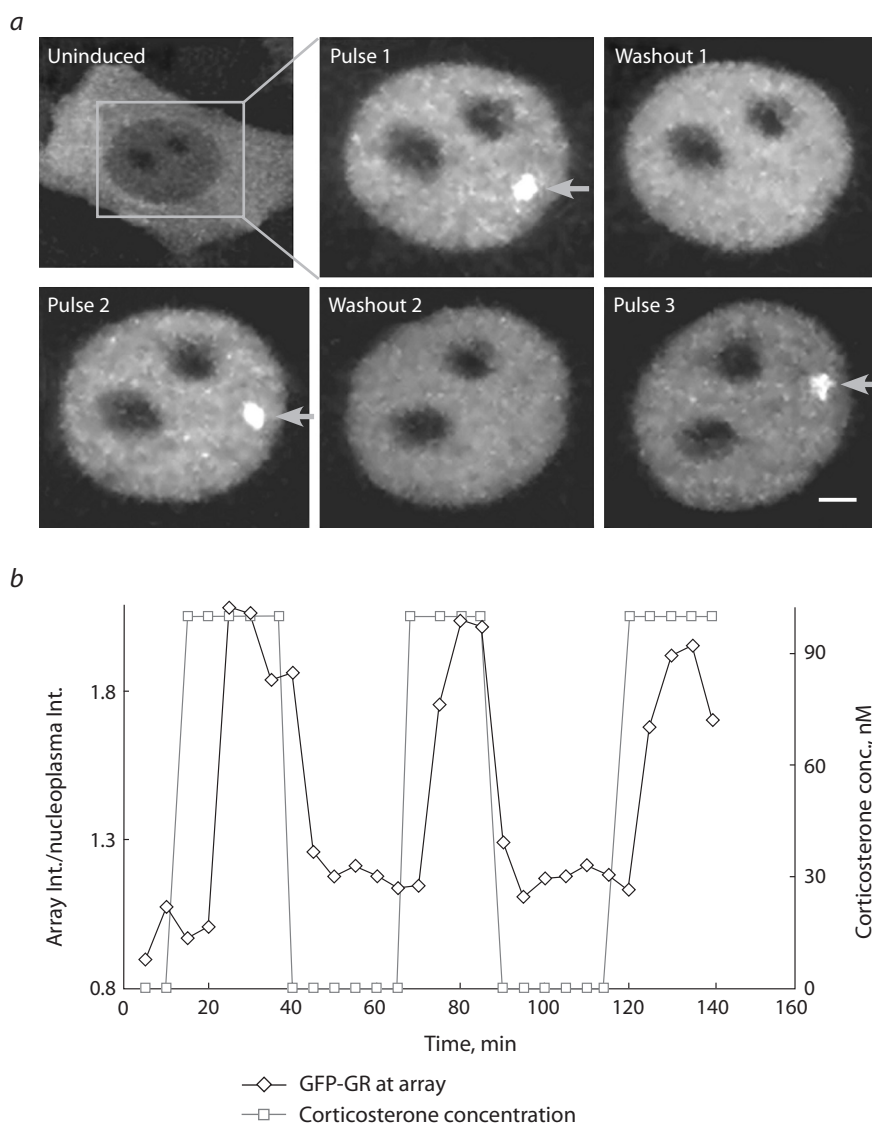
Еще одним очень важным результатом данного исследования является то, что для всех трех исследованных генов количество зрелой мРНК было существенно выше в условиях постоянного присутствия кортикостерона в культуральной среде по сравнению с циклической обработкой клеток этим гормоном. Одноразовая обработка клеток дексаметазоном также приводила к повышению содержания зрелой мРНК этих генов по сравнению с циклической обработкой клеток кортикостероном. Повышение количества мРНК сопровождалось увеличением содержания в клетках соответствующих белковых продуктов (Stavreva et al., 2009). **Анализируя полученные данные**, авторы выдвинули предположение о том, что пульсация

генов имеет большое значение для формирования правильного ответа на глюкокортикоидные гормоны и что постоянная гормональная стимуляция может приводить к искажению характера как транскриптома, так и протеома клетки-мишени, и, следовательно, вызывать нежелательные физиологические последствия.

