

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Сухарева Екатерина Викторовна
ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ
ГЛЮКОКОРТИКОИДАМИ КЛЮЧЕВОГО ФЕРМЕНТА
СИНТЕЗА КАТЕХОЛАМИНОВ –
ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ МОЗГА КРЫС В РАННЕМ
ОНТОГЕНЕЗЕ

03.03.01 – физиология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Калинина Т.С.

Новосибирск – 2016

Оглавление

Список сокращений	4
Введение	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Глюкокортикоиды и их механизмы действия на экспрессию гормон-зависимых генов.....	15
1.1.1. <i>Общие функции глюкокортикоидов</i>	15
1.1.2. <i>Экспрессия глюкокортикоидных рецепторов в головном мозге</i>	20
1.1.3. <i>Механизмы действия глюкокортикоидов</i>	22
1.1.3.1. <i>Структура глюкокортикоидного рецептора</i>	22
1.1.3.2. <i>Канонический механизм действия глюкокортикоидов</i>	25
1.1.3.3. <i>Механизм быстрых негеномных эффектов глюкокортикоидов</i>	28
1.1.3.4. <i>Неканонический механизм действия глюкокортикоидов за счет белок-белкового взаимодействия</i>	32
1.2. Особенности структуры AP-1 комплекса, входящих в его состав белков, их экспрессия.....	33
1.2.2. <i>Экспрессия генов раннего ответа семейств Jun и Fos</i>	37
1.3. Тирозингидроксилаза мозга и ее регуляция глюкокортикоидами.....	40
1.3.1. <i>Тирозингидроксилаза: ген, белок, локализация</i>	40
1.3.2. <i>Экспрессия тирозингидроксилазы в онтогенезе</i>	42
1.3.3. <i>Регуляция экспрессии тирозингидроксилазы</i>	44
1.3.4. <i>Регуляция экспрессии тирозингидроксилазы глюкокортикоидами</i>	47
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1. Животные.....	51
2.2. Экспериментальные воздействия.....	51
2.3. Забор материала.....	52
2.4. Выделение РНК.....	53
2.5. Получение кДНК.....	53

2.6. Определение уровня мРНК генов <i>TГ</i> , <i>c-fos</i> , <i>fosB</i> , <i>c-jun</i> , <i>junB</i> , <i>junD</i> методом ПЦР в реальном времени (real-time PCR) с использованием технологии TaqMan.....	54
2.7. Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга.....	55
2.8. Иммунопреципитация хроматина (ChIP).....	57
2.9. Статистическая обработка результатов.....	61
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	62
3.1. Соотношение уровней мРНК и белков семейств Jun и Fos в раннем онтогенезе.....	62
3.1.1. Динамика экспрессии генов <i>Jun/Fos</i> в перинатальном онтогенезе.....	62
3.1.2. Соотношение уровня мРНК генов семейства <i>Jun</i> к <i>Fos</i>	63
3.1.3. Соотношение экспрессии белков <i>JunB</i> и <i>c-Fos</i> в раннем онтогенезе....	65
3.2. Действие глюкокортикоидов на уровень мРНК ТГ в стволе мозга трехдневных крысят.....	67
3.3. Влияние глюкокортикоидов на экспрессию генов раннего ответа <i>c-fos</i> и <i>c-jun</i> в отделах неонатального мозга.....	68
3.4. Взаимодействие белков AP-1 комплекса с дистальным AP-1 элементом промотора ТГ при введении дексаметазона в раннем постнатальном онтогенезе.....	73
3.5. Экспрессия гена и белка ТГ после введения дексаметазона на третий день жизни.....	75
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	79
Выводы.....	91
Библиография.....	93

Список сокращений

- 11- β -HSD-2 – 11- β -гидроксистероиддегидрогеназа типа 2
- АКТГ – адренокортикотропный гормон
- ГГНС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
- ДОФА – диоксифенилаланин
- КРГ – кортикотропин-рилизинг-гормон
- ТГ – тирозингидроксилаза
- цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
- AF – активационный домен
- AP-1 (Activator protein-1) – активирующий протеин-1
- BMP (bone morphogenetic protein) – костный морфогенетический белок
- BSA (Bovine Serum Albumin) – бычий сывороточный альбумин
- CA (Cornu Ammonis) – Аммонов рог
- ChIP (Chromatin immunoprecipitation) – иммунопреципитация хроматина
- CRE (cAMP responsive element) – цАМФ-отвечающий элемент
- CREB (cAMP responsive element binding protein) – CRE-связывающий белок
- DBD (DNA-binding domain)– ДНК-связывающий домен
- ER (estrogen receptor) – рецепторы эстрогенов
- ERK (extracellular regulated MAP kinase) – внеклеточно-регулируемая MAP-киназа
- FAM (Fos activation module) – активационный модуль
- FGF (Fibroblast growth factor) –фактор роста фибробластов
- FKBP5 - FK506-связывающий белок 5
- GR (Glucocorticoid Receptor) – глюкокортикоидный рецептор
- GRE (Glucocorticoid Response Element) – гормон-отвечающий элемент
- Hsp (heat shock protein) – белок теплового шока

LBD (Ligand Binding Domain) – С-концевой лиганд-связывающий домен

LZD (ZIP-домен) – домен типа «лейциновой застёжки»

MR (Mineralocorticoid Receptor) – минералокортикоидный рецептор

MAPK (mitogen-activated protein kinase) – митоген-активируемая протеинкиназа

NL (nuclear localization) – ядерная локализация

NSPC (Neural Stem and Progenitor Cells) – нейральные стволовые и клетки-предшественники

NTD (N-terminal Domain) – N-концевой трансактивационный домен

PBS – раствор натрий-фосфатного буфера

PBST – раствор натрий-фосфатного буфера с Triton

PFA – параформ

SHH Sonic Hedgehog

STAT (signal transducer and activator of transcription) – сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции

TAD (transactivation domain) – трансактивационный домен

TPA – 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-уксусная кислота

TRE (TPA responsive element) – TPA-зависимый элемент

Введение

Актуальность проблемы

Неблагоприятные условия протекания перинатального онтогенеза, в частности, стрессорные, вызывают долговременные и даже постоянные изменения в организме. Способность условий среды в раннем онтогенезе программировать физиологические функции организма на протяжении последующей жизни известна уже давно. В 1950-х годах на крысах было показано, что неблагоприятное воздействие в неонатальном периоде может значительно изменить ответ гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы на стресс у взрослых животных (Levine, 1957). В настоящее время исследования на разных видах организмов показали, что неврологические, эндокринные, метаболические и сердечно-сосудистые дисфункции зрелого возраста имеют начало в раннем онтогенезе (Naumenko, Dygalo, 1980; Harris, Seckl, 2011; Santos, Joles, 2012; Entringer, Wadhwa, 2013; Barella et al., 2014). Это явление получило название «онтогенетического программирования» (Barker, 1998; Li et al., 2012). Данное понятие было выдвинуто в попытке объяснить связь между внешними условиями среды и проблемами во время беременности, изменениями роста и развития плода, а также патофизиологией. Однако механизмы такого явления, несмотря на большие усилия исследователей, остаются все еще неясными. Одна из гипотез предполагает, что ключевую роль в «перинатальном программировании» играют глюкокортикоиды, уровень которых в развивающемся организме повышается при стрессе или в результате гормональной терапии (Moisiadis, Matthews, 2014). Глюкокортикоиды необходимы для нормального формирования физиологических функций организма – регулируют и модулируют процессы, которые участвуют в обмене веществ, ответе на инфекции и стрессовые ситуации, поддержании артериального давления и водно-электролитного гомеостаза (Reynolds, 2013). Эти гормоны, безусловно, необходимы и для нормального созревания мозга, обеспечивая

формирование полноценных нервных связей между нейронами (Yehuda et al., 1989; Harris, Seckl, 2011), а также для развития нейромедиаторных систем (Wyrwoll, Holmes, 2012). Эндогенные глюкокортикоиды являются своего рода «индукторами» развития организма. У большинства видов млекопитающих в конце беременности отмечается всплеск уровня глюкокортикоидов в крови плода. Это повышение имеет важное значение для нормального созревания легких плода, т.к. глюкокортикоиды стимулируют выработку легочного сурфактанта, а также для созревания щитовидной железы, почек, головного мозга (Fowden et al., 1998). Однако их избыток в критический период перинатального развития нарушает ход нормального онтогенеза и вызывает перманентное репрограммирование физиологических систем, прежде всего связанных с реакцией на стресс, кардио-метаболическим статусом, иммунным ответом, изменением нейромедиаторных систем, аффективными расстройствами (Cottrell, Seckl, 2009; Harris, Seckl, 2011; Li et al., 2012; de Kloet et al., 2014).

Свое программирующее действие глюкокортикоиды реализуют через изменение экспрессии гормон-зависимых генов несколькими способами. Общеизвестный классический механизм действия гормонов осуществляется через собственные рецепторы (GR), которые являются транскрипционными факторами, взаимодействующие со специфическими гормон-отвечающими элементами (GRE) генома (Schoneveld et al., 2004; So et al., 2008; Surjit et al., 2011; Hudson et al., 2013). Однако среди генов, участвующих в глюкокортикоид-обусловленном «онтогенетическом программировании», имеются и гены, не имеющие GRE. В этом случае возможен, известный для генов, по крайней мере, иммунной системы, неканонический механизм регуляции глюкокортикоидами – GR регулируют экспрессию генов-мишеней путем взаимодействия с другими транскрипционными факторами (Sapolsky et al., 2000; Kassel, Herrlich, 2007; Ratman et al., 2013). Одним из таких факторов является AP-1 комплекс. Этот комплекс формируется взаимодействием гомодимеров белков Jun или гетеродимеров Jun/Fos с

гептамерной консенсусной последовательностью промоторов многих генов (Reddy, Mossman, 2002; Eferl, Wagner, 2003). Экспериментально было показано, что рецептор глюкокортикоидов, в виде мономера, образует комплексы как с белками Fos, так и Jun, которые являются структурными составляющими AP-1 (Kassel, Herrlich, 2007; Healy et al., 2013). При взаимодействии GR с гетеродимером Jun/Fos AP-1 комплекса глюкокортикоиды подавляют, а при взаимодействии с гомодимером Jun/Jun, напротив, активируют транскрипцию генов (Diamond et al., 1990; Teurich, Angel, 1995; Sapolsky et al., 2000; Kassel et al., 2001; Newton, Holden, 2007). Существование неканонического механизма существенно расширяет список генов, регулируемых глюкокортикоидами, но не имеющих в своих промоторах гормон-зависимых элементов. Одним из таких генов может быть ген ключевого фермента синтеза катехоламинов – тирозингидроксилазы (ТГ) (Kvetnansky et al., 2009).

Ген тирозингидроксилазы (ТГ) является потенциальной мишенью программирующих воздействий. Экспрессия гена ТГ в мозге 20-21-дневных плодов крыс повышается уже через 6 часов после введения глюкокортикоидов и остается на этом уровне в течение, как минимум, трех суток. Индукция гена ТГ сопровождается увеличением *in vitro* и *in vivo* активности фермента, а также повышением уровня норадреналина (Kalinina et al., 2012). Изменение активности ТГ после введения гормона во время беременности сохраняются и в мозге взрослых животных (Калинина, Дыгало, 2013). Аналогичное гормональное воздействие в первую неделю жизни не приводит к каким-либо изменениям экспрессии гена фермента (Kalinina et al., 2012). Зависимость проявления индуцирующего действия гормона от возраста предполагает вовлечение дополнительных регуляторных факторов. Поскольку промотор гена ТГ не имеет функционально-активных глюкокортикоид-отвечающих элементов (Kvetnansky et al., 2009), действие гормона может быть обусловлено неканоническим механизмом взаимодействия глюкокортикоидных рецепторов с белками AP-1 комплекса

(Kassel, Herrlich, 2007). В этом случае возможность глюкокортикоидов менять экспрессию ТГ будет определяться соотношением белков Jun/Fos в мозге животных разного возраста. Промотор гена ТГ содержит два AP-1 элемента, один из которых вовлечен в гормональную индукцию гена в культуре феохромоцитомы (Rani et al., 2009). Функционирование неканонического механизма действия глюкокортикоидов *in vivo* в раннем онтогенезе не установлено.

Поскольку изменение экспрессии гормоном ТГ и других генов, лишенных GRE, за счет белок-белкового взаимодействия GR с иными транскрипционными факторами, такими как AP-1, может быть возможным путем их вовлечения в глюкокортикоид-зависимое «онтогенетическое программирование», то планируемый в работе анализ до сих пор неясного функционирования этого механизма в критические сроки формирования мозга представляется крайне необходимым.

Цель исследования

Целью работы явилось выявление роли белков транскрипционного комплекса AP-1 в регуляции глюкокортикоидами экспрессии ключевого фермента синтеза катехоламинов - тирозингидроксилазы (ТГ) в головном мозге крыс в раннем онтогенезе.

Задачи

1. Определить соотношение базальной экспрессии генов и белков AP-1 транскрипционного комплекса: Jun (c-Jun, JunB, JunD) и Fos (c-Fos, FosB) в головном мозге в ходе перинатального онтогенеза и выявить особенности этого соотношения, характерные для предродового периода, в ходе которого экспрессия гена ТГ проявляет зависимость от глюкокортикоидов, а также оценить возможное наличие и сроки проявления подобного «гормон-

чувствительного» соотношения Jun/Fos в раннем постнатальном периоде развития.

2. В случае обнаружения потенциального «гормон-чувствительного» соотношения Jun/Fos в раннем постнатальном периоде развития, в срок его проявления исследовать эффекты глюкокортикоида дексаметазона на экспрессию белков AP-1 транскрипционного комплекса (c-Fos и c-Jun) в отделах неонатального головного мозга.

3. Оценить взаимодействие белков AP-1 транскрипционного комплекса с промотором гена ТГ в период проявления глюкокортикоидной индукции этого гена, а также в период его нечувствительности к гормону в раннем онтогенезе.

4. Исследовать эффекты введения дексаметазона в потенциально «гормон-чувствительный» период постнатального онтогенеза на экспрессию ТГ в стволовой части головного мозга через 6-24 часов, а также спустя 25 и 70 дней после гормонального воздействия.

Научная новизна

В результате исследования впервые установлено, что в основе зависимой от возраста регуляции глюкокортикоидами экспрессии тирозингидроксилазы мозга, ключевого фермента синтеза катехоламинов, участвующего в «онтогенетическом программировании», лежит активация неканонического механизма действия гормона, что обеспечивается преобладанием количества транскриптов и белков Jun над Fos, а также большей степенью взаимодействия белков JunB с AP-1 элементом промотора гена ТГ.

Впервые обнаружено, что в период проявления гормональной индукции экспрессии ТГ – в стволе мозга плодов и 3-дневных крысят, экспрессия генов семейства Jun в 5-20 раз превышает уровень мРНК генов семейства Fos по сравнению с 8-дневными крысятами, у которых

гормональная индукция не проявляется. Соотношение белков JunB к c-Fos в мозге 3-дневных животных также выше, чем на 8 день жизни.

Установлено, что эффекты дексаметазона на экспрессию генов раннего ответа не одинаковы в разных структурах мозга. В передних областях мозга – коре и гиппокампе, экспрессия c-fos повышается после введения гормона, но снижается в стволе мозга, что соответствует изменению экспрессии белка c-Fos. Выявленные закономерности приводят к дополнительному росту соотношения c-jun/c-fos ко второму часу после гормонального воздействия.

Впервые проведена оценка взаимодействия белков JunB и c-Fos с дистальным AP-1 элементом промотора гена ТГ *in vivo*. Связывание белков семейства Jun с AP-1 элементом промотора ТГ при введении дексаметазона в стволе мозга 3-дневных крысят (период проявления гормональной индукции гена) выше, чем у 8-дневных (период нечувствительности к гормону).

