

Рецептор глюкокортикоидов: переход из цитоплазмы в клеточное ядро, хроматиновый и внутриядерный шапероновый циклы

В.М. Меркулов, Н.В. Климова, Т.И. Меркулова

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

Рецептор глюкокортикоидных гормонов (ГР) является лиганд-зависимым фактором транскрипции, регулирующим экспрессию сотен генов. В отсутствие гормона ГР находится в цитоплазме клетки в комплексе с молекулярными шаперонами hsp90, hsp70, p23, Hop, FKBP51, FKBP52 и др. В составе этого комплекса ГР приобретает конформацию, обладающую высоким сродством к глюкокортикоидам. После связывания с гормоном рецептор высвобождается из комплекса с шаперонами и переходит в клеточное ядро, где взаимодействует со специфическими участками ДНК (GREs) генов-мишеней глюкокортикоидов, влияя на интенсивность их транскрипции. Затем свободный от гормона ГР выходит из клеточного ядра в цитоплазму, завершая ядерно-цитоплазматический цикл этого белка. Согласно современным представлениям, существуют также внутриядерные хроматиновый и шапероновый циклы ГР. Хроматиновым циклом называется цикл связывания/диссоциации/повторного связывания гормон-рецепторных комплексов с GREs, занимающий от нескольких секунд до нескольких десятков секунд. Шапероновый цикл происходит после диссоциации гормон-рецепторного комплекса в ядрах, когда ГР связывается с присутствующими в них теми же молекулярными шаперонами, которые взаимодействуют с этим белком в цитоплазме, и в результате чего вновь связывает гормон, затем высвобождается из комплекса с шаперонами и снова взаимодействует с GREs. Предполагается, что главным образом за счет существования шаперонового цикла ГР удерживается в ядре клетки в течение нескольких часов. В настоящем обзоре обобщены имеющиеся в литературе данные, на основании которых были построены модели хроматинового и внутриядерного шаперонового циклов ГР и проведен их критический анализ.

Ключевые слова: рецептор глюкокортикоидов; молекулярные шапероны; клеточные ядра; хроматин; циклы.

Glucocorticoid receptor: translocation from the cytoplasm to the nuclei, chromatin and intranuclear chaperone cycles

V.M. Merkulov, N.V. Klimova, T.I. Merkulova

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Glucocorticoid receptor (GR) is a ligand-dependent transcription factor, involved in the regulation of hundreds of genes. In the absence of any ligand, GR resides in the cytoplasm where it is sequestered in a multimeric chaperone complex consisting of hsp90, hsp70, p23, Hop, FKBP51, FKBP52, etc. As part of this multiprotein complex, GR undergoes conformational changes that allow glucocorticoid hormone binding. Upon ligand binding, GR dissociates from chaperone complex and translocates into the nucleus, where it interacts with specific DNA sequences (GREs) in the regulatory regions of target genes and modulates their expression. Then unliganded GR is exported to the cytoplasm, completing the nuclear-cytoplasmic cycle. Recent evidence suggests that, in addition to this cycle, chromatin and chaperone GR cycles exist within the nuclei. The chromatin cycle implies repeated interactions of ligand-bound GR with GREs in the chromatin context lasting for few seconds. The chaperone cycle starts after dissociation of the hormone-receptor complex, when GR binds to the nuclear chaperone machinery. As a result, its hormone-binding affinity is regained. Upon hormone binding, GR releases from chaperone complex and binds to GREs again. It is assumed that the chaperone cycle is mainly responsible for prolonged GR retention in nuclei (half-life within 8–12 h upon steroid withdrawal). In this review, we summarize and critically analyze the published data on chromatin and intranuclear chaperone GR cycles.

Key words: glucocorticoid receptor; molecular chaperones; nuclei; chromatin; cycles.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Меркулов В.М., Климова Н.В., Меркулова Т.И. Рецептор глюкокортикоидов: переход из цитоплазмы в клеточное ядро, хроматиновый и внутриядерный шапероновый циклы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):255-263. DOI 10.18699/VJ15.032

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Merkulov V.M., Klimova N.V., Merkulova T.I. Glucocorticoid receptor: translocation from the cytoplasm to the nuclei, chromatin and intranuclear chaperone cycles. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):255-263. DOI 10.18699/VJ15.032

DOI 10.18699/VJ15.032

УДК 577.17:576.315

Поступила в редакцию 25.05.2015 г.

Принята к публикации 29.06.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: merkti@niboch.nsc.ru

Глюкокортикоидные гормоны являются регуляторами широкого круга процессов, протекающих в организме позвоночных животных, таких как поддержание метаболического гомеостаза, пролиферация клеток, противовоспалительный и иммунный ответ, индивидуальное развитие, размножение и поведение (Boumpas et al., 1993; Schmid et al., 1995; Hierholze, Buhler, 1996; Beato, Klug, 2000). Действие этих гормонов в клетке реализуется через связывание с белком-рецептором глюкокортикоидов (ГР, NR3C1) – транскрипционным фактором из суперсемейства ядерных рецепторов (Mangelsdorf et al., 1995; Смирнов, 2002).

В отсутствие гормона ГР локализован преимущественно в цитоплазме клетки, где он находится в составе комплекса с рядом молекулярных шаперонов (hsp90, hsp70, p23, Нор, FKBP51, FKBP52 и др.), которые необходимы для придания рецепторному белку гормон-связывающей конформации и обеспечивают его защиту от протеолитической деградации (Pratt, Toft, 1997; Cheung, Smith, 2000; Pratt et al., 2004). После того как ГР связывается с гормоном, мультибелковый комплекс диссоциирует либо претерпевает изменения состава, в результате чего происходит переход рецептора в клеточное ядро (Grad, Picard, 2007; Vandevyver et al., 2012). В ядре клетки гормон-рецепторный комплекс связывается со специфическими участками ДНК – элементами глюкокортикоидной регуляции (GREs) (Schoneveld et al., 2004; Merkulov, Merkulova, 2009; Nicolaidis et al., 2010) и привлекает к месту своей посадки ряд кофакторных (p160, p300, CBP) и хроматин-ремоделирующих белков (SWI/SNF). Комплекс этих белков осуществляют локальную реорганизацию структуры хроматина, что способствует привлечению базальных транскрипционных факторов, РНК-полимеразы II и началу транскрипции (Kino et al., 1999; Wallberg et al., 2000). Затем свободный от гормона ГР выходит из клеточного ядра в цитоплазму, завершая ядерно-цитоплазматический цикл этого белка (Vandevyver et al., 2012).