### Влияние гормональных пульсаций на характер транскрипции индуцируемых глюкокортикоидами генов в организме экспериментальных животных

Для изучения эффектов гормональных пульсаций в условиях *in vivo* были использованы адrenaлэктомированные крысы линии Спрэг-Дуули, получавшие кортикостерон в заданные интервалы времени через вживленную в вену канюлю. На данной модели были исследованы активация ГР и синтез первичного транскрипта гена *Per1* в печени (Stavreva et al., 2009) и гиппокампе (Conway-Campbell et al., 2010) в условиях, воспроизводящих природный характер внутрисуточных пульсаций гормона у крыс этой линии (см. рис. 1, Seale et al., 2004). Из данных, приведенных на рис. 3, видно, что через 1 мин после инъекции в плазме крови детектируется максимальный уровень кортикостерона, который затем снижается до нулевых значений в течение часа. За каждым пиком повышения уровня кортикостерона следует пик активации ГР как в печени, так и гиппокампе, детектируемый по способности ГР связываться с содержащим GRE олигонуклеотидом в условиях *in vitro*. Этот пик сопровождается увеличением количества первичного транскрипта *Per1*, которое затем снижается практически до нулевого уровня. При повторном введении гормона цикл повторяется. Кроме того, методом иммунопреципитации хроматина (ChIP) была исследована динамика связывания ГР с GRE в промоторном районе гена *Per-1*, которая совпала с динамикой активации ГР (Stavreva et al., 2009; Conway-Campbell et al., 2010).

Таким образом, было показано, что на уровне образования первичного транскрипта явление пульсации генов наблюдается и в различных органах живого организма.



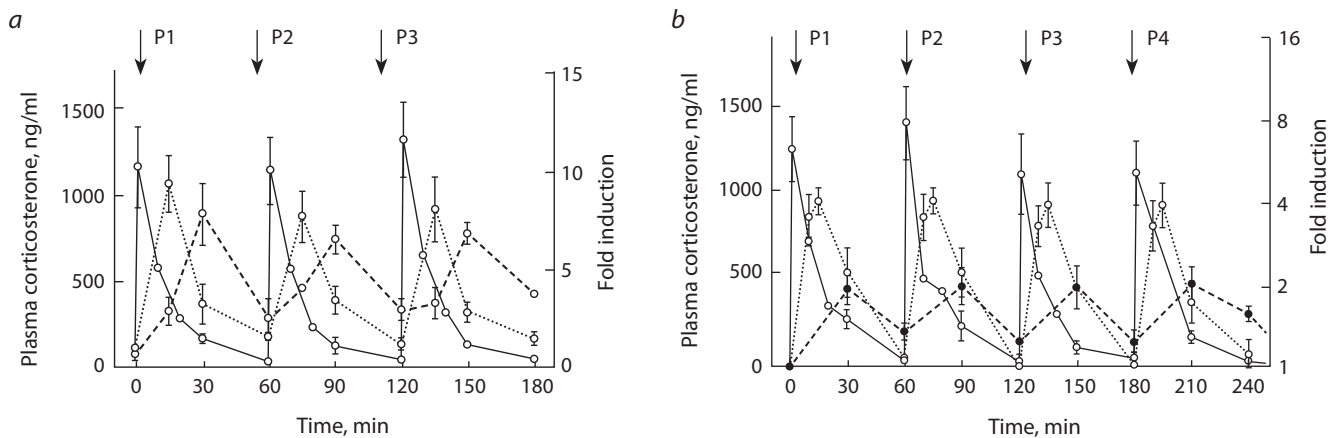
**Fig. 2.** Treatment of cell line 3617 with corticosterone pulses causes cyclic binding of GH to the tandem array of MMTV LTRs, containing multiple GREs.

a. In noninduced cells (prior to hormone treatment), GH-GFP is located mainly in cytoplasm. Corticosterone addition (Pulse 1) causes GH-GFP translocation to the nucleus, where the protein is visualized in a region of compact location of GREs (luminescent spot indicated with an arrow). Flushing of the ligand (Flush 1) causes rapid dissociation of GR-GFP from the GREs. Each subsequent corticosterone addition–flushing, imitating hourly variations of glucocorticoid level causes repetition of the GH-GFP binding cycle. b. Fluorescence intensity shows that the dissociation of the GR-GFP complex from the GRE site occurs no later than 10 min after the cessation of cell treatment with the hormone. Adapted from (Stavreva et al., 2009).