В работе впервые выявлена глюкокортикоидная индукция ТГ в мозге 3-дневных животных и продемонстрировано сохранение индукции гена фермента на протяжении 24 часов после введения дексаметазона. Гормональная индукция гена ТГ на 3ий день жизни вызывает долговременное изменение экспрессии гена фермента – уровни мРНК ТГ остаются повышенными в ювенильном и взрослом возрасте. Следовательно, последствия гормонального воздействия в «глюкокортикоид-чувствительный» период перинатального онтогенеза оставляют длительный след на экспрессию ТГ и, тем самым, на нейрохимию головного мозга в последующие периоды жизни.

Теоретическое и практическое значение

Результаты исследования вносят вклад в понимание механизма регуляции глюкокортикоидами ключевого фермента синтеза катехоламинов - тирозингидроксилазы в критические периоды раннего онтогенеза. Подтверждено приоритетное участие белков семейств Jun и Fos,

компонентов транскрипционного комплекса AP-1, в гормональную индукцию гена ТГ, что является доказательством функционирования неканонического механизма глюкокортикоидной регуляции нейрогена. Полученные данные расширяют представление об участии глюкокортикоидов в процессах «онтогенетического программирования» медиаторных систем мозга.

Положения, выносимые на защиту

1. Уровни мРНК генов семейства Jun (c-jun, junB, junD) превышают экспрессию генов семейства Fos (c-fos, fosB) в периоды глюкокортикоидной индукции гена ТГ. В период нечувствительности к гормону соотношение между этими транскриптами меняется на обратное.

2. Действие дексаметазона на соотношение экспрессии генов раннего ответа (Jun и Fos) зависит от отдела неонатального мозга. Введение гормона повышает уровень мРНК c-fos в передних областях мозга – коре и гиппокампе, но снижает количество транскриптов в стволе мозга. В результате соотношение транскриптов c-jun/c-fos в стволе мозга двукратно увеличивается.

3. Взаимодействие белка JunB с дистальным AP-1 элементом промотора гена ТГ в период выявленной глюкокортикоидной индукции гена ТГ на 3 день жизни выше, чем в период нечувствительности экспрессии гена фермента к гормону у 8-дневных животных.

4. В период преобладания транскриптов и белков семейства Jun над Fos в раннем постнатальном онтогенезе глюкокортикоиды индуцируют экспрессию гена ТГ в стволе головного мозга. Индукция экспрессии гена и белка ТГ развивается к 6 часу после введения дексаметазона и сохраняется на протяжении суток после гормонального воздействия.

5. Последствия гормонального воздействия в «глюкокортикоид-чувствительный» период перинатального онтогенеза оставляют длительный

след на экспрессию ТГ - ключевого фермента синтеза катехоламинов и, тем самым, на нейрохимию головного мозга в последующие периоды жизни.

Апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для размещения материалов кандидатских диссертаций. Результаты исследования представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и зарубежных симпозиумах и конференциях: VII Сибирский физиологический съезд, Красноярск, 2012; FENS Featured Regional Meeting, Prague, Czech Republic, 2013; XXII Съезд физиологов России, Волгоград, 2013; XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов – 2014, Москва, 2014; VI Съезд ВОГИС, Ростов-на-Дону, 2014; Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга: Всероссийская конференция с международным участием, Санкт-Петербург, 2014; 9th FENS Forum of Neuroscience, Milan, Italy, 2014; Седьмая Всероссийская научно-практическая конференция «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» и Молодежный симпозиум «Молекулярно-клеточные и медико-экологические проблемы компенсации и приспособления», Новосибирск, 2015; Eleventh symposium on catecholamines and other neurotransmitters in stress, Smolenice castle, Slovakia, 2015; II Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молодых биологов и вирусологов – 2015, Новосибирск, 2015; IX Всероссийская конференция «Нейроэндокринология – 2015», Санкт-Петербург, 2015; 21st Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Antibes Juan les Pins, France, 2016.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.б.н. Т.С. Калининой, сотрудникам лаборатории функциональной нейрогеномики к.б.н. В.В. Булыгиной и к.б.н. Д.А. Ланшакову за помощь в освоении иммуногистохимического окрашивания, а также ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН и ЦКП «Геномика» СО РАН за предоставление приборной базы.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов, изложения результатов работы, их обсуждения, выводов и списка литературы (320 источников). Работа изложена на 131 страницах, содержит 3 таблицы и иллюстрирована 17 рисунками.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Глюкокортикоиды и их механизмы действия на экспрессию гормон-зависимых генов

1.1.1. Общие функции глюкокортикоидов

Глюкокортикоидные гормоны продуцируются и секретируются в пучковой зоне коры надпочечников. Их секреция контролируется аденокортикотропным гормоном (АКТГ) гипофиза, который, в свою очередь, стимулируется кортикотропин-рилизинг-гормоном гипоталамуса (КРГ). Многочисленные физические и психологические стрессы стимулируют гипоталамус и вызывают дополнительную секрецию глюкокортикоидов. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ГГНС) посредством отрицательной обратной связи контролирует нормальный уровень глюкокортикоидов в крови (Biddie et al., 2012).

У млекопитающих глюкокортикоиды регулируют ряд физиологических систем и в условиях регулярных или внезапных изменений во внешней среде помогают поддерживать физиологический гомеостаз. Они влияют на углеводный, белковый и липидный обмен (McKay, Cidlowski, 1999; de Kloet et al., 2005b). Базальный уровень гормонов необходим для поддержания нормального уровня сахара в крови за счет стимуляции глюконеогенеза в печени, а также предотвращения артериальной гипотензии (Bamberger et al., 1996; Sapolsky et al., 2000). Повышение уровня этих гормонов вызывает рост уровня глюкозы в крови, индуцирует гибель лимфоцитов и эозинофилов, угнетает воспалительные процессы в организме, изменяет водно-солевой обмен, снижает активность протеинкиназ, секрецию ряда гормонов и нейропептидов, меняет иммунный ответ и т.д. (Bamberger et al., 1996; Mendelson, 2000; Sapolsky et al., 2000; Czock et al., 2005; Cole, 2006). Глюкокортикоиды играют важную роль в процессе развития плода, способствуя созреванию тканей и органов путем влияния на дифференцировку клеток. Особенно их действие важно в конце

беременности, когда начинается завершающая стадия развития легких – глюкокортикоиды участвуют в дифференцировке и развитии терминальных дыхательных альвеол и стимулируют производство сурфактанта (Pierce et al., 1995; Bolt et al., 2001). Такой эффект гормонов имеет решающее значение в подготовке плода ко внеутробной жизни, и именно по этой причине глюкокортикоидная терапия широко используется при преждевременных родах, когда, ввиду незрелости легких, жизнь новорожденного находится под угрозой (Roberts, Dalziel, 2006). Однако многочисленные исследования показали, что внутриутробная гормональная терапия снижает у потомства вес при рождении, изменяет морфологию головного мозга, в частности уменьшает размер и изменяет иерархичность слоев в коре и гиппокампе, повышает риск возникновения сердечно-сосудистых, метаболических заболеваний, нарушений в ГГНС и когнитивных расстройств в дальнейшем (Seckl, 2004).

При нормальном течении беременности уровень материнских глюкокортикоидов значительно выше, чем в крови плода. Эмбрион защищен от таких высоких уровней гормонов (кортизола у человека, кортикостерона у грызунов) за счет плацентарной инактивации активных глюкокортикоидов в неактивные 11-кетоформы (кортизон и 11-дегидрокортикостерон) с помощью 11- β -гидроксистероиддегидрогеназы типа 2 (11- β -HSD-2). Этот фермент действует как барьер в защите глюкокортикоид-чувствительных тканей от высоких уровней гормонов во время развития плода (Cottrell, Seckl, 2009). Многими исследованиями было подтверждено, что снижение экспрессии или активности плацентарной 11- β -HSD-2, ведущее к увеличенному прохождению активных глюкокортикоидов через плаценту, приводит к задержке роста плода (Stewart et al., 1995; Lindsay et al., 1996; Murphy et al., 2002). Ингибирование 11- β -HSD-2 во время беременности приводит к снижению массы тела при рождении и развитию гипертензии, а также к увеличению активности ГГНС и тревожности (Edwards et al., 1993; Lindsay et al., 1996; Langley-Evans, 1997; Welberg et al., 2000).

Благоприятное влияние дородового применения синтетических глюкокортикоидов для профилактики респираторного дистресс-синдрома у недоношенных детей установлено в прошлом веке (Liggins, Howie, 1972). В настоящее время использование синтетических глюкокортикоидов (дексаметазона, бетаметазона) стало стандартной практикой в отношении женщин с повышенным риском преждевременных родов, т.к. гормоны ускоряют процесс созревания ряда органов (легкие, сердце, почки) (de Kloet et al., 2014). Но, несмотря на положительные краткосрочные эффекты глюкокортикоидов, имеются отсроченные негативные последствия гормональной терапии в раннем онтогенезе.

Введение дексаметазона самкам крыс на 17 и 19 день беременности не оказывало влияния на функции ГГНС потомства в препубертатный период (Bakker et al., 1995). В то же время ежедневные инъекции дексаметазона в течение третьей недели беременности приводит к снижению уровня кортикостерона в возрасте 28 дней у детенышей мужского пола, при этом на 49 и 70 день различий в базальном уровне гормона не обнаружено (Nagano et al., 2008). Изменения на 28 день были связаны с уменьшением уровня мРНК кортикотропин-релизинг гормона в паравентрикулярном ядре гипоталамуса (Burllet et al., 2005; Nagano et al., 2008). У этих крыс также отмечали задержку роста в течение первых 3 недель жизни. В исследованиях поведения грызунов после дородового воздействия глюкокортикоидами было выявлено значительное снижение способности к обучению и памяти, а также повышение уровня тревожности у ювенильных и взрослых особей. В тесте водного лабиринта Морриса такие крысы демонстрировали более длительное время обнаружения скрытой платформы (Hauser et al., 2009). Также дородовое гормональное воздействие приводило к снижению пролиферации нейронов в зубчатой извилине у мышей и увеличению апоптоза в гиппокампе у крыс (Noorlander et al., 2008; Zuloaga et al., 2012).

Пренатальное воздействие глюкокортикоидами приводит к повышенной тревожности, депрессии, снижению способности к обучению у

потомства крыс (Brunton, Russell, 2010; Zohar, Weinstock, 2011). У таких животных повышен уровень мРНК GR и кортикотропин-релизинг гормона и снижена экспрессия рецептора кортикотропин-релизинг гормона 2 типа в центральной миндалине.

У адреналэктомированных беременных крыс с гормон-замещающей терапией пренатальный стресс не оказывал влияния на функции ГНС у потомства, что подтверждает участие глюкокортикоидов матери в опосредовании стресс-индуцируемого программирования функции ГНС у потомства (Barbazanges et al., 1996; Lesage et al., 2001). Программирование заболеваний у взрослых за счет повышенного уровня глюкокортикоидов связано с изменением чувствительности ГНС, что, в свою очередь, приводит к нарушениям развития глюкокортикоид-чувствительных органов: головной мозг, почки, жировая ткань, поджелудочная железа (Xiong, Zhang, 2013).

Пренатальное гормональное воздействие влияет на развивающиеся серотонинергическую и дофаминергическую системы, что в дальнейшем приводит к риску возникновения шизофрении, синдрому дефицита внимания, гиперактивности и другим аффективным расстройствам (Wyrwoll, Holmes, 2012). Также глюкокортикоиды в раннем онтогенезе «программируют» развитие гипертензии с возрастом (Levitt et al., 1996). В основе таких эффектов лежат изменения в почках и в структуре и функционировании сердечно-сосудистой системы. Глюкокортикоиды в пренатальном периоде уменьшают число нефронов, увеличивают чувствительность почки к гормонам за счет увеличения экспрессии GR и снижения экспрессии 11- β -HSD-2 (Ortiz et al., 2001; Wyrwoll et al., 2007), изменяют активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и увеличивают экспрессию ангиотензиновых рецепторов 1 и 2 типов (Zimmermann et al., 2003).

Перечисленные изменения параметров метаболизма, внесенные в раннем онтогенезе стрессом или гормональной терапией, сохраняются во

взрослой жизни и увеличивают восприимчивость организма к различным болезням. Такие долгосрочные последствия представляют собой особо важную категорию для исследований, т.к. механизмы программирующего действия глюкокортикоидов пока остаются не вполне изученными.

Помимо констатации самого факта онтогенетического программирования, механизмы, его обеспечивающие, остаются далекими от понимания. Совокупность данных по этому вопросу свидетельствует, что одним из механизмов является изменение гормонами стресса – глюкокортикоидами экспрессии ключевых генов, обеспечивающих функционирование медиаторных систем мозга, участвующих в регуляции практически всех функций и поведения.

Благодаря своей липофильной природе, глюкокортикоиды беспрепятственно проходят через мембрану клетки и запускают молекулярные процессы в клетках-мишенях, взаимодействуя с цитоплазматическими рецепторами (Sapolsky et al., 2000). В мозге и на периферии экспрессируются два подтипа рецепторов, связывающих глюкокортикоиды - собственно глюкокортикоидные (NR3C1, Glucocorticoid Receptor, GR) и минералокортикоидные (NR3C2, Mineralocorticoid Receptor, MR), которые функционируют как лиганд-активируемые транскрипционные факторы, регулирующие транскрипцию гормон-зависимых генов (de Kloet et al., 2005b). Рецепторы имеют общее происхождение, высокий уровень гомологии, но различаются по способности связывать естественные и синтетические стероиды, а также по распределению в тканях и в отделах мозга (Fuxe et al., 1985a; Fuxe et al., 1985b; Reul, de Kloet, 1985; Reul et al., 1989; De Kloet et al., 1998). Вследствие того, что MR в 10 раз более эффективно связывают глюкокортикоиды, чем GR, при базальном уровне кортикостерона в плазме крови 80% MR связаны с гормоном, в то время как GR остаются свободными (Reul, de Kloet, 1985; Welberg, Seckl, 2001). Однако повышение уровня глюкокортикоидов в результате каких-либо воздействий приводит к их взаимодействию с GR (Edwards, Burnham, 2001; Welberg,

Seckl, 2001; de Kloet et al., 2005b). Но такое разделение носит достаточно условный характер, так как зачастую задействованы оба типа рецепторов. Так, подавление воспаления и снижение функций иммунной системы осуществляется через GR, но не без участия MR (Miller et al., 1994).

1.1.2. Экспрессия глюкокортикоидных рецепторов в головном мозге

Экспрессия GR начинается с раннего эмбриогенеза в большинстве тканей. Животные с нокаутным геном GR нежизнеспособны, что доказывает жизненную необходимость этих рецепторов (Cole et al., 1995).

О характере экспрессии MR и GR во время беременности человека известно немного (de Kloet et al., 2014). Экспрессия MR и GR обнаруживается в периферических тканях на шестой неделе пренатального развития, а на 8-16 неделе их экспрессия становится более выраженной с более высоким уровнем GR по сравнению с MR (Condon et al., 1998). В гиппокампе в период 24-34 недели уровень экспрессии MR, напротив, более высок, чем GR, и эта разница не изменяется с течением времени (Noorlander et al., 2006).

У крыс экспрессия GR в мозге детектируется с 12 дня эмбриогенеза во многих областях мозга (гиппокамп, гипоталамус, мозжечок, ядра шва, голубое пятно, обонятельные луковицы). К концу беременности, когда эндогенный уровень кортикостерона высок и ГГНС становится активной, экспрессия этих рецепторов увеличивается по всему мозгу (Cintra et al., 1993; Diaz et al., 1998). MR начинают экспрессироваться в конце беременности – за 3 дня до родов в более ограниченном диапазоне мозговых структур – гиппокамп, гипоталамус и область четверохолмия, боковая перегородка, ствол, гипофиз (Diaz et al., 1998). К моменту рождения уровень MR превышает в 3 раза уровень GR и остается повышенным до 60 дня онтогенеза (Bohn et al., 1994). На второй день после рождения у крыс методами иммуногистохимии и *in situ* гибридизации был показан высокий уровень

экспрессия MR в лимбических областях коры, таких как гиппокамп, перегородка, миндалина и лобно-кортикальные области, которые участвуют в обработке информации при стрессе (Aronsson et al., 1988; van Eekelen et al., 1991; Rosenfeld et al., 1993). Сразу после родов высокий уровень иммунореактивности GR наблюдается практически по всему мозгу грызунов – мелкоклеточные области паравентрикулярного ядра гипоталамуса, моноаминергических нейронах, поля CA1, CA2 гиппокампа, миндалина, а также лобно-кортикальные области (Aronsson et al., 1988; van Eekelen et al., 1991; de Kloet et al., 2014).