Показано, что стимулируемый гормоном переход ГР в клеточное ядро происходит достаточно быстро (время полуперехода 3–5 мин), тогда как выход этого белка из ядер занимает несколько часов, т. е. ГР находится в ядре клетки довольно долго (Vandevyver et al., 2012). Согласно современным представлениям, находящийся в ядре гормон-рецепторный комплекс может осуществлять множество раундов связывания/диссоциации и повторного связывания с GREs, и каждый такой раунд занимает несколько секунд или несколько десятков секунд. Эти раунды названы хроматиновыми циклами. Если же происходит диссоциация гормон-рецепторного комплекса, свободный ГР может связаться с присутствующими в ядре теми же молекулярными шаперонами, что взаимодействуют с ним в цитоплазме, и в результате этого вновь приобрести способность связывать гормон. Затем образовавшиеся в ядре гормон-рецепторные комплексы теряют связь с шаперонами и вновь взаимодействуют с GREs. Такой внутриядерный, опосредованный взаимодействием с шаперонами, оборот ГР получил название шаперонового цикла. Предполагается, что главным образом за счет существования этого цикла ГР удерживается в ядре клетки

длительное время (George et al., 2009; Miranda et al., 2013; Stavreva et al., 2012).

Основной целью настоящего обзора являлись систематизация имеющихся в литературе данных, на основании которых были построены модели хроматинового и внутриядерного шаперонового циклов ГР, и их критический анализ.

Стимулируемый гормоном переход рецептора глюкокортикоидов в ядро клетки

Известно, что в отсутствие гормона ГР находится в цитоплазме клетки в составе мультибелкового комплекса, содержащего одну молекулу рецепторного белка (Okret et al., 1985), димер белка теплового шока hsp90, а также ряд других молекулярных шаперонов (Pratt, 1993; Pratt, Toft, 1997). В составе этого комплекса ГР принимает конформацию, обладающую высоким сродством к глюкокортикоидам. Показано, что в условиях *in vitro* для создания такой конформации необходимы 5 шаперонных белков (Bresnick et al., 1989). Это белки теплового шока, hsp70, hsp90 и DnaJ/Hsp40, а также hsp90-связывающий белок p23 и hsp70/hsp90-организующий белок Нор, который собирает hsp70 и hsp90 в единый комплекс (Pratt, Toft, 1997; Cheung, Smith, 2000). При этом ведущую роль в открывании лиганд-связывающего кармана ГР играет его взаимодействие с димером hsp90 (Grenert et al., 1999). Показано, что в отсутствие hsp90 сродство ГР к глюкокортикоидным гормонам снижается в 100 раз (Nemoto et al., 1990). Кроме того, в состав цитоплазматического мультибелкового комплекса входят иммунофилины: FKBP51, циклофилин Сур40 и иммунофилинподобный белок – фосфатаза PP5, а также ряд других белков (Grad, Picard, 2007; Echeverria, Picard, 2010). Затем связывание с гормоном ГР меняет конформацию, мультибелковый комплекс диссоциирует или же частично меняет состав, после чего рецептор переходит в клеточное ядро (Echeverria, Picard, 2010).

Предложены два механизма перехода ГР в ядро клетки (рис. 1). Первый заключается в связывании транспортных белков импортинов (кариоферин) с высвободившимися в результате полной диссоциации комплекса сигналами ядерной локализации (NLS) молекулы рецептора. NLS являются специфическими короткими аминокислотными последовательностями, обеспечивающими ядерную локализацию белков. Импортины – это довольно крупные белки (90–120 кДа), на N-конце которых расположен домен, связывающийся с небольшим белком GTP-азой Ran (Ras related nuclear protein), в то время как C-конец взаимодействует с NLS подлежащего транспортировке белка (Nakielny, Dreyfuss, 1999). Импортины осуществляют непосредственный контакт с белками комплекса ядерной поры и транспорт связанного с ними белка внутрь клеточного ядра посредством кооперации с RanGTP-азной системой (Marfogi et al., 2011). Показано, что с основным сигналом ядерной локализации ГР – NL1, расположенным в шарнирном домене рецептора, взаимодействуют гетеродимер импортинов α и β , а также импортины 7 и 8. Сигнал NL2, расположенный в гормон-связывающем домене, распознается только импортинами 7 и 8 (Freedman, Yamamoto, 2004; Vandevyver et al., 2012).

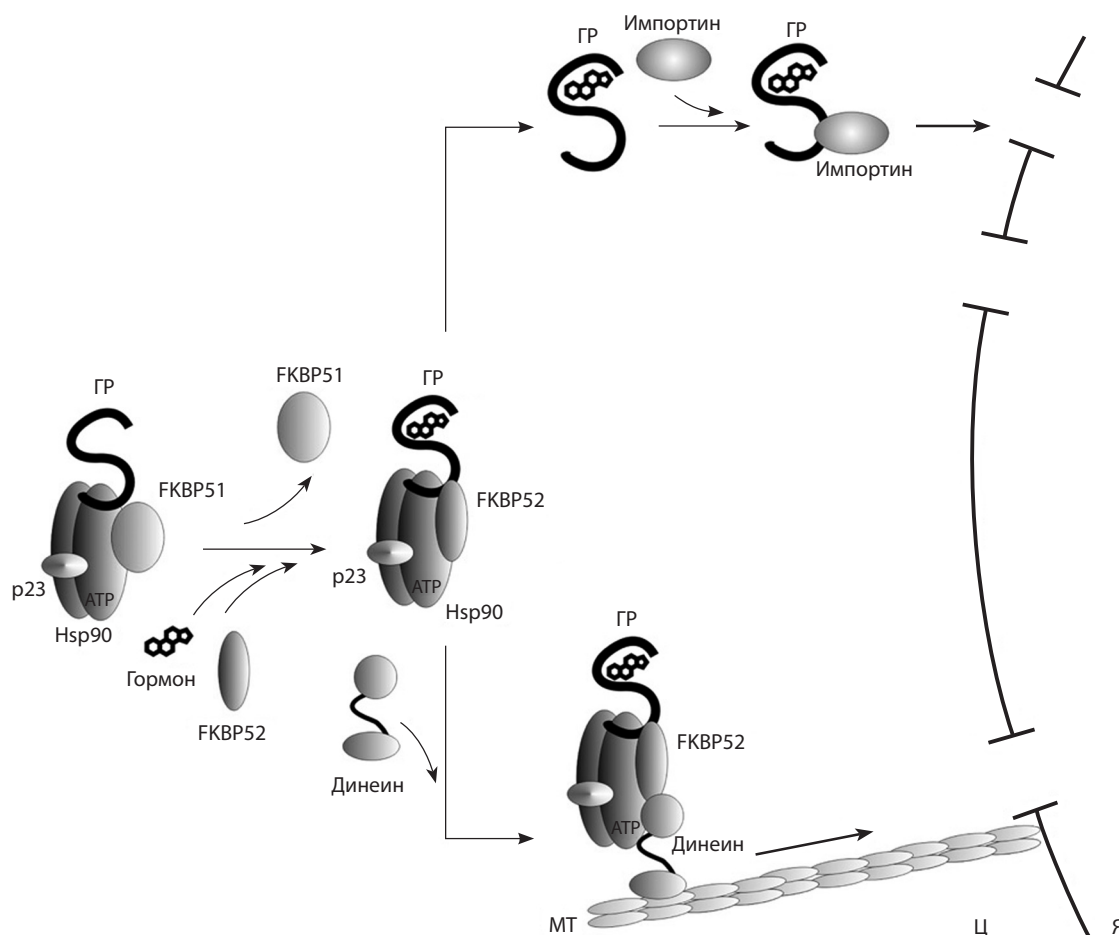


Рис. 1. Два механизма перехода ГР в ядро клетки.
MT – микротрубочки; Ц – цитоплазма; Я – ядро. (Адаптировано по: Grad, Picard, 2007.)