### Обсуждение

Синтетические глюкокортикоиды, такие как дексаметазон и триамценолон, характеризующиеся высокой стабильностью в водных растворах и биологических жидкостях, а также высокой прочностью их комплексов с ГР, в течение многих лет использовались практически во всех работах по изучению влияния глюкокортикоидных гормонов на экспрессию различных генов и выяснению механизмов глюкокортикоидной регуляции. С помощью этих гормонов были получены высокоочищенные препараты ГР и впервые для эукариотических регуляторных белков показана способность одного из них (ГР) опознавать определенные участки ДНК (Wrangle et al., 1979; Payvar et al., 1981; Gustafsson, 2005), что затем привело к выявлению сотен GREs в различных генах (Merkulov, Merkulova, 2009). В более поздних работах, в экспериментах по изучению





**Fig. 3.** Activation of GH and expression of the *Per1* gene in adrenalectomized rats under conditions mimicking natural diurnal corticosterone pulses: (a) in the liver, (b) in the hippocampus.

a. Each corticosterone administration (P1, P2, P3, where P is pulse) is accompanied by hormone level rise in blood plasma after 1 min followed by decrease 10 min after the injection (solid curve). Each hormone pulse is accompanied by GR activation in the liver (dotted curve) followed by elevated transcription of the *Per1* gene (dashed curve) (from Stavreva et al., 2009). b. Similar results were obtained with the hippocampus: solid curve, plasma corticosterone; dotted curve, dynamics of GR activation; dashed curve, variation of *Per1* expression. Adapted from (Conway-Campbell et al., 2010).

транскриптомов с помощью микрочипов или массового параллельного секвенирования (RNA-seq) с применением синтетических гормонов были выявлены многие сотни генов-мишеней глюкокортикоидов в различных органах и тканях (Planey et al., 2003; Wang et al., 2003; Agbemafe et al., 2005; Gupta et al., 2005; Phuc Le et al., 2005; Reddy et al., 2009; Himes et al., 2014).

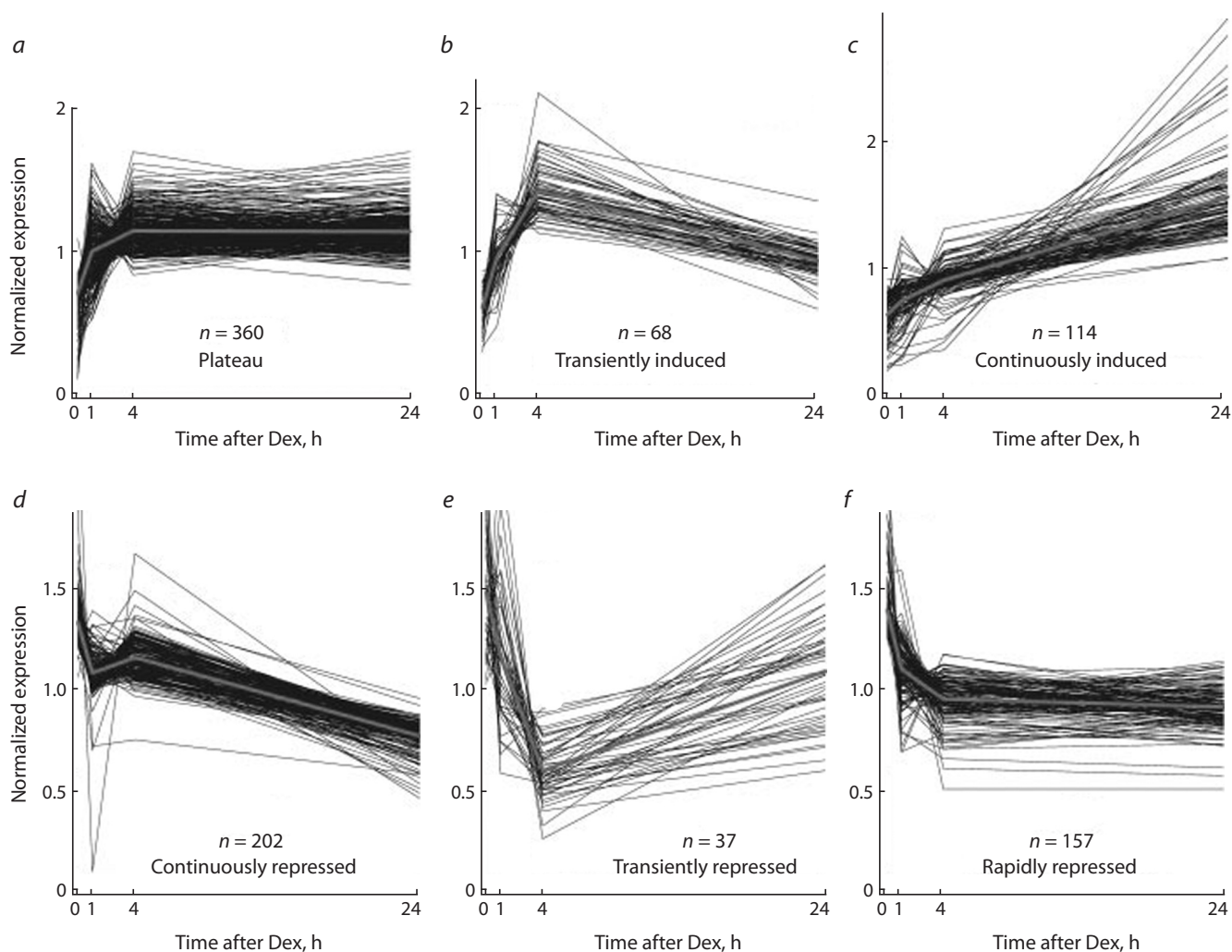
С использованием синтетического глюкокортикоида дексаметазона было также проведено изучение динамики гормонального ответа сотен генов на двух клеточных линиях мыши, 3134 (клетки молочной железы) и AtT20 (кортикотрофы гипофиза) (John et al., 2009). Исследование было выполнено с помощью микрочипового анализа кДНК, синтезированной с использованием препаратов мРНК, полученных в разные интервалы времени после обработки клеток гормоном. Результаты данного исследования показали, что процесс как индукции, так и репрессии под действием глюкокортикоидов может по-разному разворачиваться во времени для разных групп генов. Среди генов, индуцируемых дексаметазоном, были выделены три основные группы: 1) гены, увеличение уровня мРНК которых происходит в первые 2–4 ч, и затем он выходит на плато; 2) гены, увеличение уровня мРНК которых в первые 2–4 ч сменяется его падением, и 3) гены, демонстрирующие постоянно нарастающее содержание мРНК под действием дексаметазона (рис. 4).