MR экспрессируются преимущественно в нейронах, в то время как GR - как в нервных, так и в глиальных клетках (Edwards, Burnham, 2001). В ходе развития головного мозга была обнаружена различная субклеточная локализация GR (Tsiarli et al., 2013). На 11,5 день эмбриогенеза мыши в большинстве клеток радиальной глии и интермедиальных клетках-предшественниках GR локализованы в ядре, при этом в некотором количестве клеток радиальной глии, в апикальной вентрикулярной зоне, GR были обнаружены и в цитоплазме. Однако к 13,5 дню вторая зона клеток увеличивается в размере. В это же время в паравентрикулярных нейральных стволовых/клетках предшественниках (NSPC) и нейронах кортикальной пластинки GR локализованы в ядре. Аналогичный профиль экспрессии наблюдается в вентральном переднем мозге, гиппокампе и обонятельных луковицах. Перед родами GR начинают накапливаться в ядрах нейронов 5-го слоя коры, субпластинке, CA1 области гиппокампа. Исходя из этих данных, субклеточная локализация GR подвержена регион- и время-специфическому контролю в ходе нейрогенеза (Tsiarli et al., 2013).

Глюкокортикоиды имеют важное значение для нормального созревания мозга: они инициируют созревание терминалей, ремоделируют аксоны и дендриты, влияют на выживаемость клеток (Harris, Seckl, 2011). Важно отметить, что как повышенный, так и пониженный уровень глюкокортикоидов влияют на развитие и функционирование мозга. Введение

синтетических глюкокортикоидов беременным крысам задерживает созревание нейронов, глии, сосудистой сети и миелинизацию у потомства, тем самым значительно изменяя нейронную структуру и формирование синапсов, а также ингибируя нейрогенез (Seckl, 2008). Пренатальный стресс у ювенильных и взрослых крыс приводит к уменьшению числа MR и GR в гиппокампе, что может быть связано с эпигенетическими влияниями на транскрипцию генов (Weaver et al., 2004). Ввиду того, что гиппокамп ингибирует активность ГГНС, то такое стресс-индуцируемое понижение количества рецепторов в гиппокампе может уменьшить его ингибирующее действие, приводя к увеличению базальной и/или стресс-индуцируемой секреции глюкокортикоидов.

1.1.3. Механизмы действия глюкокортикоидов

1.1.3.1. Структура глюкокортикоидного рецептора

GR является модульным белком, который состоит из N-концевого трансактивационного домена (NTD), центрального ДНК-связывающего домена (DBD) и C-концевого лиганд-связывающего домена (LBD) (Kumar, Thompson, 2005; Lu et al., 2007). Гибкий участок молекулы, называемый шарнирной областью, соединяет DBD и LBD. DBD является наиболее консервативной областью и содержит два «цинковых пальца», которые распознают и связываются с консенсусной палиндромной последовательностью из 15 нуклеотидов в составе различных участков генов-мишеней, так называемыми глюкокортикоид-зависимыми элементами (Glucocorticoid Response Element, GRE) (Chandler et al., 1983). NTD содержит лиганд-независимый активационный домен (AF1), необходимый для повышения транскрипции за счет связи с ко-активаторами и базовыми транскрипционными факторами (Kassel, Herrlich, 2007). LBD, состоящий из 12 α -спиралей и 4 β -складок, образует гидрофобный карман для связывания лиганда (Bledsoe et al., 2002). Второй активационный домен (AF2), расположенный на C-конце LBD, после связывания с лигандом за счет

конформационного изменения структуры рецептора становится доступным для ко-активаторов и обеспечения их взаимодействия с транскрипционными комплексами (Pratt et al., 2006; Kassel, Herrlich, 2007). Сигналы ядерной локализации NL1 и NL2 расположены в переходном участке DBD/шарнирная область и в LBD, соответственно (Oakley, Cidlowski, 2013).

В геноме млекопитающих присутствует один ген глюкокортикоидного рецептора. У человека ген включает 9 экзонов. Кодирующий белок последовательность начинается во 2-м экзоне (Yudt, Cidlowski, 2002). NTD кодируется, главным образом, во 2-м экзоне, DBD в 3 и 4, шарнирная область и LBD в 5-9 экзонах (Oakley, Cidlowski, 2013). Промотор гена не имеет TATA и CCAAT боксов, но содержит множественные GC-боксы, а также сайты связывания для транскрипционных факторов Sp1, AP-1, YY 1, NF-κB и свой собственный GRE, вероятно обеспечивающий ауторегуляцию (Breslin et al., 2001). У человека и мыши найдено 3 разных сайта старта транскрипции, дающие мРНК с разной 5'-нетранслируемой областью (Yudt, Cidlowski, 2002).

Альтернативный сплайсинг в 9 экзоне вблизи конца первичного транскрипта GR дает 2 изоформы рецептора – GR α и GR β (Bamberger et al., 1996; Oakley, Cidlowski, 2013). Эти изоформы отличаются лишь С-концом – результатом альтернативного сплайсинга 8 и 9 экзонов. Белки являются идентичными по 727 аминокислотным остаткам, однако GR α (классический GR) содержит дополнительные 50 аминокислотных остатков, а GR β содержит дополнительные, негомологичные 15 аминокислотных остатков (Oakley, Cidlowski, 2013). Эта уникальная С-концевая последовательность наделяет эту изоформу рецептора некоторыми свойствами: GR β не связывает лиганды, в основном находится в ядре клеток, является неактивным при регуляции глюкокортикоид-зависимых генов (Lewis-Tuffin, Cidlowski, 2006; Kino et al., 2009). При этом, формируя с GR α неактивные гетеродимеры, GR β ослабляет действие гормонов на гены-мишени по доминантно-негативному принципу. Помимо GR β -изоформы за счет альтернативного сплайсинга

существуют еще изоформы рецептора с различными сигнальными свойствами. GR γ -изоформа отличается от GR α наличием Arg-452 между двумя цинковыми «пальцами» в DBD (Ray et al., 1996). Этот вариант рецептора широко экспрессируется, связывает глюкокортикоиды и ДНК также, как и GR α . Однако по сравнению GR α , GR γ обладает меньшей способностью в регуляции гормон-зависимых генов. У пациентов с глюкокортикоидной резистентностью экспрессия GR γ связана с различными видами рака (Ray et al., 1996; Rivers et al., 1999; Beger et al., 2003). Еще два варианта рецептора, у которых отсутствуют значительные регионы LBD, были обнаружены в клетках глюкокортикоид-резистентной множественной миеломы (Moalli et al., 1993). В GR-A-изоформе отсутствует N-концевая часть LBD, кодируемая 5-7 экзонами, а в GR-P C-концевая часть LBD, которая кодируется 8-9 экзонами. Ввиду таких изменений в LBD эти изоформы не связывают лиганды. Эти варианты рецептора являются наименее изученными.

В результате альтернативной инициации трансляции каждый транскрипт GR дает несколько изоформ (Oakley, Cidlowski, 2013). Для GR α это GR α -A, -B, -C1, -C2, -C3, -D1, -D2, -D3 (Yudt, Cidlowski, 2002; Lu, Cidlowski, 2005). Все эти трансляционные изоформы проявляют схожее сродство к глюкокортикоидам, а также способность к взаимодействию с GRE после активации лигандом, но при этом обладают и рядом различий (Lu et al., 2007). GR α -A, -B и -C изоформы локализуются в цитоплазме клетки в отсутствие глюкокортикоидов и проникают в ядро после активации гормоном. В свою очередь GR α -D изоформы находятся преимущественно в ядре. Также экспрессия изоформ GR α является тканеспецифичной. Например, у грызунов максимальный уровень GR α -C изоформ наблюдается в поджелудочной железе и толстой кишке, а GR α -D в селезенке и легких, при этом GR α -A и GR α -B изоформы экспрессируются повсеместно (Lu, Cidlowski, 2005).

Каждая из GR-изоформ подвергается различным посттрансляционным модификациям. GR фосфорилируется по 7 сериновым остаткам несколькими

киназами и фосфатазами, также может быть полифосфорилирован по остаткам серина и треонина N-конца полипептидной цепи, убиквитинилирован, сумоилирован (Wang, DeFranco, 2005; Beck et al., 2009; Galliher-Beckley et al., 2011; Druker et al., 2013). Все многообразие таких модификаций GR может обеспечить различные действия глюкокортикоидов как в норме, так и при патологии.

1.1.3.2. Канонический механизм действия глюкокортикоидов

В отсутствии лиганда, GR находится в цитоплазме в составе комплекса с белками теплового шока Hsp90, Hsp70, p23, а также с FK506-связывающим белком 5 (FKBP5) (Grad, Picard, 2007; Nicolaidis et al., 2010). После активации гормоном, GR освобождается от белков теплового шока, транслоцируется в ядро, димеризуется и, согласно каноническому механизму, работает как транскрипционный фактор, взаимодействуя GRE (Рис.1.) (Schoneveld et al., 2004; So et al., 2008; Surjit et al., 2011; Hudson et al., 2013). Консенсусная последовательность GRE представляет собой практически совершенный палиндром, разделенный тремя нуклеотидами. Нуклеотидный состав последовательностей ДНК, связывающейся с GR, разнообразен, но все они содержат высоко консервативную GR-связывающую последовательность (So et al., 2007; So et al., 2008).

Связывание GR с GRE запускает каскад транскрипционных событий, как правило, индуцирующих экспрессию гормон-зависимых генов (Welberg, Seckl, 2001; Oakley, Cidlowski, 2013). Подавление экспрессии регулируемых глюкокортикоидами генов осуществляется посредством взаимодействия рецептора с, так называемым, негативным гормон-зависимым элементом (nGRE) – также консенсусной последовательностью ДНК, отличающейся от классического GRE несколькими нуклеотидами (Surjit et al., 2011). При этом

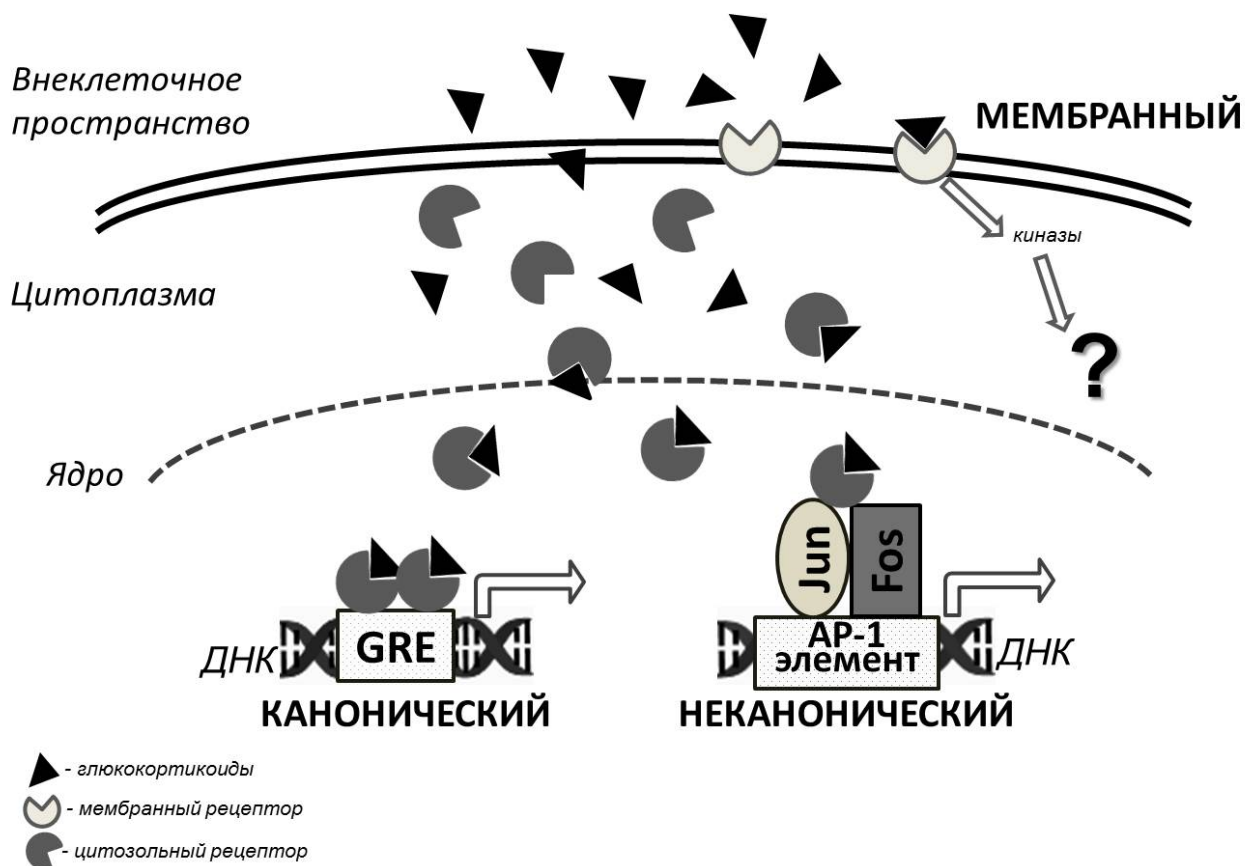


Рис.1. Схема основных механизмов действия глюкокортикоидов. GRE (Glucocorticoid-Response-Element, глюкокортикоид-зависимый элемент) – последовательность промотора гена, с которой взаимодействуют активированные гормоном рецепторы; AP-1 – последовательность промотора генов, с которой связывается AP-1 транскрипционный комплекс, образованный белками Jun/Fos.

было показано, что связывание с nGRE препятствует димеризации GR, благодаря уникальной GR-связывающей ориентации (Hudson et al., 2013). Несмотря на тот факт, что значительное количество генов, снижающее свою экспрессию под действием глюкокортикоидов, имеют такой негативный GRE в своем промоторе (Surjit et al., 2011), особенности его участия в регуляции транскрипции требуют дальнейшего исследования.

При связывании с гормоном, рецептор претерпевает конформационные изменения, что способствует привлечению определенного набора ко-активаторов или ко-репрессоров ремоделирующих хроматин (соответственно ацетилируя или деацетилируя гистоны нуклеосом), которые влияют на активность РНК-полимеразы II и определяют скорость транскрипции генов.

При этом и природа лиганда, и сама последовательность GRE могут диктовать конкретный набор и функции ко-факторов, влияя на конформацию рецептора (Meijsing et al., 2009; Ronacher et al., 2009). Рецептор лишь короткое время взаимодействует с GRE генов-мишеней. Это взаимодействие происходит циклично каждые несколько секунд, что, по-видимому, позволяет GR «прощупать» большое количество потенциальных сайтов связывания и взаимодействий со вспомогательными белками (Stavreva et al., 2004). Большинство GRE располагаются в местах с наибольшей доступностью хроматина, как правило, в гипометилированных областях промоторов генов (Choy et al., 2010).

Результаты полногеномного анализа глюкокортикоид-связывающих сайтов методом иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием, проведенные в последние годы, прояснили ряд специфических особенностей такого взаимодействия (Reddy, Mossman, 2002; Yu et al., 2010; John et al., 2011; Pan et al., 2011). Была установлена неожиданная закономерность о расположении GRE не непосредственно вблизи стартов транскрипции регулируемых генов или в их пять штрих нетранслируемых областях, а на значительном расстоянии от этих важных для регуляции экспрессии генов участков - не менее 25 000 пар оснований (Reddy, Mossman, 2002; Rao et al., 2011). Этот феномен обнаружен и при регуляции другими стероидными гормонами, в частности эстрогенами.