Второй механизм перехода ГР в ядро клетки опосредован шаперонами. В этом случае не происходит диссоциации цитоплазматического мультибелкового комплекса, но частично меняется его состав. В частности, установлено, что в отсутствие гормона в мультибелковой комплекс входит иммунофилин FKBP51. После связывания гормона этот белок быстро замещается другим иммунофилином – FKBP52, в результате чего комплекс перемещается в ядро клетки (Davies et al., 2002). Это перемещение осуществляется за счет непосредственного контакта FKBP52 с моторным белком динеином, способным перемещаться вдоль микротрубочек цитоскелета по направлению к ядру, с использованием АТФ в качестве источника энергии. Таким образом, за счет работы динеина вдоль микротрубочки движется содержащий ГР белковый комплекс (Harrell et al., 2004).

Установлено, что транспорт ГР в ядро происходит достаточно быстро. К настоящему времени проведено большое число исследований по динамике перехода гормон-рецепторных комплексов из цитоплазмы в клеточные ядра. Хотя эти исследования проводились на разных моделях (клеточные культуры, экспериментальные животные), с помощью различных методов и с использованием как природных, так и синтетических глюкокортикоидов, их

результаты практически идентичны. Во всех исследованиях показано, что время полуперехода в ядра гормон-рецепторных комплексов составляет 3–5 мин (см. примеры в работах (Picard, Yamamoto, 1987; Yang, DeFranco, 1994; Sackey et al., 1996; Hache et al., 1999; Savory et al., 1999; Conway-Campbell et al., 2007), что обеспечивает быструю передачу гормонального сигнала к воспринимающим этот сигнал регуляторным элементам генома (GREs).

Хроматиновый цикл

Согласно сложившимся в 80–90-е годы прошлого века представлениям, считалось, что после перехода в ядра гормон-рецепторные комплексы остаются в контакте с GREs в течение длительного времени, обеспечивая открытую структуру хроматина и способствуя связыванию других транскрипционных факторов, необходимых для активации транскрипции (Hager et al., 2000; McNally et al., 2000). Эти представления были подкреплены результатами изучения динамики взаимодействия ГР с опознаваемыми им сайтами в составе изолированных фрагментов ДНК. В частности, было показано, что время полужизни комплекса ГР с синтетическим глюкокортикоидом триамценолоном с фрагментом ДНК LTR MMTV, содержащим несколько GREs, составляет 108 мин (Perlmann et al., 1990).

Однако проведенные позднее эксперименты *in vivo* дали совершенно неожиданные результаты, продемонстрировав, что в живой клетке комплекс ГР с гормоном контактирует со своими сайтами на ДНК не более 5–10 с. Для проведения этих экспериментов была использована клеточная линия, содержащая в геноме tandem повторов LTR MMTV со множественными GREs (всего 800–1200 GREs в одном месте) и экспрессирующая ГР, слитый с флюоресцирующим белком GFP (Walker et al., 1999). Наличие такой линии позволило изучить динамику связывания ГР (в комплексе с синтетическим гормоном дексаметазоном) с GREs в живой клетке с помощью регистрации потери флюоресценции в результате лазерного отбеливания (fluorescence loss in photobleaching, FLIP) и восстановления флюоресценции после фотоотбеливания (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP). Было показано, что при связывании ГР, слитого с флюоресцирующим белком GFP, с местом компактной локализации сотен GREs в ядре клетки наблюдается яркая флюоресцирующая точка, которая исчезает после ее прицельного облучения лазером. Если бы ГР оставался связанным с GREs длительное время, облучение флюоресцирующей точки лазером приводило бы к ее исчезновению надолго, однако оказалось, что флюоресценция очень быстро восстанавливается за счет обмена «потухшего» ГР–GFP на свежий слитый белок из нуклеоплазмы (McNally et al., 2000; George et al., 2009).

Поскольку в обоих описанных экспериментах, *in vivo* и *in vitro*, использовались синтетические глюкокортикоиды, образующие комплексы с ГР с примерно одинаковой стабильностью, полученные противоречия в результатах этих экспериментов, очевидно, связаны с другими причинами. В частности, эти противоречия можно было бы объяснить, предположив, что в ядре клетки находятся факторы, способствующие быстрому сходу гормон-рецепторных комплексов с их мест связывания на ДНК в составе хроматина. И действительно, такие факторы были обнаружены среди белковых комплексов, привлекаемых ГР к месту своей посадки на LTR MMTV и необходимых для ремоделирования хроматина и, как следствие, активации транскрипции. Эти факторы были выявлены при изучении динамики связывания очищенного ГР (в комплексе с дексаметазоном) с искусственно реконструированным хроматином на фрагменте LTR MMTV (–437/+574), в точности воспроизводящем число и положение нуклеосом на этом участке в составе геномной ДНК (Fletcher et al., 2000). Связывание белков с иммобилизованным фрагментом хроматина фиксировалось (за счет образования ковалентных сшивок) периодическим облучением УФ лазером в течение 5 наносекунд, после чего их состав анализировался с помощью Вестерн-блот гибридазации. Оказалось, что при добавлении ГР вместе с белками SWI/SNF хроматин-ремоделирующего комплекса и необходимой для работы этого комплекса АТФ рецептор связывается с фрагментом LTR циклически, когда за одной минутой пребывания ГР в контакте с хроматином следовали 4–5 мин отсутствия рецептора в исследуемом препарате. При этом SWI/SNF комплекс осуществлял сходные циклы связывания/диссоциации (McNally et al., 2000; Nagaich et al., 2004). Было также показано, что

в отсутствие SWI/SNF или АТФ ГР находился в комплексе с иммобилизованным фрагментом хроматина постоянно (Fletcher et al., 2002; Nagaich et al., 2004). При уменьшении соотношения SWI/SNF:ГР с 1 : 1 до 0,1 : 1 время цикла увеличивалось до 15 мин (Nagaich et al., 2004).

Известно, что механизм глюкокортикоидной индукции многих генов включает привлечение глюкокортикоидным рецептором SWI/SNF хроматин-ремоделирующего комплекса к месту его посадки на GRE (Muchardt, Yaniv, 1993; King et al., 2012). В частности, показано, что взаимодействие ГР, связанного с GREs LTR MMTV, с SWI/SNF комплексом приводит к изменениям структуры нуклеосом на данном участке и деконденсации хроматина, что необходимо для связывания других транскрипционных факторов (NF1, OTF1) и, как следствие, активации процесса транскрипции (Richard-Foy, Hager, 1987; Archer et al., 1991; Truss et al., 1995). Таким образом, получается, что механизм, осуществляющий первые шаги активации транскрипции, одновременно запускает хроматиновый цикл ГР (рис. 2, а), обеспечивая быстрый сход рецепторного белка с его мест связывания на ДНК в составе хроматина (Nagaich et al., 2004).