Также три группы выделялись при анализе генов, репрессируемых этим гормоном: 1) конститутивно репрессируемые гены, уровень мРНК которых постоянно снижается; 2) гены, постепенно восстанавливающие уровень мРНК после его быстрого падения в течение первых четырех часов гормональной обработки, и 3) гены, не восстанавливающие этот уровень после его быстрого падения (рис. 4). При выборочном исследовании динамики глюкокортикоидной регуляции генов, представляющих все перечисленные группы, на уровне первичных транскриптов были получены точно такие же

результаты, что указывает на заданность этого процесса особенностями строения регуляторных районов генов указанных групп.

Однако, несмотря на получение глубоких фундаментальных знаний о механизмах глюкокортикоидной регуляции, использование в исследованиях синтетических глюкокортикоидов не отвечает на вопрос о динамике генного ответа в организме, вызываемого природными глюкокортикоидами, секреция которых происходит в соответствии с суточными (циркадными) и внутрисуточными (ультрадианными) ритмами и модулируется в ответ на разнообразные стрессы (Conway-Campbell et al., 2012). Немногочисленные работы, выполненные с использованием природных глюкокортикоидов в условиях, воспроизводящих физиологические пульсации уровня этих гормонов, указывают на существенные различия в наблюдаемой в этих случаях динамике гормонального ответа по сравнению с той, которая регистрируется при применении синтетических гормонов, даже если они вводятся по схеме, соответствующей ультрадианному ритму. Эти различия заключаются как в отсутствии пульсаций генной экспрессии, которая наблюдается при использовании только природных гормонов, так и в общем повышении уровня гормональной индукции при использовании синтетических глюкокортикоидов.

Важно отметить, что результаты исследований динамики ответа различных генов на природные глюкокортикоиды вносят новый вклад в понимание механизмов ген-специфичной глюкокортикоидной регуляции. Хорошо известно, что, хотя ГР экспрессируется практически во всех типах клеток (Thompson, 1987; Chrousos et al., 2004), наборы генов, контролируемых этими гормонами в различных тканях, существенно различаются (So et al., 2007; Gross, Cidlowski, 2008). 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



**Fig. 4.** Typical profiles of gene induction and repression by dexamethasone in cell line 3134.

Cells were treated with 100 nM dexamethasone for 0, 2, 4, and 24 h. *a.* Genes whose mRNA levels rapidly respond to the treatment and then level off. *b.* Genes whose mRNA level increase is followed by decrease. *c.* Genes showing constant increase of expression in response to the hormone. *d.* Constitutively repressed genes (mRNA constantly decreases). *e.* Genes whose mRNA is gradually restored after an abrupt fall. *f.* Genes whose expression rapidly and stably decreases in response to the hormone. Similar results were obtained with AtT20 cells. Adapted from (John et al., 2009); *n*, number of genes.