Разнообразие ответов при активации канонического механизма действия глюкокортикоидов обусловлено неодинаковой плотностью рецепторов в разных тканях и в разных отделах головного мозга, соотношением числа GR и MR (de Kloet et al., 2009; de Kloet et al., 2014; Myers et al., 2014). Острый стресс не меняет экспрессию гена GR в гиппокампе, в отличие от действия хронического стресса, снижающего уровень мРНК GR (Karandrea et al., 2002). В зависимости от продолжительности воздействия лигандами, например, дексаметазоном, возможна инверсия действия гормона с про- на антидепрессивное, которая

ассоциирована с повышением экспрессии белка GR в префронтальной коре мозга (Shishkina et al., 2015). Баланс между подтипами рецепторов способен определять чувствительность к действию стрессирующих факторов и устойчивость к развитию заболеваний, вызываемых стрессом (de Kloet et al., 2005a; Joels et al., 2008; McEwen, 2008).

1.1.3.3. Механизм быстрых негеномных эффектов глюкокортикоидов

Геномные эффекты глюкокортикоидов, обусловленные классическим каноническим механизмом, развиваются довольно медленно, и для получения физиологического ответа проходит, как правило, несколько часов (Haller et al., 2008; van der Laan, Meijer, 2008; Groeneweg et al., 2011). Вместе с тем, за последние годы накоплено значительное количество экспериментальных данных о быстрых, практически секундных эффектах глюкокортикоидов на синаптическую передачу и поведение (Stahn, Buttgerit, 2008; Groeneweg et al., 2011). Эти изменения не затрагивают геномный канонический механизм действия гормонов, поскольку в большинстве случаев не чувствительны к блокаторам транскрипции и трансляции, но, вероятно, могут задействовать активацию GR или MR. Наблюдаемые эффекты могут блокироваться антагонистами рецепторов и отсутствовать у нокаутов по ним (Di et al., 2003; Karst et al., 2005; Liu et al., 2008). Предполагается действие гормона на уровне мембраны (Рис.1.). Несмотря на установленный факт наличия быстрых эффектов глюкокортикоидов, остается нерешенным ряд вопросов о молекулярных механизмах, которые ставят под сомнение существование таких мембранных рецепторов. Во-первых, ни один из этих рецепторов до сих пор не клонирован. Во-вторых, несмотря на данные электронной микроскопии (Johnson et al., 2005; Prager et al., 2010), не получено доказательств их четкой мембранной локализации, например, наличия трансмембранного домена, обеспечивающего взаимодействие с мембраной. В-третьих, нет ясного ответа на вопрос – активация каких

внутриклеточных молекулярных каскадов задействована в мембранных эффектах кортикостероидов.

Основным процессом в мозге и гипофизе, косвенно свидетельствующим об активации быстрых мембранных механизмов действия глюкокортикоидов, является подавление кортикостероидами выделения кортиколиберина и АКТГ, которое происходит в течение 5-15 минут после повышения уровня гормонов в крови (Hinz, Hirschelmann, 2000; Evanson et al., 2010). Этот процесс не блокируется ингибитором синтеза белка – циклогексимидом, но и не исчезает при введении антагонистов GR или MR, что предполагает вовлечение дополнительного, пока неизвестного рецепторного механизма. Кроме того, показано участие GR в быстрой реорганизации рабочей памяти и процессах ее консолидации (Barsegyan et al., 2010; Roozendaal et al., 2010).

Активация быстрых ответов так же, как и в случае геномных механизмов, зависит от типа рецептора и отдела мозга. Так, острый иммобилизационный стресс стимулирует быстрый выброс глутамата в гиппокампе в результате активации MR (Karst et al., 2005), но снижает выброс медиатора в миндалинах в результате активации GR (Karst et al., 2010). В гипоталамусе кортикостерон уже в течение 5 минут ингибирует выделение глутамата с одновременной стимуляцией ГАМК, что повышает пороговый уровень активности нейронов гипоталамуса, но этот эффект не чувствителен к блокаде антагонистами как GR, так и MR (Di et al., 2003; Di et al., 2005; Di et al., 2009).

Более убедительны быстрые мембранные эффекты глюкокортикоидов, выявленные на периферии и связанные с подавлением активности иммунной системы и эффектами гормонов на вазоконстрикцию (Lowenberg et al., 2005; Liberman et al., 2007).

Несмотря на противоречивость имеющихся данных о механизмах быстрых негеномных эффектов глюкокортикоидов, подтверждением их наличия могут служить следующие факты.

(1) Внутриклеточное введение кортикостерона не вызывает эффектов, сходных с мембранными. В то же время, конъюгаты кортикостерона и дексаметазона с альбумином, не проникающие внутрь клетки, индуцируют мембранные эффекты (Harrington et al., 2006; Xiao et al., 2010).

(2) Как GR, так и MR присутствуют в экстрактах синапсом (Wang, Wang, 2009; Qiu et al., 2010) и идентифицированы электронно-микроскопически на мембранах нейронов (Johnson et al., 2005; Prager et al., 2010).

(3) Мембранные варианты рецепторов предполагаются практически для всех других стероидных гормонов – эстрогенов, андрогенов и прогестерона (Hammes, Levin, 2007; Pedram et al., 2007; Razandi et al., 2010).

Поскольку часть быстрых эффектов глюкокортикоидов на выделение нейротрансмиттеров, поведение, регуляцию стрессорной реакции не исчезают после блокады GR и MR рецепторов антагонистами, неизбежно встает вопрос о неизвестном классе рецепторных белков, опосредующих этот процесс. Наиболее вероятным кандидатом могут быть рецепторы, взаимодействующие с G-белками, так как ингибирование этих белков нивелируют значительное число таких реакций (Di et al., 2003; Di et al., 2005). Свидетельством наличия более, чем одного мембранного рецептора для глюкокортикоидов, может являться вариабельность их аффинности и селективности. Периферические мембранные рецепторы так же, как и центральные, пока не клонированы. В целом, результаты по исследованию альтернативного мембранного рецептора, осуществляющего быстрые эффекты кортикостероидов, полны противоречий (Groeneweg et al., 2011).

Предполагается, что трансдукция сигнала через мембранный рецептор глюкокортикоидов происходит таким же образом, как и через рецепторы эстрогенов (ER α и ER β), для которых этот механизм исследован более основательно. Прежде всего, рецептор должен оказаться в мембране. Для встраивания его в плазматическую мембрану необходимо соблюдение трех условий: связь с белком теплового шока HSP27 (Razandi et al., 2010);

пальмитирование по Cys477 (посттрансляционная модификация, в ходе которой к белку присоединяется липидный «хвост») (Acconcia et al., 2005); связь с адаптерным белком кавеолином-1 (Razandi et al., 2002). Нарушение хотя бы одного из этих условий приводит к полному исчезновению мембранных эффектов гормона (Razandi et al., 2002; Acconcia et al., 2005; Razandi et al., 2010; Sud et al., 2010). Затем такой рецепторный комплекс транспортируется к плазматической мембране, где он локализуется в кавеоле – инвагинации мембраны (Groeneweg et al., 2011). Схожий процесс встраивания в мембрану предполагается и для рецепторов других стероидных гормонов (Pedram et al., 2007). Вопрос о мембранном расположении GR/MR остается открытым. Если для периферических тканей (эндотелий, гепатоциты, кардиомиоциты) показано частичное соответствие ряда необходимых условий для образования комплексов, подобных рецепторам эстрогенов, то для нейронов таких данных нет (Groeneweg et al., 2011).

После активации гормоном, сигнал быстро распространяется внутри клетки за счет киназ, таких как p38 MAPK, ERK1/2 и др., которые вызывают изменения в экспрессии генов (Stahn, Buttgerit, 2008). Кроме того, для поддержания быстрых эффектов глюкокортикоидов, запускаемых все еще неясным мембранным механизмом, активируются медленные геномные механизмы (Karst et al., 2010). Даже для эстрогенового рецептора не более 5-10% от всего рецепторного пула считаются ассоциированными с мембраной (Chambliss et al., 2000). Взаимодействие и баланс между мембранным и геномным механизмами действия глюкокортикоидов способны определять восприимчивость к действию стресса (de Kloet et al., 2005b) и существенно расширить наше понимание этого многогранного явления.

1.1.3.4. Неканонический механизм действия глюкокортикоидов за счет белок-белкового взаимодействия

Среди нескольких сотен генов, меняющих свою экспрессию под действием глюкокортикоидов (Weaver et al., 2006), далеко не все содержат гормон-зависимый элемент (GRE) в своем промоторе, но, несмотря на это меняют уровень своей экспрессии в ответ на стресс или введение гормона. В этом случае основным механизмом действия глюкокортикоидов является так называемый неканонический механизм, в основе которого лежит белок-белковое взаимодействие активированного гормоном рецептора с другими транскрипционными факторами. В настоящее время показано взаимодействие рецепторов гормона с такими факторами как NF-κB, AP-1, CREB, NF-AT, STAT6, IRF3, STAT3, GATA-3, t-Bet (Limbourg et al., 2002; De Bosscher et al., 2003; Reily et al., 2006; Liberman et al., 2007; Beck et al., 2009). Поскольку взаимодействие GR, как правило, в виде мономера, с другим транскрипционным фактором фактически блокирует участие этого фактора в транскрипционном комплексе, этот процесс называется трансрепрессией.

Важным компонентом такого механизма является иерархичность взаимодействия GR и других транскрипционных факторов, когда активация одних факторов направлена на подавление или индукцию экспрессии других, расположенных ниже по транскрипционному каскаду, что приводит к многообразию регуляторных комбинаций (Kassel, Herrlich, 2007).

Одним из наиболее интересных и широко распространенных белок-белковых реакций GR является его взаимодействие с транскрипционным комплексом AP-1 (Activator protein-1) (Рис.1.). Особенность такого взаимодействия состоит в том, что в зависимости от компонентного состава транскрипционного комплекса меняется экспрессия регулируемых генов (Diamond et al., 1990; Pfahl, 1993; Teurich, Angel, 1995; Kassel, Herrlich, 2007). При образовании AP-1 комплекса гетеродимером Jun/Fos глюкокортикоиды подавляют, а при образовании гомодимера Jun/Jun, напротив, активируют

транскрипцию ряда генов (Diamond et al., 1990; Teurich, Angel, 1995; Sapolsky et al., 2000; Kassel, Herrlich, 2007). Этот механизм, обнаруженный в середине 90-х годов и функционирующий в клетках иммунной системы при подавлении глюкокортикоидами реакции воспаления, очевидно, участвует и в регуляции экспрессии нейрогенов (Rani et al., 2009; Rani et al., 2013).

Наличие AP-1 элементов (участок промотора гена, отвечающий за связывание AP-1 комплекса с ДНК) даже в генах, содержащих GRE, значительно повышает доступность хроматина, что облегчает его взаимодействие с различными транскрипционными факторами, а удаление AP-1, напротив, уменьшает число связываний GR с GRE (Biddie et al., 2011). Но самое важное, что неканонический механизм существенно расширяет список генов, регулируемых глюкокортикоидами, и не имеющих в своих промоторах гормон-зависимых элементов.

Необходимо подчеркнуть, что белок-белковый механизм действия глюкокортикоидов достаточно широко распространен. Анализ всех сайтов связывания селективного агониста глюкокортикоидов – дексаметазона в культуре феохромоцитомы (Polman et al., 2012) выявил, что 42% от общего числа таких сайтов расположены в генах, не содержащих GRE, свидетельствуя о практически равном вкладе канонического и неканонического механизмов действия глюкокортикоидов в регуляцию экспрессии генов.

1.2. Особенности структуры AP-1 комплекса, входящих в его состав белков, их экспрессия

AP-1 комплекс образован белками – продуктами генов раннего ответа (Nealy et al., 2013). Этот класс генов кодирует функционально различные белки – секретируемые белки (цитокины и хемоаттрактанты), цитоплазматические ферменты (фосфатазы, циклооксигеназы), лиганд-зависимые и индуцибельные факторы транскрипции (Perez-Cadahia et al., 2011; Nealy et al., 2013). Для этой группы генов характерен ряд особенностей:

(1) Низкая или неопределяемая экспрессия в покоящихся клетках, но быстрая транскрипции в ответ на многочисленные внеклеточные сигналы;

(2) Транскрипционная индукция происходит в течение нескольких минут, является временной и не зависит от синтеза белка *de novo*, при этом и трансляционные ингибиторы не оказывают никакого влияния на экспрессию этих белков (Cochran et al., 1984; Lau, Nathans, 1987);

(3) Характерен транскрипт с коротким периодом полураспада, который кодирует белок с высокой обновляемостью (Durchdewald et al., 2009).

Индущирующим фактором, как правило, является внеклеточный сигнал – действие факторов роста, иммунологические и неврологические сигналы, стресс (O'Donnell et al., 2012).

Семейство транскрипционных факторов AP-1 включает белки Fos (*c-fos*, *fra-1*, *fra-2*, *fosB*) и Jun (*c-jun*, *junD*, *junB*), относящиеся к белкам суперсемейства bZIP (basic leucine-zipper) (Angel, Karin, 1991; Kassel, Herrlich, 2007). Определяющий вклад в транскрипционную активность AP-1 комплекса вносят белки c-Fos, FosB, c-Jun, JunB, JunD (Manna, Stocco, 2008). Как показали многочисленные исследования, AP-1 элемент обеспечивает ответ клетки на множество сигналов, таких как цитокины, пептидные гормоны, нейротрансмиттеры, ростовые и паракринные факторы. Активация AP-1 наблюдается при нарушении гомеостаза клетки – в ответ на тепловой шок, гипоксию, токсины, ионизирующую радиацию, ксенобиотики, отклонение осмоса и другие факторы (Perez-Cadahia et al., 2011; Healy et al., 2013). В свою очередь, AP-1 регулирует экспрессию огромного числа генов, участвующих в клеточной пролиферации, морфогенезе, апоптозе и дифференцировке, а также защите клеток от внешних повреждающих воздействий (Chinenov, Kerppola, 2001; Hess et al., 2004), что приводит к его участию в регуляции многих физиологических систем. В целом, для AP-1 характерно множество регуляторных и метаболических процессов, протекание которых он способен обеспечить (Турпаев, 2006).

Белки Fos не образуют гомодимеры, но могут гетеродимеризоваться с белками Jun (Hai, Hartman, 2001). В свою очередь, белки Jun могут образовывать димеры не только друг с другом и белками Fos, но и с белками других факторов транскрипции: ATF, СВР и т.д. (Raivich, 2008).

Между белками этих двух семейств существует значительное сходство (Рис.2). Они содержат основной ДНК-связывающий домен (DBD; обогащенный положительно заряженными аминокислотами) и прилежащий к нему домен типа «лейциновой застёжки» (ZIP-домен; LZD), необходимый для димеризации. Кроме того, в белке c-Fos обнаружено несколько, так называемых, активационных модулей (FAM, «Fos activation modules») (Reddy, Mossman, 2002; Vasbous et al., 2008).

ZIP-домен образован участком из 35 аминокислот. Этот регион образует спираль, в которой каждый седьмой аминокислотный остаток – лейцин. Благодаря такому расположению, при укладке в альфа-спираль лейциновые остатки оказываются на одной стороне, образуя гидрофобную поверхность (Alberini, 2009). Хотя ZIP-домен непосредственного участия во

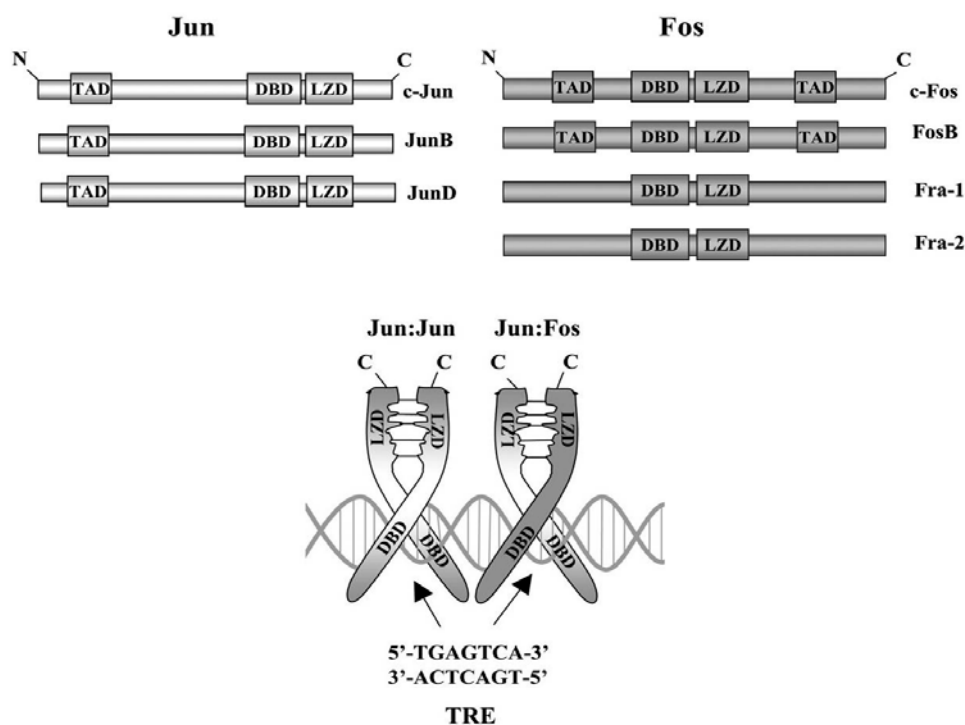


Рис.2. Схема структуры и димеризации белков семейств Jun и Fos (по Reddy, Mossman, 2002).