Похожие результаты были получены и при изучении динамики хроматинового цикла рецепторов эстрогенов (ЭР) (Sharp et al., 2006), прогестерона (ПР) (Rayasam et al., 2005) и андрогенов (АР) (Klokk et al., 2007). В экспериментах также использовались клеточные линии, содержащие в геноме кассеты из сотен сайтов связывания этих белков. Соответственно, эти линии экспрессировали ЭР, АР либо ПР, слитые с GFP. Методом FRAP было показано, что так же, как и в случае с ГР, в живой клетке все эти рецепторы остаются связанными со своими сайтами на ДНК в течение недолгого времени – 3–8 с в случае ЭР и ПР, и 50 с – в случае АР. Кроме того, оказалось, что так же, как для оборота ГР, для осуществления хроматинового цикла ЭР, ПР и АР необходимо участие SWI/SNF хроматин-ремоделирующего комплекса (Rayasam et al., 2005; Sharp et al., 2006; Klokk et al., 2007).

Кроме хроматин-ремоделирующих комплексов на время пребывания ГР в контакте со своими сайтами связывания в составе хроматина могут оказывать влияние внутриядерные протеасомы и молекулярные шапероны. Так, протеасомы могут удалять ГР с его сайтов на ДНК, разрушая часть молекул рецептора. Об этом свидетельствуют данные об обнаружении протеасомных комплексов в участках связывания ГР в условиях *in vivo* и об увеличении времени пребывания ГР на его сайтах в составе хроматина в присутствии ингибитора протеасом MG132 (Stavreva et al., 2004). Имеются данные и о присутствии шаперонов hsp90 и p23 в участках связывания ГР в хроматине живых клеток (Freeman, Yamamoto, 2002). Однако они, по-видимому, оказывают противоположный эффект на взаимодействие ГР с его сайтами, так как в присутствии соответствующих ингибиторов время контакта ГР с этими сайтами уменьшается (Stavreva et al., 2004; Miranda et al., 2013).

В ходе осуществления хроматинового цикла связанный с гормоном ГР может перемещаться с GREs, контролирующих экспрессию одних генов, на GREs других генов. Таким образом, в ядре происходит стохастический

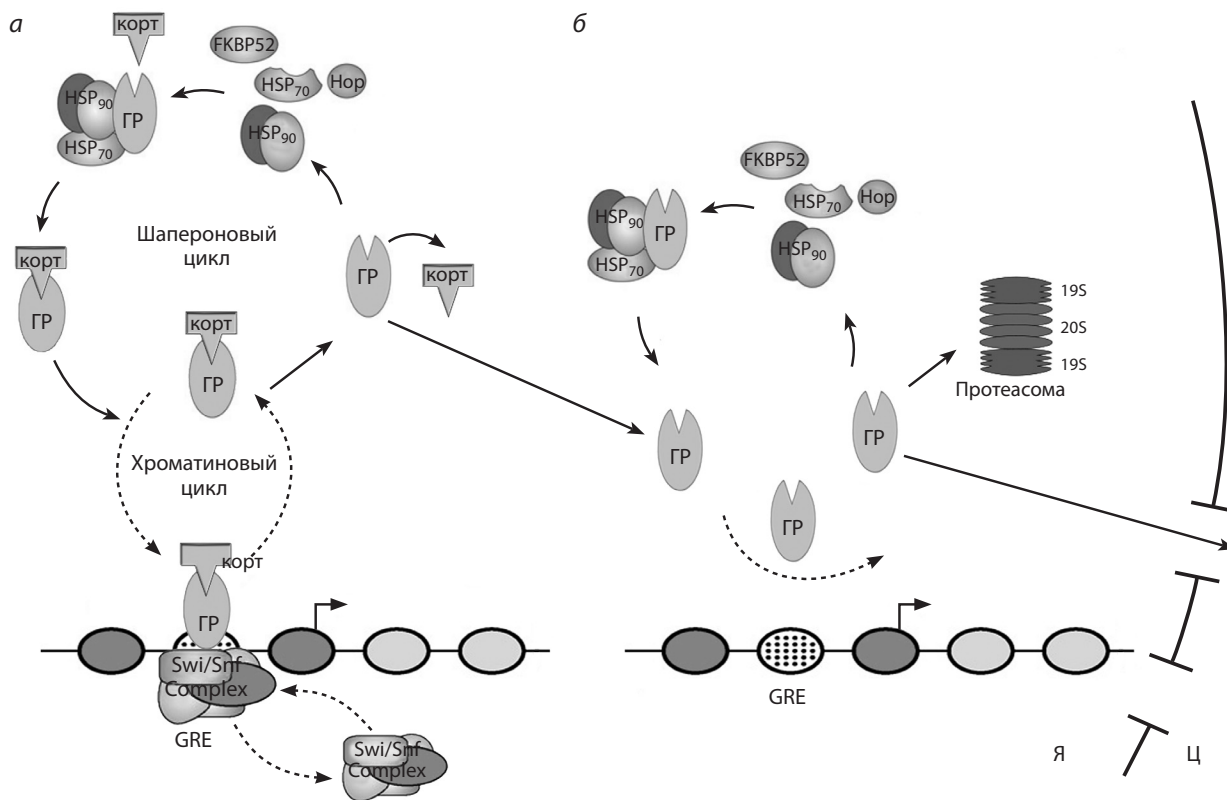


Рис. 2. Хроматиновый и шапероновый циклы ГР в ядре клетки.

а – после схода с регуляторного элемента (GRE) гормон-рецепторный комплекс либо осуществляет очередной хроматиновый цикл, либо диссоциирует. Свободный от гормона рецептор может вновь связаться с лигандом лишь после ассоциации с ядерным шапероновым комплексом. После связывания с гормоном ГР высвобождается из комплекса с шаперонами и возвращается в хроматиновый цикл; б – «холостой» шапероновый цикл, разрушение ГР протеасомами и выход из ядра. Ц – цитоплазма; Я – ядро; корт – гормон (кортизол – у человека, кортикостерон – у грызунов). (Адаптировано по: George et al., 2009.)

процесс оборота/перемещения гормон-рецепторных комплексов между генами-мишенями глюкокортикоидов. Если же гормон диссоциирует из комплекса, то ГР либо вступает в контакт с находящимися в ядре шаперонами и осуществляет внутриядерный шапероновый цикл, либо разрушается внутриядерными протеасомами, либо выводится из ядра клетки (рис. 2) (George et al., 2009; Stavreva et al., 2012; Vandevyver et al., 2012).