клетке (John et al., 2009). По современным представлениям, основной вклад в осуществление специфичности глюкокортикоидной регуляции различных генов-мишеней ГР вносит организация их регуляторных районов, которая включает как особенности структуры GREs (Merkulov, Merkulova, 2009), так и наличие других регуляторных элементов, обеспечивающих возможность взаимодействия ГР с другими транскрипционными факторами (Truss, Beato, 1993; Schoneveld et al., 2004). Еще одним механизмом обеспечения специфичности является способность ГР образовывать ряд изоформ за счет альтернативного сплайсинга мРНК и использования альтернативных стартов трансляции при синтезе белка (Oakley, Cidlowski, 2011). Выявление различий в ответе генов на физиологические пульсации природных глюкокортикоидов (Stavreva et al., 2009) открывает еще один уровень ген-специфической регуляции этими гормонами.

Результаты сравнительного исследования динамики ответа на природные и синтетические долгоживущие глю-

кокортикоиды представляют также значительный интерес для фармакологии и медицины, поскольку представители последней группы (преднизолон, метилпреднизолон, дексаметазон, бетаметазон, триамценолон и др.) широко применяются в терапии воспалительных и аутоиммунных заболеваний, таких как астма, аллергия, ревматоидный артрит, язвенный колит и рассеянный склероз (Miner et al., 2005; Rhen, Cidlowski, 2005; Stahn et al., 2007). Эти гормоны также обычно прописывают пациентам для предотвращения отторжения трансплантатов и лечения злокачественных заболеваний лимфоидной системы (лейкемий, лимфом и миелом) (Oakley, Cidlowski, 2013). К сожалению, изучение влияния пульсаций природных глюкокортикоидов пока не проводилось на генах, экспрессия которых подавляется глюкокортикоидными гормонами. Это является существенным пробелом, поскольку репрессия генов под действием глюкокортикоидов считается основным механизмом их противовоспалительного и иммуносупрессорного действия (Belvisi et al., 2001; Catley,

2007). В связи с необходимостью обстоятельного изучения механизмов трансрепрессии для разработки новых подходов к лечению воспалительных и аутоиммунных заболеваний можно надеяться, что этот пробел будет закрыт в ближайшем будущем.

Известно, что длительный прием препаратов глюкокортикоидных гормонов приводит к целому ряду нежелательных побочных эффектов, включающих остеопороз, диабет, атрофию кожи, абдоминальное ожирение, глаукому, задержку роста у детей, гипертензию и др. (Miner et al., 2005; Rhen, Cidlowski, 2005), что является основной проблемой их терапевтического применения. До сих пор основные усилия по решению этой проблемы были сосредоточены на поиске новых селективных лигандов ГР (Stahn et al., 2007; Löwenberg et al., 2008; Skuza et al., 2011; Bareille et al., 2013; Baiula, Spampinato, 2014; Saksida et al., 2014), действие которых может быть ограничено различными функциональными группами генов-мишеней ГР, а также на разработке средств воздействия на кофакторы, вовлеченные в глюкокортикоидную регуляцию определенных групп генов (Simons, 2010). В последнее время также активно разрабатываются подходы к оптимизации схем введения природных глюкокортикоидов, воспроизводящих не только суточные (циркадные) ритмы секреции этих гормонов (Barbetta et al., 2005; Verma et al., 2010; Johannsson et al., 2012), но и внутрисуточные (ультрадианные) ритмы (Russell, Lightman, 2014). Предполагается, что развитие таких подходов поможет существенно уменьшить негативные последствия глюкокортикоидной терапии (Henley, Lightman, 2014; Russell, Lightman, 2014).

## Acknowledgments

This work was supported by budgeted project VI.58.1.2 from the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

## Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interest.