взаимодействии с ДНК не принимает, он, тем не менее, важен для функционирования AP-1, т.к. последний действует только в димерной форме. По-видимому, на димеризацию Fos- и Jun-белков помимо гидрофобных взаимодействий также существенное влияние оказывают взаимодействия между заряженными аминокислотами в ZIP-домене. Белки Fos не образует гомодимеры из-за различий в аминокислотном составе внутри своих ZIP-доменов (Jochum et al., 2001). Несмотря на наличие данного домена во всех белках этих семейств, димеры Jun/Jun и Jun/Fos существенно отличаются по стабильности. Известно, что гетеродимеры Jun/Fos более стабильны и, следовательно, обладают более высокой ДНК-связывающей активностью (Halazonetis et al., 1988). Гомодимер Jun/Jun диссоциирует в интервале температур 25-37 градусов, тогда как гетеродимер Jun/Fos диссоциирует при 37-42 градусах. Интересно, что в присутствии ДНК стабильность комплекса AP-1 значительно повышается. Кроме того, композиция комплекса AP-1 влияет также и на ДНК-связывание (Eferl, Wagner, 2003).

Хотя ZIP-домен и основной домен высоко консервативны, у всех белков, входящих в состав AP-1, есть различия на NH₂- и COOH-терминальных регионах (Рис.2). Jun-белки на NH₂-концевой области содержат трансактивационный домен (TAD), а белки Fos-семейства, за исключением Fra1 и Fra2, обладают двумя TAD как на NH₂-, так и на COOH-конце (Shaulian, Karin, 2001).

И гомо-, и гетеродимеры AP-1 комплекса могут связываться с палиндромной последовательностью ДНК 5'-TGAGTCA-3', также известной, как TPA (12-O-тетрадеcanoилфорбол-13-уксусной кислоты)-зависимый элемент (TRE или AP-1 сайт), который находится в промоторе и/или энхансерной области различных генов. В таком состоянии AP-1 может регулировать транскрипцию данных генов (Angel, Karin, 1991). AP-1 также может связываться с вариантами TRE, такими как 5'-TTAGTCA-3' и 5'-TGATTCA-3', которые отличаются от исходной последовательности несколькими основаниями (Chinenov, Kerppola, 2001).

1.2.2. Экспрессия генов раннего ответа семейств Jun и Fos

Каждый из белков, входящих в состав AP-1 комплекса, по-разному экспрессируются и регулируются, что зависит от типа клеток (Jochum et al., 2001). Так, в нейронах присутствуют все представители семейств Fos и Jun, в T-клетках антагонистически взаимодействуют JunD и JunB, в фибробластах, кератиноцитах и гранулоцитах такими же взаимодействиями связаны c-Jun и JunB. Также эти белки по-разному влияют на клеточный цикл (активируя или тормозя его) и участвуют в апоптозе, причем в разных клетках действуют разные белки, например, c-Jun активирует апоптоз в нейронах и фибробластах, а вот в гепатоцитах и кератиноцитах, наоборот, оказывает антиапоптотический эффект (Hess et al., 2004; Perez-Cadahia et al., 2011).

Ген *c-jun* изначально был идентифицирован как *v-jun* в геноме вируса 17 саркомы птиц (ASV17) (Maki et al., 1987; Bos et al., 1988), а затем был выделен его клеточный гомолог, протоонкоген *c-jun*, из тканей человека и мыши (Bohmann et al., 1987; Ryder et al., 1988). Идентичность этих двух генов составляет более, чем 80% (Kappelman et al., 2014). Базальный уровень экспрессии c-Jun обнаружен в различных областях мозга, в том числе зубчатой извилине, моторных нейронах, периферических нейронах и ядрах вегетативной нервной системы. После трансинаптической стимуляции c-Jun индуцируется аналогично c-Fos и JunD. При рассечении нервных волокон наблюдается селективное повышение экспрессии c-Jun, но не других белков AP-1 (Herdegen et al., 1997). Такая избирательная индукция может быть опосредована *цис*-активацией дистальной AP-1 последовательности промотора *c-jun* самим белком c-Jun (Mielke et al., 1999).

JunB практически отсутствует при базальных условиях, однако его индукция в основном происходит в нейронах, при этом паттерн экспрессии этого белка и период полураспада очень схож с таковыми c-Fos (Edelstein et al., 2000; Hata et al., 2000).

Базальный уровень экспрессии JunD наблюдается в большинстве клеток нервной системы. После транссинаптической или синаптической стимуляции уровень JunD увеличивается постепенно, однако такой уровень сохраняется продолжительное время (Herdegen, Waetzig, 2001). Стоит отметить, что фосфорилирование этого белка JNK-киназами происходит лишь при димеризации с c-Jun (Kallunki et al., 1996).

Одним из первых и наиболее охарактеризованных ранних генов является *c-fos*. Он был впервые обнаружен как вирусный онкоген (v-Fos) FBJ остеосаркомы мыши, экспрессия которого приводит к клеточной трансформации (Curran et al., 1983; Van Beveren et al., 1983; Angel, Karin, 1991). Клеточный гомолог (c-Fos) отличается от вирусного 48 аминокислотными остатками на С-конце (Van Beveren et al., 1983; van Straaten et al., 1983). Это различие приводит к отсутствию нескольких сайтов фосфорилирования в v-Fos, что приводит к его постоянной активности (Monje et al., 2003).

Благодаря быстрой экспрессии, c-Fos детектируется уже через 30-35 мин после начала стимула, даже если базальный уровень был низок (Purkiss et al., 1993). Установлено, что индуцируемость c-Fos снижается с возрастом (Salehi et al., 1999). Активация c-Fos является показателем активации клеток, в том числе и нервной системы (Herdegen, Waetzig, 2001).

Особой характеристикой профиля экспрессии FosB является практически полное ее отсутствие в головном мозге при базальных условиях и медленная, но длительная экспрессия после стимуляции (Gass et al., 1993). Важно отметить, что сплайсинг гена *fosB* приводит к появлению усеченного варианта белка Δ FosB, который обладает сравнительно длительным периодом полураспада, что может обеспечить гарантированное ингибирование экспрессии генов, содержащих AP-1 элемент (Chen et al., 1997). У нокаутов по гену *fosB* изменено материнское поведение (Brown et al., 1996).

Fra1, Fra2 являются самыми мало изученными среди белков AP-1 комплекса. Известно, что они являются продуктами гена *fosB* (Chen et al., 1997). Длительная экспрессия этих белков наблюдается после кратковременных стимулов, что важно при формировании памяти. При этом анализ иммунореактивности этих изоформ показал их пресинаптическую и дендритную локализацию (Paratcha et al., 2000).

Как показали исследования, мышцах с нокаутом генов *c-jun* и *junB* летальны еще на стадии эмбриогенеза – на 12,5 и 10 день, соответственно (Eferl, Wagner, 2003). При этом в случае животных с нокаутом гена *c-jun* у зародышей наблюдаются дефекты межжелудочковой перегородки в сердце, неполное разделение аорты и легочной артерии (Eferl et al., 1999), также обнаружены нарушения в печени – высокая степень апоптоза в клетках-предшественниках гепатоцитов и гемопоэтических клетках (Jochum et al., 2001). У животных с нокаутом гена *junB* обнаружены нарушения кровоснабжения плаценты (Schorpp-Kistner et al., 1999). В свою очередь, мыши с отсутствием *junD* жизнеспособны, однако самцы являются стерильными в связи с нарушениями сперматогенеза (Thepot et al., 2000).

Что касается семейства Fos, то летальными являются нокауты гена *fra-1*. Эмбрионы погибают на 10 день развития из-за нарушений кровоснабжения плаценты и желточного мешка (Schreiber et al., 2000). Мыши, дефицитные по *c-fos*, жизнеспособны и фертильны, но у них нарушена дифференцировка остеокластов, что приводит к остеопетрозу (мраморная болезнь) (Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992). Также у таких животных наблюдаются проблемы с системой кроветворения (Okada et al., 1994).

Как упоминалось ранее, белки, образующие AP-1 транскрипционный комплекс являются важными участниками неканонического действия глюкокортикоидов (Angel et al., 2001). При этом результат действия гормонов определяется компонентным составом комплекса: транскрипция генов индуцируется, если глюкокортикоидный рецептор взаимодействует с AP-1 комплексом, образованным гомодимером Jun/Jun, и подавляется, если

гетеродимером Jun/Fos. Существование такого механизма значительно увеличивает число генов, регулируемых глюкокортикоидами, но не имеющих в своих промоторах гормон-зависимых элементов. Одним из таких генов может быть ген ключевого фермента синтеза норадреналина – тирозингидроксилазы (ТГ). Экспрессия гена этого фермента, не имеющего классического функционально-активного гормон-зависимого элемента (Sabban, Kvetnansky, 2001), тем не менее, индуцируется глюкокортикоидами *in vitro* и *in vivo* (Rani et al., 2009; Rani et al., 2013).

1.3. Тирозингидроксилаза мозга и ее регуляция глюкокортикоидами

1.3.1. Тирозингидроксилаза: ген, белок, локализация

Тирозингидроксилаза (ТГ) (ЕС 1.14.16.2) является ферментом, лимитирующим скорость биосинтеза дофамина и норадреналина, превращая тирозин в диоксифенилаланин (ДОФА) (Nagatsu et al., 1964; Kvetnansky et al., 2009), принадлежит к классу железосодержащих монооксидаз, гидроксилирует тирозин с использованием молекулярного кислорода и кофактора – тетрагидробиоптерина.

В геноме большинства организмов ген ТГ присутствует в виде одной копии, за исключением костистых рыб (Candy, Collet, 2005; Yamamoto et al., 2010), с разным числом экзонов – 7 у дрозофилы (Friggi-Grelin et al., 2003), 13 у большинства млекопитающих, 14 у человека (Kobayashi et al., 1988; Lenartowski, Gos, 2011).

Ген ТГ человека расположен на коротком плече 11 хромосомы (Craig et al., 1986; Vademci et al., 2012). Соседство последовательности, кодирующей ТГ, с последовательностью инсулиноподобного гена эволюционно сохранилось в хромосомах позвоночных (Hernandez-Sanchez et al., 2006). В геноме мыши такая синтенная область находится в конце 7, а у крыс - 1 хромосомы (Tekin et al., 2014).

У большинства млекопитающих с гена ТГ синтезируется только один транскрипт (Наусок, 2002). У крысы его длина составляет около 1800 нуклеотидов, из которых 1494 нуклеотида кодируют собственно полипептидную цепь фермента, а 35 нуклеотидов в 5'- и 265 нуклеотидов в 3'-области являются некодирующими участками (Kvetnansky et al., 2009; Lenartowski, Gos, 2011).

В головном мозге и надпочечниках человека обнаружены четыре формы как мРНК, так и, собственно, белка ТГ, отличающихся наличием 1b и/или 2 экзонов и 4 и/или 27 аминокислот, соответственно (Tekin et al., 2014). Сравнительный анализ промоторов ТГ человека, крысы и мыши выявил пять гомологичных областей, при этом общая гомология между промоторами ТГ человека и мыши составляет 47%, а человека и крысы – не более 30% (Romano et al., 2005).

Стабильность и активность фермента, а также кинетические свойства его различных изоформ определяются длиной последовательности нуклеотидов, с которой происходит синтез самого белка, и числом сайтов фосфорилирования. Изменения в стабильности мРНК ТГ и существование различных транскриптов за счет альтернативного сплайсинга предоставляют дополнительные возможности для регуляции экспрессии ТГ (Kumer, Vrana, 1996; Tekin et al., 2014).

Белок фермента представляет собой тетрамер, состоящий из 498 аминокислот в каждой субъединице с варибельным N-концевым регуляторным и консервативным каталитическим доменом на С-конце молекулы. Именно каталитические домены участвуют в образовании тетрамера по типу «лейциновых застёжек» (Tekin et al., 2014).

ТГ экспрессируется в катехоламинергических нейронах периферической и центральной нервной системы, а также в хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников. Фермент обеспечивает как базальный уровень дофамина и норадреналина, так и необходимое изменение уровней нейромедиаторов при действии эндо- и экзогенных стимулов.

Максимальная активность фермента в ЦНС представлена в области перикарионов катехоламинергических нейронов (продолговатый и средний мозг, область моста), минимальная - в области их терминалей (кора, гиппокамп, мозжечок). Дефинитивные уровни экспрессии гена, белка и активность фермента устанавливаются в процессе развития.

1.3.2. Экспрессия тирозингидроксилазы в онтогенезе

Развитие нейромедиаторных систем мозга определяется последовательной активацией каскада морфогенов и транскрипционных факторов (Goridis, Rohrer, 2002). Пусковым фактором при специализации дорзальной части нервной трубки, из которой и закладываются нейроны синего пятна ствола мозга, основного источника норадренергических нейронов, выступает костный морфогенетический белок (BMP) (Altmann, Brivanlou, 2001; Vogel-Hopker, Rohrer, 2002). Уровень экспрессии BMP определяет место локализации перикарионов этих нейронов – чем сильнее экспрессия белка, тем более дорзально закладываются нейроны, продуцирующие норадреналин (Barth et al., 1999; Guo et al., 1999). Снижение уровня эндогенного BMP уменьшает число ТГ-позитивных клеток в культуре клеток ствола мозга 13-суточных эмбрионов мыши (Holm et al., 2006). Восьмой фактор роста фибробластов (FGF8) является ко-организатором развития клеток синего пятна совместно с морфогеном Sonic Hedgehog (SHH), регулируя формирования истмуса – границы между задним, где и формируются норадренергические нейроны, и средним мозгом (Wurst, Bally-Cuif, 2001; Holm et al., 2006). Экспрессия каудальнее истмуса генов *Eg1* и *Eg2*, гомологичных генам сегментации насекомых, обеспечивает корректное образование клеток синего пятна у мышей (Simon et al., 2005). Нормальное развитие нейронов синего пятна обеспечивается последовательной активацией четырех транскрипционных факторов - *Mash1*, *Phox2a*, *Phox2b* и *Rnx/Tlx3* (Morin et al., 1997; Hirsch et al., 1998; Pattyn et al., 2000; Qian et al., 2001).

Последовательность активации транскрипционных факторов при формировании норадренергического фенотипа в симпатической нервной системе отлична от головного мозга (Goridis, Rohrer, 2002; Hippenmeyer et al., 2004), что свидетельствует о сложном программировании развития нейронов разного происхождения, даже использующих один и тот же нейротрансмиттер. Вместе с тем, транскрипционные факторы Mash1 и Phox2b являются основными детерминантами формирования норадренергического фенотипа и мозга, и периферии. В целом, морфогенез норадренергической системы головного мозга начинается в конце первой половины эмбриогенеза, проходит с достаточно высокой скоростью и завершается в раннем постнатальном периоде развития (Herlenius, Lagercrantz, 2004).