Внутриядерный шапероновый цикл ГР и выход рецептора из клеточного ядра

Известно, что молекулярные шапероны могут взаимодействовать со свободным от гормона ГР не только в цитоплазме клетки, но и в ее ядре (Sanchez et al., 1990; Liu, DeFranco, 1999). Показано, что в клеточном ядре присутствуют все шаперонные белки, в комплексе с которыми ГР принимает конформацию, позволяющую ему вновь связать гормон. Это белки теплового шока: hsp70 (Daugaard et al., 2007), hsp90 (Freeman, Yamamoto, 2002; Erlejan et al., 2014), hsp90-связывающий белок p23 (Freeman, Yamamoto, 2002), hsp70/hsp90 организующий белок Hop (Odunuga et al., 2004) и FKBP52 (Perrot-Appian et al., 1995). Предполагается, что так же, как и в цитоплазме, ГР взаимодействует с комплексом этих белков в ядре клетки и в результате оказывается способным вновь связаться

с гормоном, а образовавшиеся гормон-рецепторные комплексы вновь вступают в хроматиновый цикл (рис. 2, а). Такой оборот ГР в ядре, опосредованный его взаимодействием с шаперонами, был назван шапероновым циклом (George et al., 2009; Stavreva et al., 2012). При этом ГР может проходить шапероновый цикл и «вхолостую», когда связывания гормона не происходит (вероятнее всего, при его недостаточной концентрации в ядре клетки) и диссоциирующий из комплекса с шаперонами свободный от гормона ГР не взаимодействует с GREs и не оказывает влияния на транскрипцию генов-мишеней (рис. 2, б).

Наличие ядерного шаперонного цикла ГР может служить основным объяснением феномена длительного пребывания рецептора в клеточных ядрах. Известно, что, в отличие от быстрого перехода гормон-рецепторных комплексов в ядра (5–10 мин), время выхода рецепторных молекул из ядер после удаления гормона из окружающей среды измеряется несколькими часами (Sackey et al., 1996; Haché et al., 1999; Liu, DeFranco, 2000; Tago et al., 2004). Показано, что использование специфических ингибиторов hsp90 гельдамина и радицикола увеличивает скорость выхода ГР из клеточных ядер, при этом время пребывания ГР в ядрах может уменьшиться в несколько раз (Tago et al., 2004; Kakar et al., 2006). О существовании же «холостого» шаперонного цикла свидетельствуют данные о том, что

время выхода ГР из ядер не зависит от времени жизни гормон-рецепторных комплексов, вошедших в эти ядра. Так, установлено, что при использовании как природного глюкокортикоида кортизола (время полужизни комплексов ~ 15 мин (Stavreva et al., 2009)), так и синтетического дексаметазона (время полужизни комплексов ~ 8–10 ч (Stavreva et al., 2009)) время полувыхода ГР из ядер после удаления гормона из культуральной среды составляет 8–9 ч (Sackey et al., 1996; Naché et al., 1999; Tago et al., 2004). Учитывая быстрое (в течение 10–20 мин) разрушение кортизола в водной среде и биологических жидкостях (Conway-Campbell et al., 2012) следует заключить, что в экспериментах с использованием этого гормона ГР должен пребывать в ядрах длительное время в свободном от гормона состоянии и что именно связывание с шаперонами удерживает его в ядрах и обеспечивает защиту от деградации внутриядерными протеасомами за счет осуществления «холостых» шапероновых циклов.

Механизм выхода ГР из клеточного ядра пока еще довольно слабо изучен. Выяснено, что экспорт ГР из ядра осуществляется с участием одного из известных рецепторов ядерного экспорта – кальретикулина (Walther et al., 2003; Olkku, Mahonen, 2009). В присутствии ионов Ca^{2+} этот белок связывается с сигналом ядерного экспорта ГР, расположенным между двумя цинковыми пальцами его ДНК-связывающего домена (Holaska et al., 2001; Black et al., 2001). Показано, что удаление Ca^{2+} ингибирует экспорт ГР из клеточного ядра, а последующее его добавление приводит к восстановлению экспорта (Holaska et al., 2002). После выхода из ядра ГР или вступает в комплекс с шаперонами, восстанавливая способность связывать гормон и повторяя переход в ядра, или разрушается протеасомами (Liu, DeFranco, 2000).

Обсуждение

Рецептор глюкокортикоидов так же, как рецепторы других стероидных гормонов (эстрогенов, андрогенов, минералокортикоидов и прогестинов), был открыт более 40 лет назад. Открытие этих белков оказалось возможным благодаря химическому синтезу молекул гормонов, содержащих в своей структуре радиоактивный изотоп водорода – тритий. В частности, получение меченых тритием препаратов кортизола и дексаметазона позволило выявить внутриклеточный белок, обладающий высоким сродством и специфичностью к этим гормонам, который и был назван глюкокортикоидным рецептором (ГР) (Baxter, Tomkins, 1971; Beato et al., 1972). С использованием подходов, основанных на регистрации радиоактивности, были также получены первые данные о стимулируемом гормоном переходе ГР из цитоплазмы в ядро клетки и связывании его с хроматином и ДНК (Higgins et al., 1973; Rousseau et al., 1975; Simons et al., 1976).

Дальнейшее развитие работ по изучению динамики перехода ГР из цитоплазмы в клеточные ядра, внутриядерных перемещений рецептора, а также взаимодействия этого белка с его сайтами связывания на ДНК в составе хроматина произошло благодаря становлению современной методической базы молекулярно-генетических исследований, которое в основном пришлось на последнюю четверть прошлого века. В этот период были

осуществлены молекулярное клонирование и секвенирование белок-кодирующей части гена ГР; определены функциональные домены белка-рецептора (Danielsen et al., 1986); получен высокоочищенный ГР (Wrange et al., 1979); открыты специфические сайты его связывания на ДНК (GREs) (Payvar et al., 1981; Beato et al., 1989); изучены кинетические параметры взаимодействия ГР/GRE (Perlmann et al., 1990; Drouin et al., 1992); получены моноклональные антитела к ГР (Gametchu, Harrison, 1984); создана плазмидная конструкция, экспрессирующая ГР, слитый с флюоресцирующим белком GFP (Carey et al., 1996), и получены линии клеток со стабильной экспрессией слитого белка (Walker et al., 1999), а также накоплено большое число данных о взаимодействиях ГР с другими регуляторными белками (Kino et al., 1999; Wallberg et al., 2000; Schoneveld et al., 2004; Merkulov, Merkulova, 2009). С одной стороны, все это позволило существенно продвинуться в понимании того, как ГР функционирует в живой клетке, а с другой – породило множество новых вопросов, в том числе связанных с динамикой хроматинового и внутриядерного шаперонового циклов.

Ряд таких вопросов касается времени взаимодействия ГР и других факторов транскрипции с их сайтами связывания на ДНК в живой клетке. Пока все данные о быстром (измеряемом секундами) обороте транскрипционных факторов были получены на ограниченном числе искусственных экспериментальных моделей. Эти модели представляют собой клеточные линии, содержащие в геноме кассеты из сотен сайтов связывания и экспрессирующие изучаемый фактор транскрипции, слитый с GFP. Кроме оборота рецепторов стероидных гормонов, принадлежащих одному семейству факторов транскрипции (ГР, ЭР, ПР и АР) (McNally et al., 2000; Rayasam et al., 2005; Sharp et al., 2006; Klock et al., 2007), в такой системе был исследован также оборот неродственного им фактора NF-κB. Оказалось, что и этот фактор остается связанным со своими сайтами на ДНК в течение недолгого времени и завершает хроматиновый цикл приблизительно за 30 с (Bosisio et al., 2006). Однако использование кассет из сотен сайтов связывания и повышенная концентрация как транскрипционных факторов, так и взаимодействующих с ними коактиваторов и ремоделеров хроматина в одном месте могут приводить к кооперативным эффектам, следствием которых, возможно, и является столь короткое время хроматинового цикла. Если это так, то в естественных условиях на одиночных сайтах или небольших их группах в геноме время хроматинового цикла может быть иным, в том числе гораздо большим. Ответа на этот вопрос пока нет, поскольку имеющиеся методические средства не позволяют проводить подобные исследования на отдельных сайтах.