## References

Agbemafla B.M., Oesterreicher T.J., Shaw C.A., Henning S.J. Immediate early genes of glucocorticoid action on the developing intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2005;288:G897-G906. DOI: 10.1152/ajpgi.00454.2004

Baiula M., Spampinato S. Mapracorat, a novel non-steroidal selective glucocorticoid receptor agonist for the treatment of allergic conjunctivitis. *Inflamm. Allergy Drug Targets.* 2014;13(5):289-298. DOI: 10.2174/1871528113666141106101356

Barbetta L., Dall'Asta C., Re T., Libè R., Costa E., Ambrosi B. Comparison of different regimes of glucocorticoid replacement therapy in patients with hypoadrenalism. *J. Endocrinol. Invest.* 2005;28(7):632-637.

Bareille P., Harges K., Donald A.C. Efficacy and safety of once-daily GW870086 a novel selective glucocorticoid in mild-moderate asthmatics: a randomised, two-way crossover, controlled clinical trial. *J. Asthma.* 2013;50(10):1077-1082. DOI: 10.3109/02770903.2013.837480

Belvisi M.G., Wicks S.L., Battram C.H., Bottoms S.E., Redford J.E., Woodman P., Brown T.J., Webber S.E., Foster M.L. Therapeutic benefit of a dissociated glucocorticoid and the relevance of *in vitro* separation of transrepression from transactivation activity. *J. Immunol.* 2001;166(3):1975-1982. DOI: 10.4049/jimmunol.166.3.1975

Catley M. Dissociated steroids. *Sci. World J.* 2007;7:421-430. DOI: 10.1100/tsw.2007.97

Chrousos G.P., Charmandari E., Kino T. Glucocorticoid action networks – an introduction to systems biology. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89:563-564. DOI: 10.1210/jc.2003-032026

Conway-Campbell B.L., Sarabdjitsingh R.A., McKenna M.A., Pooley J.R., Kershaw Y.M., Meijer O.C., De Kloet E.R., Lightman S.L. Glucocorticoid ultradian rhythmicity directs cyclical gene pulsing of the clock gene period 1 in rat hippocampus. *J. Neuroendocrinol.* 2010;22(10):1093-100. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2010.02051.x

Conway-Campbell B.L., Pooley J.R., Hager G.L., Lightman S.L. Molecular dynamics of ultradian glucocorticoid receptor action. *Mol. Cell Endocrinol.* 2012;348(2):383-393. DOI: 10.1016/j.mce.2011.08.014

Droste S.K., de Groot L., Atkinson H.C., Lightman S.L., Reul J.M., Linthorst A.C. Corticosterone levels in the brain show a distinct ultradian rhythm but a delayed response to forced swim stress. *Endocrinology.* 2008;149(7):3244-53. DOI: 10.1210/en.2008-0103

Gross K.L., Cidlowski J.A. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol. Metab.* 2008;19:331-339. DOI: 10.1016/j.tem.2008.07.009

Gupta V., Galante A., Soteropoulos P., Guo S., Wagner B.J. Global gene profiling reveals novel glucocorticoid induced changes in gene expression of human lens epithelial cells. *Mol. Vis.* 2005;11:1018-1040.

Gustafsson J.A. Steroids and scientist. *Mol. Endocrinol.* 2005;19:61412-61417. DOI: 10.1210/me.2004-0479

Hardin P.E., Hall J.C., Rosbash M. Circadian oscillations in period gene mRNA levels are transcriptionally regulated. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1992;89(24):11711-11715.

Hartmann A., Veldhuis J.D., Deuschle M., Standhardt H., Heuser I. Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: ultradian secretory pulsatility and diurnal variation. *Neurobiol. Aging.* 1997;18(3):285-289. DOI: 10.1016/S0197-4580(97)80309-0

Henley D.E., Russell G.M., Douthwaite J.A., Wood S.A., Buchanan F., Gibson R., Woltersdorf W.W., Catterall J.R., Lightman S.L. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in obstructive sleep apnea: the effect of continuous positive airway pressure therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009;94(11):4234-4342. DOI: 10.1210/jc.2009-1174

Henley D.E., Lightman S.L. Cardio-metabolic consequences of glucocorticoid replacement: relevance of ultradian signaling. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2014;80(5):621-628. DOI: 10.1111/cen.12422

Hierholzer K., Buhler H. Metabolism of cortical steroid hormones and their general mode of action. *Comprehensive human physiology.* Ed. R. Greger, U. Windhorst. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1996.