Одновременно с закладкой норадренергических нейронов ствола мозга начинается экспрессия гена ТГ. В стволовой части мозга грызунов мРНК и белок ТГ детектируются на 8-10 день эмбрионального развития (Thomas et al., 1995; Fujinaga, Scott, 1997), в гипоталамусе активность фермента определяется с 13, а в коре мозга с 18 дня пренатального развития (Puymirat et al., 1982). Низкий у новорожденных крысят уровень мРНК ТГ с возрастом увеличивается, но динамика изменения экспрессии гена и активности фермента в разных отделах мозга имеет региональные особенности (Bonnin et al., 1994; Калинина, Дыгало, 2013). Уровень экспрессии гена, белка и активности ТГ, характерный для взрослых животных, устанавливается к полуторамесячному возрасту. При этом наиболее быстрые периоды формирования нейрохимической системы, опережающие общее развитие организма, у крыс приходятся на конец пренатального онтогенеза и четвертую неделю жизни (Kalinina et al., 2012). Воздействия именно в эти сроки приводят к долговременному изменению медиаторной системы и регулируемых ее функций, что позволяет считать данные периоды развития критическими в онтогенезе норадренергической медиаторной системы (Дыгало, Калинина, 1993; Калинина, Дыгало, 2013).

ТГ абсолютно необходима для нормального развития (Carson, Robertson, 2002; Lopez-Sanchez et al., 2010), животные с нокаутом гена ТГ не выживают из-за патологии сердечно-сосудистой системы (Zhou et al., 1995). Введение ДОФА во время беременности позволяет таким животным родиться, но без дальнейшей терапии они гибнут в первые недели жизни. Фермент меланоцитов – тирозиназа способен синтезировать дофамин и норадреналин в обход синтеза из ДОФА. Поэтому пигментированные нокауты по гену ТГ выживают. Двойные нокауты по ТГ и тирозиназе также летальны (Rios et al., 1999). Но даже пигментированные нокауты по ТГ мельче своих сородичей дикого генотипа, имеют пониженный тонус сосудов и дезорганизацию кардиомиоцитов в целом. Несмотря на заместительную терапию ДОФА у таких мышей снижено содержание катехоламинов в надпочечниках и мозге, уровень кортикостерона в крови (Kobayashi et al., 1995; Bornstein et al., 2000).

В целом, экспрессия ТГ в мозге прогрессивно повышается со второй половины эмбрионального развития, достигая к полуторамесячному возрасту уровня, характерного для взрослых животных. Транскрипция ТГ находится под контролем целого ряда регуляторных факторов, взаимодействующих с промоторной областью гена.

1.3.3. Регуляция экспрессии тирозингидроксилазы

Активация уже имеющихся молекул ТГ регулируется обратимыми реакциями фосфорилирования – дефосфорилирования. ТГ имеет сайты фосфорилирования 3-мя классами протеинкиназ: цАМФ-зависимыми, кальций-кальмодулин-зависимыми, цГМФ-зависимыми. Основными сайтами фосфорилирования являются серины в 8, 19, 31 и 40 положении N-регуляторного домена белка, при этом Ser-31 и Ser-40 вносят наиболее существенный вклад в активацию фермента и присутствуют у видов, имеющих множественные формы фермента (Dunkley et al., 2004; Lenartowski, Gos, 2011; Tekin et al., 2014).

Все катехоламины ингибируют активность ТГ по механизму отрицательной обратной связи, нарушая сродство фермента к кофактору. Активность ТГ снижается при усилении обратного захвата медиаторов и увеличивается при повышенном выбросе в синаптическую щель (Lenartowski, Gos, 2011). Аллостерические изменения конформации белковой молекулы ТГ при взаимодействии с полианионами - гепарином, фосфолипидами и т.п. повышают активность ТГ (Kumer, Vrana, 1996; Tekin et al., 2014). В естественных условиях ТГ активируется в ответ на иммобилизационный стресс, как в надпочечниках, так и в синем пятне головного мозга, и эти эффекты опосредованы различными транскрипционными факторами, активация которых зависит от длительности стресса (Sabban et al., 2004; Hebert et al., 2005; Kvetnansky et al., 2009). Транскрипционная регуляция гена ТГ является комплексной и тканеспецифичной, поскольку зависит от пула транскрипционных факторов в ткани. Имеется видовая специфичность распределения регуляторных элементов в промоторах гена мышей, крыс и человека (Romano et al., 2005). Экспрессия гена регулируется позитивными и негативными регуляторными элементами промотора гена ТГ (Sabban, Kvetnansky, 2001; Kvetnansky et al., 2009). В промоторной области гена фермента известны множественные транскрипционные фактор-связывающие сайты: два AP-1, SP-1, AP-2, два CRE, Oct/HEPT мотив, E-box/бивалент и другие, которые позволяют различным факторам, таким как Ca²⁺, глюкокортикоиды, уровень кислорода и стресс, регулировать уровень мРНК ТГ (Kvetnansky et al., 2009; Rani et al., 2009; Lenartowski, Gos, 2011). Наибольший вклад в регуляцию транскрипции ТГ вносят AP-1 (-205/ -195) и CRE (- 45/ -38) элементы промотора.

CRE/CaRE (TGACGTCA) является элементом, обеспечивающим основной и индуцированный уровень экспрессии гена ТГ (Rani et al., 2009; Lenartowski, Gos, 2011). CRE/CaRE активируется при изменении в клетке уровней цАМФ и Ca²⁺, а также в ответ на действие агонистов холинергических рецепторов, форболового эфира, никотина, что увеличивает

транскрипцию гена ТГ. При этом для максимального ответа гена ТГ на цАМФ-зависимые процессы необходима активация двух цАМФ-зависимых сайтов, расположенных в области -102 и -73 п.н. (Nagamoto-Combs et al., 1997).

Проксимальный AP-1 (TGATTCA) элемент промотора ТГ определяет основной и индуцированный уровни транскрипции гена ТГ в ответ на воздействие Ca^{2+} , агонистов мускариновых рецепторов, гипоксии, фоболовых эфиров. В целом, наличие в 5'-области гена ТГ сайтов AP-1 и CRE высококонсервативно и обнаружено у всех исследованных на данный момент видов (Lenartowski, Gos, 2011). Наряду с CRE/CaRE, AP-1, активирующих транскрипцию, имеются регуляторные элементы, подавляющие экспрессию гена ТГ. Так, между AP-1 и CRE/CaRE находится гептамер (HEPT), который взаимодействует с Oct-2 и ингибирует транскрипцию гена фермента (Lenartowski, Gos, 2011).

Исследования последних лет свидетельствуют о важном вкладе посттранскрипционных процессов в изменение активности ТГ головного мозга (Tank et al., 2008; Boschi et al., 2015) и надпочечников (Sun et al., 2004). Усиление транскрипции гена ТГ может сопровождаться увеличением стабильности ее мРНК. Установлено, что увеличение времени полужизни мРНК ТГ при гипоксии происходит в результате взаимодействия РНК со специфическим белком, защищающим ее от нуклеаз (Paulding et al., 2002).

В целом, несмотря на многолетние исследования регуляции транскрипции и трансляции ТГ до настоящего времени многие детали этих процессов остаются неясными. Как утверждают авторы авторитетных обзоров, посвященных этим вопросам (Lenartowski, Gos, 2011; Tekin et al., 2014), появляются все новые факты, дополняющие сложность и многоэтапность регуляции экспрессии ключевого фермента синтеза дофамина и норадреналина. К их числу относится проблема механизмов глюкокортикоидной регуляции гена ТГ.

1.3.4. Регуляция экспрессии тирозингидроксилазы глюкокортикоидами

Действие стресса различной природы – холод, иммобилизация, изоляция, гипогликемия и т.д. повышают уровень мРНК, белка и активность ТГ как в мозге, так и на периферии (Kvetnansky, Sabban, 1998; Makino et al., 2002; Sabban et al., 2004; Kvetnansky et al., 2009). Однако, непосредственное введение гормонов стресса – глюкокортикоидов вызывает подчас неоднозначные и противоречивые результаты, связанные, в основном, с периодом воздействия, дозой введенного гормона, исследуемой линией животных.

В культуре клеток феохромоцитомы индукция глюкокортикоидами экспрессии ТГ установлена много лет назад (Lewis et al., 1983) и неоднократно подтверждена в дальнейшем (Tank et al., 1986; Fossom et al., 1992; Nagerty et al., 2001; Radcliffe et al., 2009; Rani et al., 2009). Более того, именно обработка культуры клеток дексаметазоном была использована при определении нуклеотидной последовательности гена ТГ (Lewis et al., 1983).

Работами ряда исследователей получены убедительные свидетельства гормональной индукции гена ТГ *in vivo* при введении глюкокортикоидов в раннем онтогенезе грызунов, а также участия ТГ мозга в гормон-зависимом «онтогенетическом программировании». После введения глюкокортикоидов в конце пренатального онтогенеза активность фермента в области локализации перикарионов норадренергических нейронов повышается уже через 6 часов и оказывается измененной во взрослом состоянии (Markey et al., 1982; Дыгало, Калинина, 1993; Dent et al., 2001; Калинина, Дыгало, 2013).

Исследования последних лет показали, что увеличение активности ТГ в раннем онтогенезе при введении как дексаметазона, так и гидрокортизона сопровождается увеличением мРНК фермента (Kalinina et al., 2012). Было установлено, что период индуцирующего действия глюкокортикоидов охватывает у грызунов конец внутриутробного – начало постнатального развития. Введение гормона на 20 день пренатального онтогенеза приводит к

увеличению мРНК гена ТГ. Отдаленные последствия введения гормона проявляются повышенной активностью ТГ в стволе и коре мозга уже взрослых животных. Следовательно, гормональная индукция в чувствительный период раннего онтогенеза способна на длительный период модифицировать ход развития медиаторной системы и тем самым изменить ее функционирование.

Отсроченные последствия гормонального воздействия распространяются на уровень дофамина и норадреналина, обмен нейротрансмиттеров при стрессе, а также на регулируемые катехоламинами функции и поведение взрослых животных (Naumenko, Dygalo, 1980; Дыгало, 1993; Matthews et al., 2001; Kreider et al., 2006; Slotkin et al., 2006; McArthur et al., 2007; Kapoor et al., 2008; Champagne et al., 2009).

Вместе с тем, вопрос о механизме регуляции ТГ глюкокортикоидами остается открытым на протяжении многих лет его исследования. Это связано с отсутствием функционально-активного глюкокортикоид-зависимого элемента (GRE) в промоторе гена ТГ, взаимодействие с которым глюкокортикоидных рецепторов является обязательным этапом регуляции экспрессии генов (Oakley, Cidlowski, 2013), согласно каноническому механизму действия стероидных гормонов. Все попытки обнаружить GRE в регуляторных областях гена ТГ у грызунов и человека, начавшиеся уже более 30 лет назад (Lewis et al., 1983; Tank et al., 1986; Fossom et al., 1992; Nagerty et al., 2001), не дали положительного результата. При действии дексаметазона взаимодействия GR с последовательностями, сходными с GRE в районах промотора ТГ в позициях -454 пн и -2.5 кб от старта транскрипции, не было обнаружено (Lewis et al., 1983; Rani et al., 2009). Регуляция глюкокортикоидами экспрессии ТГ в мозге взрослых животных не находит экспериментальных подтверждений (Smith et al., 1991; Sabban, Kvetnansky, 2001; Makino et al., 2002; Kvetnansky et al., 2009; Lenartowski, Goc, 2011). Способность гормона индуцировать ТГ в раннем онтогенезе также ограничена определенным временным интервалом – введение

глюкокортикоидов на 8 день жизни крыс не приводило к каким-либо изменениям в уровне мРНК или активности фермента (Kalinina et al., 2012).

Очевидное противоречие между отсутствием GRE и выявленной глюкокортикоидной индукцией экспрессии гена ТГ в ряде моделей (культурах клеток и в определенный период раннего онтогенеза грызунов) позволило предположить возможность неканонического пути регуляции гормоном экспрессии фермента. Механизм неканонического действия глюкокортикоидов, предложенный еще в середине 90-х годов, находит все большее количество экспериментальных подтверждений (Groeneweg et al., 2011). Согласно этому механизму, регуляция экспрессии генов глюкокортикоидами может осуществляться за счет белок-белкового взаимодействия активированного гормоном рецептора с белками других транскрипционных факторов (Lieberman et al., 2007; Beck et al., 2009; Langlais et al., 2012), среди которых наибольший интерес представляет транскрипционный комплекс AP-1 (Diamond et al., 1990; Pfahl, 1993; Teurich, Angel, 1995; Kassel, Herrlich, 2007). Особенность вовлечения AP-1 в регуляцию экспрессии генов состоит в зависимости направления изменения компонентного состава белков, его образующих (Teurich, Angel, 1995). При взаимодействии глюкокортикоидного рецептора с AP-1 комплексом, образованным гетеродимером Fos/Jun, глюкокортикоиды подавляют, а при взаимодействии с гомодимером Jun/Jun, напротив, активируют транскрипцию генов (Teurich, Angel, 1995; Sapolsky et al., 2000; Kassel, Herrlich, 2007; Newton, Holden, 2007). Известная вариабельность экспрессии белков Fos и Jun в ходе развития (Pennypacker, 1995; Zhong et al., 2001; Raivich, Behrens, 2006), определяющая результат белок-белкового механизма действия гормона, может быть основой зависимости индуцирующих эффектов глюкокортикоидов на ТГ от стадии онтогенеза (Kalinina et al., 2012).

Промотор гена ТГ содержит два сайта связывания транскрипционного комплекса AP-1 (-207/-201 и -5728/-5734) (Fung et al., 1992; Rani et al., 2009).

Участие дистального AP-1 в глюкокортикоидной индукции гена ТГ в культуре клеток феохромоцитомы крысы (Rani et al., 2009) и человека (Rani et al., 2013) доказано. Функционирование подобного механизма *in vivo*, в развивающемся мозге, еще предстоит установить.

Рассмотренные в обзоре литературные данные свидетельствуют о том, что изменение экспрессии глюкокортикоидами ТГ и других генов, лишенных GRE, за счет белок-белкового взаимодействия GR с AP-1 транскрипционным фактором, может быть возможным путем их вовлечения в глюкокортикоид-зависимое «онтогенетическое программирование». Поэтому планируемый в работе анализ до сих пор неясного функционирования этого механизма в критические сроки формирования мозга представляется крайне необходимым.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Животные

В эксперименте использовали крыс линии Вистар, содержащихся в условиях свободного доступа к воде и корму в виварии ИЦиГ СО РАН, согласно правилам гуманного обращения с экспериментальными животными, утвержденными Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН, в соответствии с Директивой Европейского Парламента и Совета ЕС 2010/63/EU от 22 сентября 2010 года и “Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приказ Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 г.). Для получения крысят с датированным сроком рождения с самцом ссаживали по три самки. Первым днем беременности считали день обнаружения спермы во влагалищном мазке. Беременных самок за 3-4 дня до родов рассаживали в индивидуальные клетки. День родов считали первыми сутками жизни. На вторые сутки все пометы были выровнены до восьми животных обоего пола. В работе использовали 20-дневные плоды, 3-, 8-дневных крысят обоего пола, а также 25- и 70-дневных самцов крыс. Отсаживание от матери проводили на 25 день жизни. На каждую возрастную точку брали животных не менее чем из 5 разных пометов. Число животных в каждой группе было не менее 8.

2.2. Экспериментальные воздействия

На третьи сутки жизни шести крысятам каждого помета подкожно однократно вводили фармакологически эквивалентные дозы препаратов дексаметазона “Dexamethasone phosphate” (KRKA, Словения, доза 0,2 мг/кг в 20 мкл) либо гидрокортизона “Hydrocortisone-Richter” (Gedeon Richter Ltd, Венгрия, доза 5 мг/кг в 20 мкл). Такая доза гормона является клинически проверенной и используется при терапии респираторного дистресс-синдрома новорожденных. Контрольным однопометным животным вводили эквивалентный объем физиологического раствора или оставляли

интактными. После инъекций крысят возвращали в родительскую клетку. Взятие образцов ткани мозга производили через 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 и 24 часа после экспериментального воздействия. При анализе отдаленного действия глюкокортикоидов на уровень мРНК ТГ (25 и 70 дни жизни) самцы крыс содержались в клетках по 8 особей, с рассаживанием в индивидуальные клетки за 2 дня до забоя. При введении дексаметазона на восьмой день жизни животных забивали через 6 часов после введения гормона.