Если же допустить, что быстрый оборот фактора может происходить и на одиночных сайтах, возникает новый вопрос о том, касается ли это всех сайтов связывания данного фактора в геноме. В частности, для ГР показано, что такой оборот происходит при участии SWI/SNF хроматин-ремоделирующего комплекса, когда рецептор связывается с GREs, находящимися в составе нуклеосомы (Nagaich et al., 2004) (рис. 2, а). Однако недавно при изучении связывания ГР в масштабах генома было

показано, что только порядка 10–15 % мест связывания рецептора попадают в районы «закрытого» хроматина, где ГР выступает в качестве фактора-пионера, привлекая к ним хроматин-ремоделирующие комплексы. Остальные GREs локализованы в участках уже ремоделированного открытого хроматина (John et al., 2011). Какова динамика взаимодействия ГР с GREs, расположенными в «открытом» хроматине, пока не известно. Также неизвестно, какова динамика взаимодействия ГР с GREs в случае, если для стимулируемой ГР деконденсации хроматина требуются другие хроматин-ремоделирующие белки (John et al., 2008). Все эти вопросы требуют отдельного изучения, возможно, с использованием содержащих GREs каскад регуляторных районов генов с различными механизмами глюкокортикоидной индукции.

Возникают также вопросы относительно внутриядерного шаперонового цикла. Прежде всего, существуют серьезные различия в оценках времени пребывания ГР в клеточных ядрах. С одной стороны, эксперименты на трансфицированных ГР линиях клеток COS7 и GrH2, выполненные с помощью непрямого иммунофлюоресцентного анализа, показали, что после удаления из культуральной среды природного глюкокортикоида кортизола время полувыхода ГР из ядер составляет 8–9 ч (Sackey et al., 1996; Naché et al., 1999). Такая же динамика выхода ГР из ядер клеток COS7 наблюдалась и при использовании в качестве лиганда синтетического глюкокортикоида дексаметазона, хотя в этом случае регистрировалась флюоресценция ГР-GFP слитого белка (Tago et al., 2004). С другой стороны, из трансфицированных ГР клеток COS1 рецептор полностью выходил через 4–8 ч после отмычки кортикостероном (для регистрации использовали метод непрямого иммунофлюоресцентного анализа) (Liu, DeFranco, 2000). Более того, в экспериментах *in vivo* методом иммуногистохимии было показано, что ГР полностью выходит из ядер пирамидальных клеток CA1 гиппокампа в течение одного часа после прекращения подачи кортикостерона (Conway-Campbell et al., 2010). Хотя этих данных пока немного, их анализ показывает, что различия в полученных оценках времени выхода ГР из ядер вряд ли являются следствием использования разных методов или разных (природных или синтетических) гормонов. Было выдвинуто предположение, что время пребывания ГР в ядрах, вероятнее всего, определяется типом клеток (Walther et al., 2003). Однако даже для простого подтверждения такого предположения требуется существенно больший объем данных по времени выхода ГР из ядер клеток различных типов. Если же предположение окажется справедливым, большой интерес будет представлять выяснение механизмов и физиологического значения такой клеточной специфичности, в частности особенностей шаперонового цикла в разных типах клеток.

Остается также неясным, какая часть ГР разрушается внутриядерными протеасомами, какое количество рецептора возвращается в цитоплазму и вновь приобретает активность в результате связывания с комплексом шаперонов. Представляется весьма вероятным, что эффективность этих процессов должна определяться как типом клеток, так и их состоянием. Однако данные об этом пока отсутствуют.