Himes B.E., Jiang X., Wagner P., Hu R., Wang Q., Klanderman B., Whitaker R.M., Duan Q., Lasky-Su J., Nikolos C., Jester W., Johnson M., Panettieri R.A. Jr., Tantisira K.G., Weiss S.T., Lu Q. RNA-Seq transcriptome profiling identifies CRISPLD2 as a glucocorticoid responsive gene that modulates cytokine function in airway smooth muscle cells. *PLoS One.* 2014;9(6):e99625. DOI: 10.1371/journal.pone.0099625

Johannsson G., Nilsson A.G., Bergthorsdottir R., Burman P., Dahlqvist P., Ekman B., Engström B.E., Olsson T., Ragnarsson O., Ryberg M., Wahlberg J., Biller B.M., Monson J.P., Stewart P.M., Lennernäs H., Skrtic S. Improved cortisol exposure-time profile and outcome in patients with adrenal insufficiency: a prospective randomized trial of a novel hydrocortisone dual-release formulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012;97(2):473-481. DOI: 10.1210/jc.2011-1926

John S., Johnson T.A., Sung M.H., Biddie S.C., Trump S., Koch-Paiz C.A., Davis S.R., Walker R., Meltzer P.S., Hager G.L. Kinetic complexity of the global response to glucocorticoid receptor action. *Endocrinology.* 2009;150(4):1766-1774. DOI: 10.1210/en.2008-0863

Kino T., Nordeen S.K., Chrousos G.P. Conditional modulation of glucocorticoid receptor activities by CREB-binding protein (CBP) and