2.3. Забор материала

а) для определения уровней мРНК исследуемых генов и иммунопреципитации хроматина

Беременных самок, плоды, 3 и 8-дневных крысят, а также 25- и 70-дневных животных забивали быстрой декапитацией. Все процедуры при выделении мозга и заборе образцов проводили на холоде. У 20-дневных плодов выделяли стволую часть мозга, без мозжечка, которая включала в себя задний и средний мозг, а также надгипоталамическую область промежуточного мозга после рассечения по плоскости от эпифиза к перекресту зрительных нервов. У 3-, 8-, 25- и 70-дневных крысят выделяли ствол, включающий продолговатый мозг и область моста – блок ткани каудальнее задних бугров четверохолмия и роstralнее овального отверстия без мозжечка. Также у 3-дневных крысят выделяли гиппокамп и префронтальную кору. Образцы ткани до выделения тотальной РНК/иммунопреципитации хроматина хранили в металлических контейнерах в жидком азоте.

б) для иммуногистохимического анализа

Транскардиальную перфузию 3- и 8-дневных крысят после наркотизирования авертином (150 мг/кг) проводили 25 мл 0,02 М раствором натрий-фосфатного буфера (PBS) и 30 мл фиксатором - 4% параформом (PFA) в 0,02 М PBS. После этого извлекали целый мозг и постфиксировали

его в 4% PFA в PBS 12 часов. Затем мозг промывали трижды по 10 минут в 0,02 М PBS и помещали минимум на сутки в 30% сахарозу. После чего мозг замораживали при температуре $-40-42^{\circ}\text{C}$ в изопентане. Коронарные срезы мозга делали на криотоме (HM 550, Carl Zeiss) при температуре $-23^{\circ} - -25^{\circ}\text{C}$ толщиной 18 мкм и монтировали на стекла super frost plus (Menzel-Glaser). Границы анатомических структур мозга крысы определяли по атласу (Paxinos, Watson, 1998).

2.4. Выделение РНК

Выделение суммарной РНК проводили одностадийным гуанидин-изотиоцианатным методом (Chomczynski, Sacchi, 1987). Ткань мозга гомогенизировали в 5 объемах, относительно веса образца, охлажденного лизирующего буфера, содержащего 4 М гуанидинизотиоцианат, 0,7 М цитрат натрия (рН 7,0), 10% саркозил, 2 β -меркаптоэтанол, 2 М ацетат натрия (рН 4,0), водонасыщенный фенол (рН 4,0), хлороформ. После 3-х минут встряхивания, смесь охлаждали 15 минут на льду, затем 15 минут центрифугировали (10000g, 4°C). Осаждение РНК из водной фазы проводили изопропанолом при -20°C в течение ночи с последующим центрифугированием (14000g, 4°C). Полученный осадок дважды промывали 75% этанолом, подсушивали 96% этанолом, затем растворяли в 20 мкл деионизованной воды (ddH₂O). Раствор суммарной РНК хранили при -75°C до получения кДНК. Концентрацию РНК и степень её очистки от белков определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) при длинах волн: 260 и 280 нм. Соотношение оптической плотности на длинах волн 260/280 нм, равное 1,9–2,0 считалось приемлемым для дальнейшей работы с препаратами РНК.

2.5. Получение кДНК

3-5 мкг суммарной РНК каждого образца инкубировали 90 мин при 42°C в 20 мкл смеси, содержащей 50U ревертазы MuLV («СибЭнзим»,

Россия), 5 мкМ Oligo(dT)₁₅ праймера, 1,5 мМ каждого dNTP, 1× буфер (50 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 3 мМ MgCl₂, 75 мМ KCl, 10 мМ DTT). Перед началом реакции смесь РНК, Oligo(dT)₁₅ праймера и воды прогревали при 70°C в течение 10 мин. По окончании инкубации фермент инактивировали нагреванием до 70°C в течение 10 мин. Образцы кДНК хранили при -75°C. Для ПЦР кДНК разводили в 25 раз.

2.6. Определение уровня мРНК генов *TG*, *c-fos*, *fosB*, *c-jun*, *junB*, *junD* методом ПЦР в реальном времени (real-time PCR) с использованием технологии TaqMan

Количественный анализ содержания мРНК генов *TG*, *c-fos*, *fosB*, *c-jun*, *junB*, *junD* относительно мРНК гена *actb* проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием наборов TaqMan® Gene Expression Assays на амплификаторе ABI VIIA™ 7 (“Applied Biosystems”, США) и рассчитывали по методу $\Delta\Delta C_t$.

Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1×TaqMan® Universal PCR Master Mix, 1×TaqMan® Gene Expression Assays (Табл. 1) и 2,5 мкл кДНК в стандартных 96-луночных оптических плашках. Пробы TaqMan® имели флуоресцентный краситель FAM на 5'-конце и нефлуоресцентный гаситель BHQ на 3'-конце, а также группу связывания с малой бороздкой ДНК.

Режим ПЦР в соответствии с протоколом Applied Biosystems состоял из 2 минутного прогревания смеси при 50°C, 10-минутного прогрева при 95°C для активации полимеразы и денатурации образца с последующими 40 циклами: 15 сек денатурации при 95°C и 60 сек инкубации при 60°C. В соответствии с рекомендациями Applied Biosystems, уровень пороговой флюоресценции выбирался управляющей программой (SDS, version 1.2.3) автоматически. Все определения проводились минимум в 2-х повторах для каждого образца кДНК.

Таблица 1. *Каталожные номера наборов TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems)*

TaqMan® Gene Expression Assays	№ по каталогу Applied Biosystems
<i>actb</i>	Rn00667869_m1
<i>TГ</i>	Rn00562500_m1
<i>c-fos</i>	Rn02396759_m1
<i>fosB</i>	Rn00564121_m1
<i>c-jun</i>	Rn00572991_s1
<i>junB</i>	Rn00572994_s1
<i>junD</i>	Rn00824678_s1

2.7. Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга¹

Иммуногистохимическое определение экспрессии белков проводили в соответствии с общепринятой методикой с небольшими модификациями (Whiteside, Munglani, 1998). После разморозки и высушивания на воздухе в течение ночи, стекла со срезами промывали 15мин в 0,02 М PBS (рН всех растворов на PBS равнялась 7,30-7,35), 15 мин - в 0,02 М PBS с 0,1% Triton X-100 (PBST). Неспецифическое связывание блокировали инкубацией в 1,5% BSA в PBST в течение часа при комнатной температуре.

Для выявления целевых белков JunB, c-Fos и TГ стекла со срезами инкубировали с первичными антителами (Таб.2), разведенными в PBS, содержащем 1,5 % BSA и 0,1% Triton X-100 в течение ночи при +4°C. После инкубации срезы двукратно промывали в 0,02 М PBS с 0,1% Triton X-100. Реакцию со вторичными антителами проводили при комнатной температуре в течение двух часов. После трехкратной промывки 0,02 М PBS с 0,1% Triton

¹ Выполнено совместно с сотрудниками лаборатории функциональной нейрогеномики с.н.с. Булыгиной Ветей Вячеславовной и н.с. Ланшаковым Дмитрием Александровичем.

X-100 по 15 мин срезы заключали в заливочную среду Vectashield с интеркалятором DAPI фирмы Vector Laboratories.

Для контроля специфичности иммуногистохимического окрашивания всю процедуру проводили без инкубирования с первичными антителами. Уровень флюоресценции при этом не превышал фоновых значений.

Таблица 2. *Перечень использованных антител*

Мишень	Фирма производитель (каталожный номер)	Первичное - вид хозяина/Вторичное антитело-метка	Разведение
c-Fos	Abcam (ab7963)	Первичное – кролик	1:100
c-Fos	Cell Signaling (#2250)	Первичное – кролик	1:100
JunB	Santa Cruz (sc8051)	Первичное – мышь	1:100
ТГ	Millipore (AB1542)	Первичное – овца	1:100
IgG кролика	Jackson ImmunoResearch (711-585-152)	Вторичное – осел-Alexa- 594	1:200
IgG кролика	Jackson ImmunoResearch (711-545-152)	Вторичное – осел-Alexa- 488	1:200
IgG мыши	Jackson ImmunoResearch (115-515-003)	Вторичное – овца- DyLight-594	1:200
IgG овцы	Jackson ImmunoResearch (713-485-147)	Вторичное – осел-Alexa- 488	1:200

Гистологические препараты исследовали в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ. Срезы анализировали с помощью микроскопа Carl Zeiss "Axioskop" 2 Plus, оборуданного лампой HBO 50. Фотографии делали автоматической камерой AxioCam на программном обеспечении AxioVision 2.0. Уровень иммунореактивности определяли по величине средней оптической плотности клеток, измеренной с помощью программы AxioVision 4.6. Наиболее репрезентативные препараты снимали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 780 Carl Zeiss.

2.8. Иммунопреципитация хроматина (ChIP)

Анализ иммунопреципитации хроматина проводили в соответствии с протоколами (Active Motif; (Ding, Kilpatrick, 2013) с некоторыми модификациями.

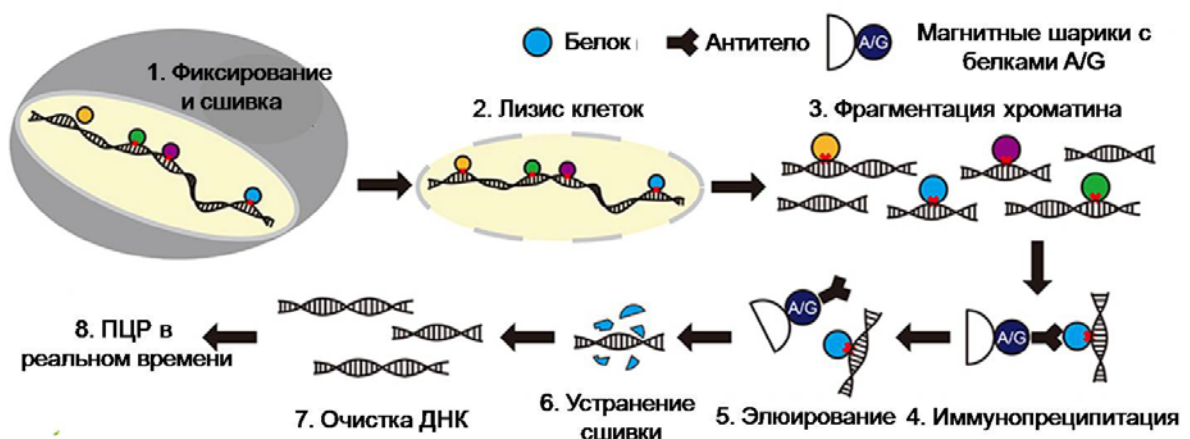


Рис. 3. Основные этапы иммунопреципитации хроматина (ChIP).

Для получения хроматина пулированные образцы стволов мозга 3- и 8-дневных крысят суспендировали в PBS с ингибиторами протеаз. Фиксацию белков на хроматине проводили 37% раствором формальдегида (до конечной концентрации 1%), в течение 10 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. После инкубации с 1,25 М раствора глицина суспензию центрифугировали 3 мин при 1100×g и 4°C. Осадок трижды

ресуспендировали в растворе PBS с ингибиторами протеаз и центрифугированием по 3 мин при $1100\times g$ и $4^{\circ}C$, удаляя супернатант.

Клетки лизировали до ядер пипетированием в соответствующем буфере (сахароза 0.25M, Tris-HCl 50mM pH 8.0, $MgCl_2$ 5mM, KCl 25mM, 0,1% NP-40, 1mM DTT, ингибиторы протеаз) в течение 10 мин, с 3 мин центрифугированием при $1100\times g$ и $4^{\circ}C$.

Содержимое ядер освобождали инкубацией в специальном буфере (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl (pH 8.0), ингибиторы протеаз) в течение 10 мин на холоде.

Полученные лизаты использовали для фрагментации хроматина на ультразвуковом дезинтеграторе Covaris S2 (ЦКП «Геномика» СО РАН) при рекомендованных Covaris параметрах. В результате получали фрагменты размером 100-500 п.н. Образцы центрифугировали 15 мин при 10000 об/мин и $4^{\circ}C$. Супернатант переносили в чистые пробирки. Хранили при $-20^{\circ}C$.

Для определения размеров фрагментированных комплексов из аликвоты 50 мкл стандартным методом выделяли ДНК (Маниатис и др., 1984), которую анализировали в 2% агарозном геле с маркером молекулярного веса (Рис. 4).

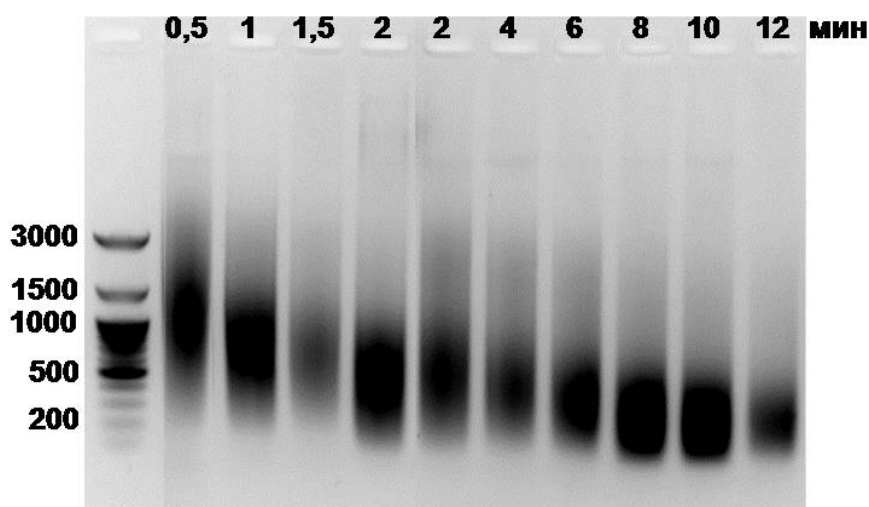


Рис.4. Фрагментация хроматина в зависимости от продолжительности ультразвуковой обработки.

Для одной реакции иммунопреципитации использовали 10-30 мкг хроматина. Магнитные шарики (Novex® by Life Technologies™, Dynabeads® Protein G), подготовленные согласно протоколу производителя, предварительно инкубировали с соответствующими антителами (против c-Fos, JunB, GR, IgG) (Табл. 3) в течение часа при комнатной температуре и перемешивании. Далее к 250 мкл образца добавляли комплекс антитело-магнитный шарик для инкубации в течение ночи при 4°C и постоянном перемешивании. После инкубации образцы промывали буферными растворами в возрастающей концентрации NaCl (150mM - 500mM), буферами на основе соли лития (0.25M LiCl) и трис-ЭДТА с использованием магнитного штатива. Элюат с магнитных шариков собирали двукратно с использованием элюирующего буфера (1% SDS, 100mM NaHCO₃). Расшивку проводили в 5 М раствор NaCl в течение ночи при 65°C.

Для оценки неспецифического связывания использовали антитела к IgG. Оценку потери материала в процессе реакции оценивали по контрольному образцу (Input), который отбирали после стадии фрагментации.

В дальнейшем все образцы (элюаты и Input) обрабатывали РНКазой А (10мг/мл) (30 мин при 37°C) и протеиназой К (20мг/мл) (2 ч при 65°C). ДНК очищали от белков фенол/хлороформной смесью, осаждали из раствора изопропанолом с 3М ацетатом натрия в течение ночи при -20°C и центрифугированием 20 мин при 14000 об/мин, 4°C. Осадок промывали дважды 75% этанолом, подсушивали 96% этанолом и растворяли в 15 мкл воды. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop2000.