Очевидно, получение ответа на все поставленные вопросы будет зависеть от дальнейшего развития методической базы молекулярной, клеточной и физико-химической биологии, включающего появление принципиально новых и совершенствование существующих методов массового анализа ДНК/белковых и белок/белковых взаимодействий как *in vitro*, так и в живой клетке.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке базового бюджетного проекта № VI.58.1.2.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Смирнов А.Н. Ядерные рецепторы: номенклатура, лиганды, механизмы влияния на экспрессию генов. Биохимия. 2002;67:1157-1181.
- Archer T.K., Cordingley M.G., Wolford R.G., Hager G.L. Transcription factor access is mediated by accurately positioned nucleosomes on the mouse mammary tumor virus promoter. Mol. Cell. Biol. 1991;11(2):688-698. DOI: 10.1128/MCB.11.2.688
- Baxter J.D., Tomkins G.M. Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors in hepatoma tissue culture cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1971;68(5):932-937.
- Beato M., Chalepakis G., Schauer M., Slater E.P. DNA regulatory elements for steroid hormones. J. Steroid. Biochem. 1989;32(5):737-748. DOI: 10.1016/0022-4731(89)90521-9
- Beato M., Kalimi M., Feigelson P. Correlation between glucocorticoid binding to specific liver cytosol receptors and enzyme induction *in vivo*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972;47(6):1464-1472. DOI: 10.1016/0006-291X(72)90237-9
- Beato M., Klug J. Steroid hormone receptors: an update. Hum. Reprod. Update. 2000;6(3):225-236. DOI: 10.1093/humupd/6.3.225
- Black B.E., Holaska J.M., Rastinejad F., Paschal B.M. DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. Curr. Biol. 2001;11(22):1749-1758. DOI: 10.1016/S0960-9822(01)00537-1
- Bosisio D., Marazzi I., Agresti A., Shimizu N., Bianchi M.E., Natoli G. A hyper-dynamic equilibrium between promoter-bound and nucleoplasmic dimers controls NF- κ B-dependent gene activity. EMBO J. 2006;25(4):798-810. DOI 10.1038/sj.emboj.7600977
- Boumpas D.T., Chrousos G.P., Wilder R.L., Cupps T.R., Balow J.E. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. Ann. Intern. Med. 1993;119(12):1198-1208. DOI: 10.7326/0003-4819-119-12-199312150-00007
- Bresnick E.H., Dalman F.C., Sanchez E.R., Pratt W.B. Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. J. Biol. Chem. 1989;264(9):4992-4997.
- Carey K.L., Richards S.A., Lounsbury K.M., Macara I.G. Evidence using a green fluorescent protein-glucocorticoid receptor chimera that the Ran/TC4 GTPase mediates an essential function independent of nuclear protein import. J. Cell. Biol. 1996;133(5):985-996. DOI: 10.1083/jcb.133.5.985
- Cheung J., Smith D.F. Molecular shaperone interactions with steroid receptors: an update. Mol. Endocrinol. 2000;14(7):939-946. DOI: 10.1210/me.14.7.939
- Conway-Campbell B.L., McKenna M.A., Wiles C.C., Atkinson H.C., de Kloet E.R., Lightman S.L. Proteasome-dependent down-regulation of activated nuclear hippocampal glucocorticoid receptors determines dynamic responses to corticosterone. Endocrinology. 2007;148(11):5470-5547. DOI: 10.1210/en.2007-0585
- 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
- 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
- Danielsen M., Northrop J.P., Ringold G.M. The mouse glucocorticoid receptor: mapping of functional domains by cloning, sequencing and expression of wild-type and mutant receptor proteins. *EMBO J.* 1986;5(10):2513-2522.
- Daugaard M., Rohde M., Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3702-3710. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.05.039
- Davies T.H., Ning Y.M., Sánchez E.R. A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J. Biol. Chem.* 2002;277(7):4597-4600. DOI: 10.1074/jbc.C100531200
- Drouin J., Sun Y.L., Tremblay S., Lavender P., Schmidt T.J., de Léan A., Nemer M. Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* 1992;6(8):1299-1309. DOI: 10.1210/me.6.8.1299
- Echeverria P.C., Picard D. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010;1803(6):641-649. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.11.012
- Erlejan A.G., Lagadari M., Toneatto J., Piwien-Pilipuk G., Galigniana M.D. Regulatory role of the 90-kDa-heat-shock protein (Hsp90) and associated factors on gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1839(2):71-87. DOI: 10.1016/j.bbagr.2013.12.006
- Fletcher T.M., Ryu B.W., Baumann C.T., Warren B.S., Frago G., John S., Hager G.L. Structure and dynamic properties of a glucocorticoid receptor-induced chromatin transition. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20(17):6466-6475. DOI: 10.1128/MCB.20.17.6466-6475.2000
- Fletcher T.M., Xiao N., Mautino G., Baumann C.T., Wolford R., Warren B.S., Hager G.L. ATP-dependent mobilization of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22(10):3255-3263. DOI: 10.1128/MCB.22.10.3255-3263.2002
- Freeman B.C., Yamamoto K.R. Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science.* 2002;296(5576):2232-2235. DOI:10.1126/science.1073051
- Freedman N.D., Yamamoto K.R. Importin 7 and Importin {alpha}/Importin {beta} Are Nuclear Import Receptors for the Glucocorticoid Receptor. *Mol. Biol. Cell.* 2004;15(5):2276-3386. DOI: 10.1091/mbc.E03-11-0839
- Gametchu B., Harrison R.W. Characterization of a monoclonal antibody to the rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinology.* 1984;114(1):274-279. DOI: http://dx.doi.org/10.1210/endo-114-1-274
- George A.A., Schiltz R.L., Hager G.L. Dynamic access of the glucocorticoid receptor to response elements in chromatin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2009;41(1):214-224. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.09.019
- Grad I., Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007;275(1/2):2-12. DOI: 10.1016/j.mce.2007.05.018
- Grenert J.P., Johnson B.D., Toft D.O. The importance of ATP binding and hydrolysis by hsp90 in formation and function of protein heterocomplexes. *J. Biol. Chem.* 1999;274(25):17525-17533. DOI: 10.1074/jbc.274.25.17525
- Haché R.J., Tse R., Reich T., Savory J.G., Lefebvre Y.A. Nucleocytoplasmic trafficking of steroid-free glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 1999;274(3):1432-1439. DOI: 10.1074/jbc.274.3.1432
- Hager G.L., Fletcher T.M., Xiao N., Baumann C.T., Müller W.G., McNally J.G. Dynamics of gene targeting and chromatin remodeling by nuclear receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 2000;28(4):405-410. DOI: 10.1042/0300-5127:0280405
- Harrell J.M., Murphy P.J., Morishima Y., Chen H., Mansfield J.F., Galigniana M.D., Pratt W.B. Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein. *J. Biol. Chem.* 2004;279(52):54647-54654. DOI: 10.1074/jbc.M406863200
- 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. DOI: 10.1007/978-3-642-60946-6_21
- Higgins S.J., Rousseau G.G., Baxter J.D., Tomkins G.M. Early events in glucocorticoid action. Activation of the steroid receptor and its subsequent specific nuclear binding studied in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* 1973;248(16):5866-5872.
- Holaska J.M., Black B.E., Love D.C., Hanover J.A., Leszyk J., Paschal B.M. Calreticulin is a receptor for nuclear export. *J. Cell Biol.* 2001;152(1):127-140. DOI: 10.1083/jcb.152.1.127
- Holaska J.M., Black B.E., Rastinejad F., Paschal B.M. Ca²⁺-dependent nuclear export mediated by calreticulin. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22(17):6286-6297. DOI: 10.1128/MCB.22.17.6286-6297.2002
- John S., Sabo P.J., Johnson T.A., Sung M.H., Biddie S.C., Lightman S.L., Voss T.C., Davis S.R., Meltzer P.S., Stamatoyannopoulos J.A., Hager G.L. Interaction of the glucocorticoid receptor with the global chromatin landscape. *Mol. Cell.* 2008;29(5):611-624. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.02.010
- John S., Sabo P.J., Thurman R.E., Sung M.H., Biddie S.C., Johnson T.A., Hager G.L., Stamatoyannopoulos J.A. Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat. Genet.* 2011;43(3):264-268. DOI: 10.1038/ng.759
- Kakar M., Kanwal C., Davis J.R., Li H., Lim C.S. Geldanamycin, an inhibitor of Hsp90, blocks cytoplasmic retention of progesterone receptors and glucocorticoid receptors via their respective ligand binding domains. *AAPS J.* 2006;8(4):E718-E728. DOI: 10.1208/aapsj080481
- King H.A., Trotter K.W., Archer T.K. Chromatin remodeling during glucocorticoid receptor regulated transactivation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1819;7:716-726. DOI: 10.1016/j.bbagr.2012.02.019
- 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
- Klokk T.I., Kurys P., Elbi C., Nagaich A.K., Hendarwanto A., Slagsvold T., Chang C.Y., Hager G.L., Saatcioglu F. Ligand-specific dynamics of the androgen receptor at its response element in living cells. *Mol. Cell. Biol.* 2007;27(5):1823-1843. DOI: 10.1128/MCB.01297-06
- Liu J., DeFranco D.B. Chromatin recycling of glucocorticoid receptors: implications for multiple roles of heat shock protein 90. *Mol. Endocrinol.* 1999;13(3):355-365. DOI: 10.1210/me.13.3.355
- Liu J., DeFranco D.B. Protracted nuclear export of glucocorticoid receptor limits its turnover and does not require the exportin 1/CRM1-directed nuclear export pathway. *Mol. Endocrinol.* 2000;14(1):40-51. DOI: 10.1210/me.14.1.40
- 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
- Marfori M., Mynott A., Ellis J.J., Mehdi A.M., Saunders N.F., Curmi P.M., Forwood J.K., Bodén M., Kobe B. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011;1813(9):1562-1577. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.10.013
- 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
- McNally J.G., Müller W.G., Walker D., Wolford R., Hager G.L. The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science.* 2000;287(5456):1262-1265. DOI:10.1126/science.287.5456.1262
- Miranda T.B., Morris S.A., Hager G.L. Complex genomic interactions in the dynamic regulation of transcription by the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013;380(1/2):16-24. DOI: 10.1016/j.mce.2013.03.002