- p300. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1999;70(1/3):15-25. DOI: 10.1016/S0960-0760(99)00100-4
- Lightman S.L. Patterns of exposure to glucocorticoid receptor ligand. *Biochem. Soc. Trans.* 2006;34(6):1117-1118. DOI: 10.1042/BST0341117
- Lightman S.L., Wiles C.C., Atkinson H.C., Henley D.E., Russell G.M., Leendertz J.A., McKenna M.A., Spiga F., Wood S.A., Conway-Campbell B.L. The significance of glucocorticoid pulsatility. *Eur. J. Pharmacol.* 2008;583(2/3):255-262. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.11.073
- Löwenberg M., Stahn C., Hommes D.W., Buttgereit F. Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids.* 2008;73(9/10):1025-1029. DOI: 10.1016/j.steroids.2007.12.002
- Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995;83(6):835-839. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90199-X
- 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;115:1-8. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2009.02.003
- Miner J.N., Hong M.H., Negro-Vilar A. New and improved glucocorticoid receptor ligands. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2005;14(12):1527-1545. DOI: 10.1517/13543784.14.12.1527
- Morris C.J., Aeschbach D., Scheer F.A. Circadian system, sleep and endocrinology. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012;349:91-104. DOI: 10.1016/j.mce.2011.09.003
- Nishi M., Kawata M. **Brain corticosteroid receptor dynamics and trafficking: Implications from live cell imaging.** *Neuroscientist.* 2006;12(2):119-133.
- 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;286:3177-3184. DOI: 10.1074/jbc.R110.179325
- Oakley R.H., Cidlowski J.A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013;132(5):1033-1044. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.09.007
- Payvar F., Wrangé O., Carlstedt-Duke J., Okret S., Gustafsson J.A., Yamamoto K.R. Purified glucocorticoid receptors bind selectively *in vitro* to a cloned DNA fragment whose transcription is regulated by glucocorticoids *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1981;78(11):6628-6632.
- Phuc Le P., Friedman J.R., Schug J., Brestelli J.E., Parker J.B., Bochkis I.M., Kaestner K.H. Glucocorticoid receptor-dependent gene regulatory networks. *PLoS Genet.* 2005;1(2):e16. DOI: 10.1371/journal.pgen.0010016
- Planey S.L., Abrams M.T., Robertson N.M., Litwack G. Role of apical caspases and glucocorticoid-regulated genes in glucocorticoid-induced apoptosis of pre-B leukemic cells. *Cancer Res.* 2003;63:172-178.
- Pratt W.B., Galigniana M.D., Morishima Y., Murphy P.J. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem.* 2004;40:41-58.
- Qian X., Droste S.K., Lightman S.L., Reul J.M., Linthorst A.C. Circadian and ultradian rhythms of free glucocorticoid hormone are highly synchronized between the blood, the subcutaneous tissue, and the brain. *Endocrinology.* 2012;153(9):4346-4353. DOI: 10.1210/en.2012-1484
- Reddy T.E., Pauli F., Sprouse R.O., Neff N.F., Newberry K.M., Garabedian M.J., Myers R.M. Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome Res.* 2009;19(12):2163-2171. DOI: 10.1101/gr.097022.109
- Rhen T., Cidlowski J.A. Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.* 2005;353(16):1711-1723. DOI: 10.1056/NEJMra050541
- Russell G.M., Lightman S.L. Can side effects of steroid treatments be minimized by the temporal aspects of delivery method? *Expert Opin. Drug Saf.* 2014;13(11):1501-1513. DOI: 10.1517/14740338.2014.965141
- Saksida T., Vujicic M., Nikolic I., Stojanovic I., Haegeman G., Stosic-Grujicic S. Compound A, a selective glucocorticoid receptor agonist, inhibits immunoinflammatory diabetes, induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. *Br. J. Pharmacol.* 2014;171(24):5898-5909. DOI: 10.1111/bph.12892
- Schoneveld O.J., Gaemers I.C., Lamers W.H. Mechanisms of glucocorticoid signaling. *Biochem. Biophys. Acta.* 2004;1680(2):114-128.
- Seale J.V., Wood S.A., Atkinson H.C., Bate E., Lightman S.L., Ingram C.D., Jessop D.S., Harbuz M.S. Gonadectomy reverses the sexually dimorphic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *J. Neuroendocrinol.* 2004;16(6):516-524. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2004.01195.x
- Simons S.S.Jr. Glucocorticoid receptor cofactors as therapeutic targets. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2010;10:613-619. DOI: 10.1016/j.coph.2010.08.001
- Skuzza G., Szymańska M., Budziszewska B., Abate C., Berardi F. Effects of PB190 and PB212, new  $\sigma$  receptor ligands, on glucocorticoid receptor-mediated gene transcription in LMCAT cells. *Pharmacol. Rep.* 2011;63(6):1564-1568.
- Stahn C., Löwenberg M., Hommes D.W., Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol. Cell Endocrinol.* 2007;275(1/2):71-78. DOI: 10.1016/j.mce.2007.05.019
- So A.Y., Chaivorapol C., Bolton E.C., Li H., Yamamoto K.R. Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet.* 2007;3:e94. DOI: 10.1371/journal.pgen.0030094
- Stavreva D.A., Wiench M., John S., Conway-Campbell B.L., McKenna M.A., Pooley J.R., Johnson T.A., Voss T.C., Lightman S.L., Hager G.L. Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription. *Nat. Cell Biol.* 2009;11(9):1093-1102. DOI: 10.1038/ncb1922
- Thompson E.B. The structure of the human glucocorticoid receptor and its gene. *J. Steroid Biochem.* 1987;27:105-8. DOI: 10.1016/0022-4731(87)90300-1
- Truss M., Beato M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribo-nucleic acids and transcription factors. *Endocrine Rev.* 1993;14:459-478. DOI: 10.1210/er.14.4.459
- Verma S., Vanryzin C., Sinaii N., Kim M.S., Nieman L.K., Ravindran S., Calis K.A., Arlt W., Ross R.J., Merke D.P. A pharmacokinetic and pharmacodynamic study of delayed- and extended-release hydrocortisone (Chronocort) vs. conventional hydrocortisone (Cortef) in the treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Clin. Endocrinol.* 2010;72(4):441-7. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2009.03636.x
- Wang Z., Malone M.H., He H., McColl K.S., Distelhorst C.W. Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2003;278(26):23861-72386. DOI: 10.1074/jbc.M301843200
- Walker D., Htun H., Hager G.L. Using inducible vectors to study intracellular trafficking of GFP-tagged steroid/nuclear receptors in living cells. *Methods.* 1999;19(3):386-393. DOI: 10.1006/meth.1999.0874
- Wallberg A.E., Flinn E.M., Gustafsson J.A., Wright A.P. Recruitment of chromatin remodelling factors during gene activation via the glucocorticoid receptor N-terminal domain. *Biochem. Soc. Trans.* 2000;28(4):410-414.
- Wrangé O., Carlstedt-Duke J., Gustafsson J.-A. Purification of the glucocorticoid receptor from rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 1979;254(18):9284-9290.
- Young E.A., Carlson N.E., Brown M.B. Twenty-four-hour ACTH and cortisol pulsatility in depressed women. *Neuropsychopharmacology.* 2001;25(2):267-276. DOI: 10.1016/S0893-133X(00)00236-0
- Young E.A., Abelson J., Lightman S.L. Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. *Front. Neuroendocrinol.* 2004;25(2):69-76. DOI: 10.1016/j.yfrne.2004.07.001