- Muchardt C., Yaniv M. A human homologue of *Sacharomyces cerevisia* *SNF2/SWI2* and *Drosophila bhm* genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1993;12(11):4279-4290.
- Nagaich A.K., Walker D.A., Wolford R., Hager G.L. Rapid periodic binding and displacement of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling. *Mol. Cell.* 2004;14:163-174.
- Nakielny S., Dreyfuss G. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell.* 1999;99(7):677-690. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81666-9
- Nemoto T., Ohara-Nemoto Y., Denis M., Gustafsson J.A. The transformed glucocorticoid receptor has a lower steroid-binding affinity than the nontransformed receptor. *Biochemistry.* 1990;29(7):1880-1886.
- Nicolaides N.C., Galata Z., Kino T., Chrousos G.P., Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids.* 2010;75(1):1-12. DOI: 10.1016/j.steroids.2009.09.002
- Odonuga O.O., Longshaw V.M., Blatch G.L. Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. *Bioessays.* 2004;26(10):1058-1068. DOI: 10.1002/bies.20107
- Okret S., Wikstrom A.C., Gustafsson J.A. Molybdate-stabilized glucocorticoid receptor: evidence for a receptor heteromer. *Biochemistry.* 1985;24(23):6581-6586.
- Olkku A., Mahonen A. Calreticulin mediated glucocorticoid receptor export is involved in beta-catenin translocation and Wnt signaling inhibition in human osteoblastic cells. *Bone.* 2009;44(4):555-565. DOI: 10.1016/j.bone.2008.11.013
- Payvar F., Wrangle 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.
- Perlmann T., Eriksson P., Wrangle O. Quantitative analysis of glucocorticoid receptor-DNA interaction at the mouse mammary tumor virus glucocorticoid response element. *J. Biol. Chem.* 1990;265(8):17222-17229.
- Perrot-Appianat M., Cibert C., Geraud G., Renoir J.M., Baulieu E.E. The 59 kDa FK506-binding protein, a 90 kDa heat shock protein binding immunophilin (FKBP59-HBI), is associated with the nucleus, the cytoskeleton and mitotic apparatus. *J. Cell. Sci.* 1995;108 (Pt 5):2037-2051.
- Picard D., Yamamoto K.R. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1987; 6(11):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;268(29):21455-21458.
- Pratt W.B., Toft D.O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 1997;18(3):306-360. DOI: 10.1210/edrv.18.3.0303
- 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.
- Rayasam G.V., Elbi C., Walker D.A., Wolford R.G., Fletcher T.M., Edwards D.P., Hager G.L. Ligand specific dynamics of the progesterone receptor in living cells and during chromatin remodeling *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25(6):2406-2418. DOI: 10.1128/MCB.25.6.2406-2418.2005
- Richard-Foy H., Hager G.L. Sequence-specific positioning of nucleosomes over the steroid-inducible MMTV promoter. *EMBO J.* 1987; 6(8):2321-2328.
- Rousseau G.G., Higgins S.J., Baxter J.D., Gelfand D., Tomkins G.M. Binding of glucocorticoid receptors to DNA. *J. Biol. Chem.* 1975; 250(15):6015-6021.
- Sackey F.N., Haché R.J., Reich T., Kwast-Welfeld J., Lefebvre Y.A. Determinants of subcellular distribution of the glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* 1996;10(10):1191-1205. DOI: 10.1210/mend.10.10.9121487
- Sanchez E.R., Hirst M., Scherrer L.C., Tang H.-Y., Welsh M.J., Harmon J.M., Simons S.S. Jr., Ringold G.M., Pratt W.B. Hormone-free mouse glucocorticoid receptors overexpressed in Chinese hamster ovary cells are localized to the nucleus and are associated with both hsp70 and hsp90. *J. Biol. Chem.* 1990;265(33):20123-20130.
- Savory J.G., Hsu B., Laquian I.R., Giffin W., Reich T., Haché R.J., Lefebvre Y.A. Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19(2):1025-1037.
- Schmid W., Cole T.J., Blendy J.A., Schutz G. Molecular genetic analysis of glucocorticoid signalling in development. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1995;53(1/6):33-35. DOI: 10.1016/0960-0760(95)00038-2
- Schoneveld O.J., Gaemers I.C., Lamers W.H. Mechanisms of glucocorticoid signaling. *Biochem. Biophys. Acta.* 2004;1680(2):114-128. DOI: 10.1016/j.bbaexp.2004.09.004
- Sharp Z.D., Mancini M.G., Hinojos C.A., Dai F., Berno V., Szafaran A.T., Smith K.P., Lele T.T., Ingber D.E., Mancini M.A. Estrogen-receptor-alpha exchange and chromatin dynamics are ligand- and domain-dependent. *J. Cell. Sci.* 2006;119(19):4101-4116. DOI: 10.1242/jcs.03161
- Simons S.S. Jr., Martinez H.M., Garcea R.L., Baxter J.D., Tomkins G.M. Interaction of glucocorticoid receptor-steroid complexes with acceptor sites. *J. Biol. Chem.* 1976;251(2):334-343.
- Stavreva D.A., Müller W.G., Hager G.L., Smith C.L., McNally J.G. Rapid glucocorticoid receptor exchange at a promoter is coupled to transcription and regulated by chaperones and proteasomes. *Mol. Cell. Biol.* 2004;24(7):2682-2697. DOI: 10.1128/MCB.24.7.2682-2697.2004
- Stavreva D.A., Varticovski L., Hager G.L. Complex dynamics of transcription regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1819(7):657-666. DOI: 10.1016/j.bbagr.2012.03.004
- 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
- Tago K., Tsukahara F., Naruse M., Yoshioka T., Takano K. Regulation of nuclear retention of glucocorticoid receptor by nuclear Hsp90. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2004;213(2):131-138. DOI: 10.1016/j.mce.2003.10.057
- Truss M., Bartsch J., Schelbert A., Hache R.J., Beato M. Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter *in vivo*. *EMBO J.* 1995;14(8):1737-1751.
- Vandevyver S., Dejager L., Libert C. On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic.* 2012;13(3):364-374. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2011.01288.x
- 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. DOI: 10.1042/bst0280410
- 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
- Walther R.F., Lamprecht C., Ridsdale A., Groulx I., Lee S., Lefebvre Y.A., Hache R.J. Nuclear export of the glucocorticoid receptor is accelerated by cell fusion-dependent release of calreticulin. *J. Biol. Chem.* 2003;278(39):37858-37864. DOI: 10.1074/jbc.M306356200
- Wrangle O., Carlstedt-Duke J., Gustafsson J.A. Purification of the glucocorticoid receptor from rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 1979;254(18):9284-9290.
- Yang J., DeFranco D.B. Differential roles of heat shock protein 70 in the *in vitro* nuclear import of glucocorticoid receptor and simian virus 40 large tumor antigen. *Mol. Cell. Biol.* 1994;14(8):5088-5098. DOI: 10.1128/MCB.14.8.5088