Полученную ДНК использовали для ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентного красителя SYBRGreenI. Последовательности использованных праймеров (прямой праймер: 5'-CATGATTGCTGTACATCACC; обратный праймер: 5'-CAACCTGTGCACCAGTGAGT) были специфичны для дистального AP-1 элемента (-5772/-5638) промотора гена ТГ крысы (Rani et al., 2009).

Таблица 3. Антитела, использованные в реакции иммунопреципитации хроматина (ChIP).

Мишень	Производитель (каталожный номер)	Первичное - вид хозяина	Разведение
JunB	Santa Cruz (sc8051)	Первичное – мышь	1:50
c-Fos	Cell Signaling (#2250)	Первичное – кролик	1:50
GR	Santa Cruz	Первичное – кролик	1:50
IgG	Jackson ImmunoResearch (011-000-003)	Первичное – кролик	1:1000

ПЦР проводили в 25 мкл готовой реакционной смеси с SYBRGreen I, ROX (Синтол, Россия), праймерами, 2% DMSO и 200 нг ДНК в стандартных 96-луночных оптических плашках. Режим ПЦР в соответствии с протоколом Applied Biosystems состоял из 2 минутного прогревания смеси при 50°C для активации полимеразы, 10-минутного прогрева при 95 °C для максимальной денатурации образцов, с последующими 45 циклами: 15 сек денатурации при 95°C и 60 сек инкубации при 60°C. Специфичность целевого продукта устанавливали с помощью аналитического плавления по завершении процесса амплификации в диапазоне температур от 60°C до 95°C.

Результаты нормализовали относительно IgG контроля, обогащение рассчитывали из полученных значений Ct, согласно протоколу Thermo Fisher Scientific.

2.9. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA (ver. 8.0; StatSoft, Inc., 2001): однофакторным (при анализе межвозрастных различий, эффектов гормона) или многофакторным (при анализе эффектов гормона и времени; гормона, времени и структуры) дисперсионным анализом (ANOVA), достоверность различий между группами устанавливали согласно LSD критерию Фишера.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Соотношение уровней мРНК и белков семейств Jun и Fos в раннем онтогенезе

Зависимость проявления глюкокортикоидной индукции тирозингидроксилазы от возраста предполагает вовлечение в этот процесс дополнительных регуляторных факторов, одним из которых может являться смещение в онтогенезе соотношения экспрессии белков Jun и Fos, определяющее, согласно неканоническому механизму действия гормона, направление изменения экспрессии зависимых генов.

Поэтому на первом этапе работы были установлены особенности экспрессии генов семейств Jun (*junB*, *junD*, *c-jun*), Fos (*c-fos*, *fosB*), а также их соотношение в стволе головного мозга плодов и неонатальных крысят.

3.1.1. Динамика экспрессии генов Jun/Fos в перинатальном онтогенезе

Гены раннего ответа демонстрировали специфический для каждого транскрипта паттерн экспрессии мРНК в стволовой части мозга в перинатальном онтогенезе (Рис. 5).

Уровень мРНК *c-jun* не менялся в исследованный период развития ($F(3, 31) = 0,05$, $p > 0,1$), экспрессия гена *fosB* незначительно повышалась только к 8 дню жизни ($F(3, 40) = 3,0$, $p < 0,05$). Уровень *junB* ($F(3, 37) = 9,6641$, $p < 0,001$) и *junD* ($F(3, 37) = 10,453$, $p < 0,001$) нарастал уже к 3 дню, а рост *c-fos* ($F(3, 33) = 45,459$, $p < 0,001$) продолжался до 8 дня после рождения.

Следовательно, базальная экспрессия генов раннего ответа не является постоянной и имеет характерные онтогенетические профили, что способно изменить соотношение между уровнями их экспрессии в онтогенезе.

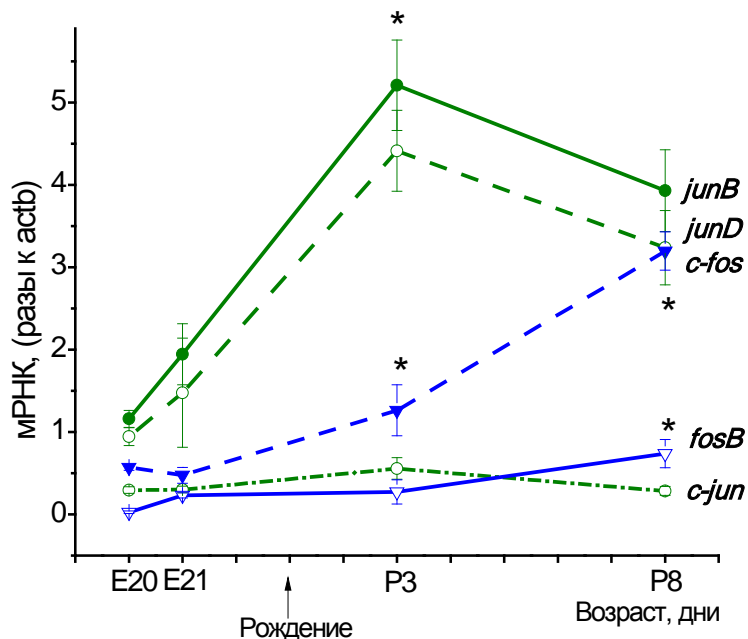


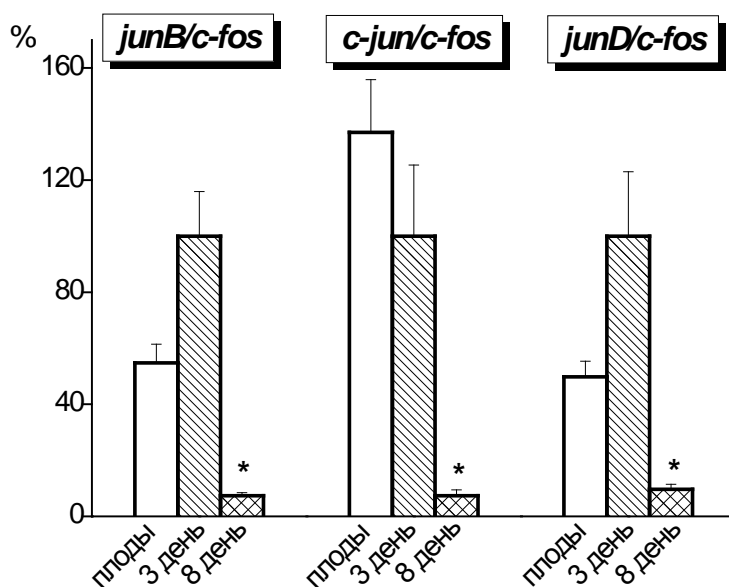
Рис. 5. Уровни мРНК генов семейств *Jun* (*junB*, *junD*, *c-jun*) и *Fos* (*c-fos*, *fosB*) в стволе мозга в перинатальном онтогенезе (* $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим наблюдением).

3.1.2. Соотношение уровня мРНК генов семейства *Jun* к *Fos*

В стволе мозга крысят разного возраста – 20-дневных плодов (период выявленной глюкокортикоидной индукции гена ТГ), 3-дневных (период неустановленной зависимости экспрессии гена ТГ от глюкокортикоидов) и 8-дневных крысят (период нечувствительности к гормону) было определено соотношение между уровнями базальной экспрессии генов семейств *Jun* и *Fos* (Рис. 6А).

Установлено, что в стволе мозга плодов и 3-дневных животных соотношение для всех исследуемых представителей генов семейства *Jun* (*junB*, *c-jun*, *junD*) к *c-fos* достоверно выше, чем в стволе мозга 8-дневных крысят: *junB/c-fos* $F(2, 49) = 38,67$, $p < 0,001$; *c-jun/c-fos* $F(2, 35) = 20,34$, $p < 0,001$; *junD/c-fos* $F(2, 43) = 30,08$, $p < 0,001$.

А.



Б.

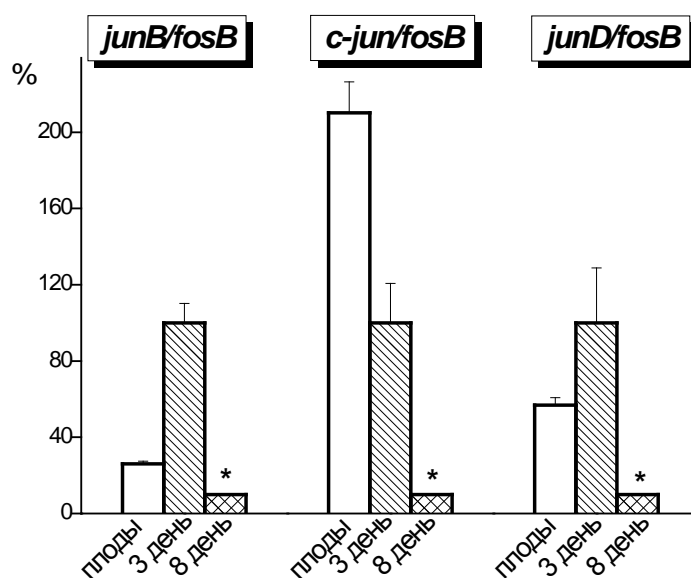


Рис. 6. Соотношение уровней мРНК генов семейств Jun к *c-fos* (А), к *fosB* (Б) (* $p < 0,05$ по сравнению с другими возрастными группами) в стволе мозга.

Аналогичное соотношение уровней мРНК генов семейства Jun было установлено по отношению и к другому представителю семейства Fos – *fosB* (Рис. 6Б). Как в стволе мозга плодов, так и 3-дневных крысят установлен более высокий уровень соотношения базальной экспрессии для всех генов семейства Jun по сравнению с 8-дневными животными: $junB/fosB$ $F(2, 31) =$

122,77, $p < 0,001$; $c-jun/fosB$ $F(2, 28) = 61,52$, $p < 0,001$; $junD/fosB$ $F(2, 30) = 12,95$, $p < 0,001$.

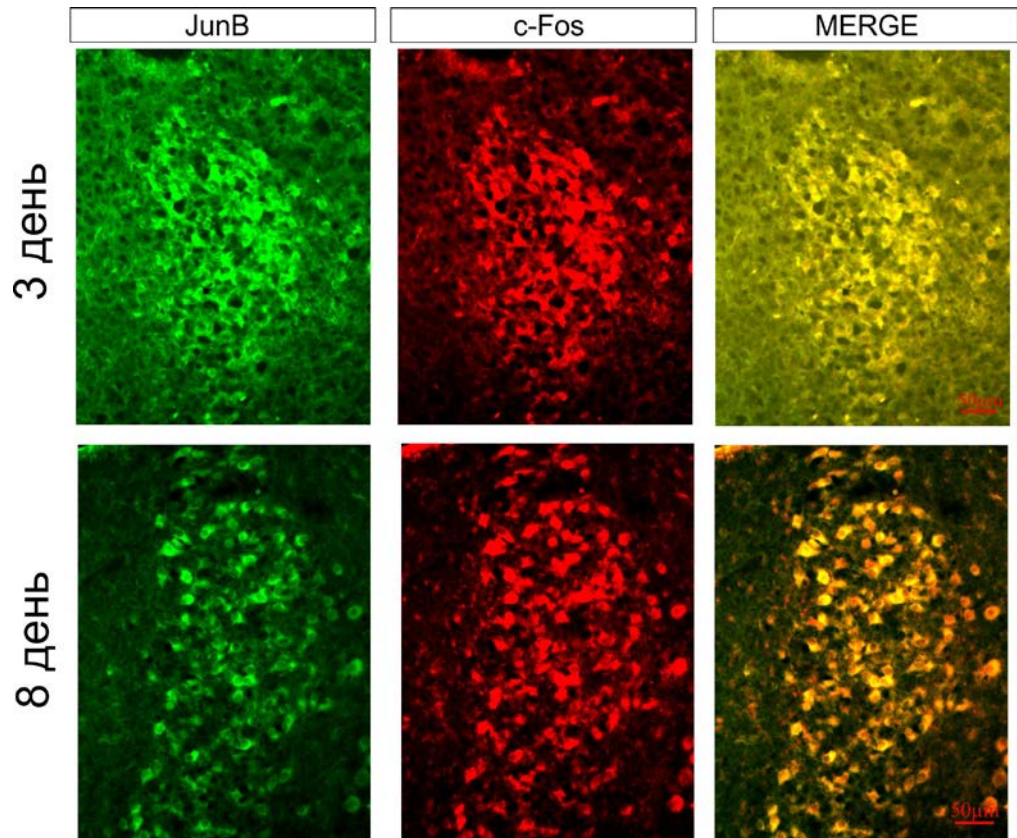
3.1.3. Соотношение экспрессии белков JunB и c-Fos в раннем онтогенезе

Обнаруженные соотношения уровней мРНК генов Jun/Fos были подтверждены оценкой соотношения экспрессии белков JunB к c-Fos методом иммуногистохимического окрашивания (Рис. 7А). Выбор именно этих белков обусловлен их приоритетным участием в глюкокортикоидной регуляции экспрессии гена ТГ в культуре феохромоцитомы (Rani et al., 2009; Rani et al., 2013). Было выявлено достоверно большее соотношение экспрессии данных белков в области синего пятна ствола мозга 3-дневных крысят по сравнению с 8-дневными ($F(1,9) = 9,42$; $p < 0,01$) (Рис. 7Б.).

Установленные в работе соотношения экспрессии белков раннего ответа свидетельствуют о преобладании в мозге плодов белков семейства Jun, по сравнению с Fos, что в случае активации неканонического механизма действия гормона, может способствовать проявлению гормональной индукции экспрессии глюкокортикоид-зависимых генов, одним из которых является ген ТГ. У 8-дневных крысят соотношение белков Jun/Fos смещено в пользу представителей семейства Fos, что, согласно неканоническому механизму, может препятствовать проявлению индукции зависимых генов. Аналогичное плодам преобладание белков семейства Jun над белками Fos наблюдалось и у 3-дневных крысят, для которых факт зависимости экспрессии гена ТГ от уровня глюкокортикоидов до настоящего времени не был установлен.

Определение изменения уровня мРНК ТГ под действием глюкокортикоидов на третий день жизни будет являться необходимой верификацией нашего предположения.

А.



Б.

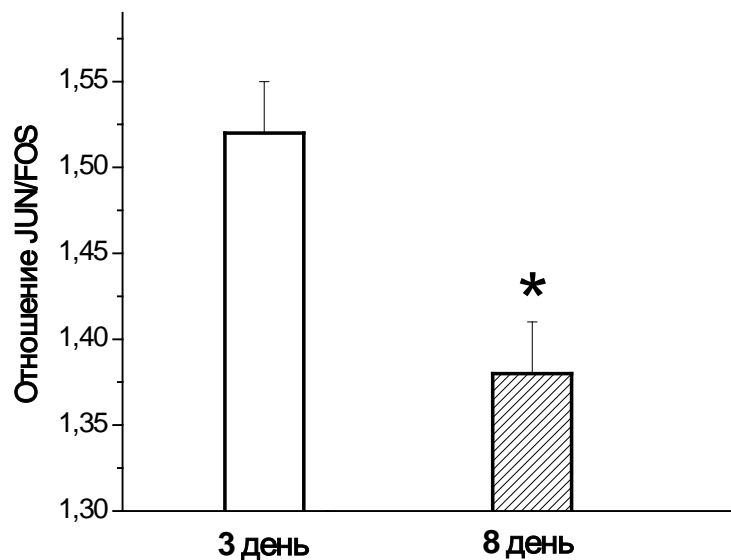


Рис. 7. А. Репрезентативные микрофотографии совместной экспрессии *JunB* и *c-Fos* в клетках синего пятна ствола мозга трехдневных и восьмидневных крысят. Б. Соотношение экспрессии белков *JunB* к *c-Fos* в стволе мозга трех- и восьмидневных крысят (* $p < 0,05$ по сравнению с другим возрастом).

3.2. Действие глюкокортикоидов на уровень мРНК ТГ в стволе мозга трехдневных крысят

Введение на 3 день жизни как дексаметазона, так и гидрокортизона индуцировало экспрессию гена ТГ через шесть часов после воздействия ($F(2,25) = 8,74, p < 0,001$) (Рис.8).

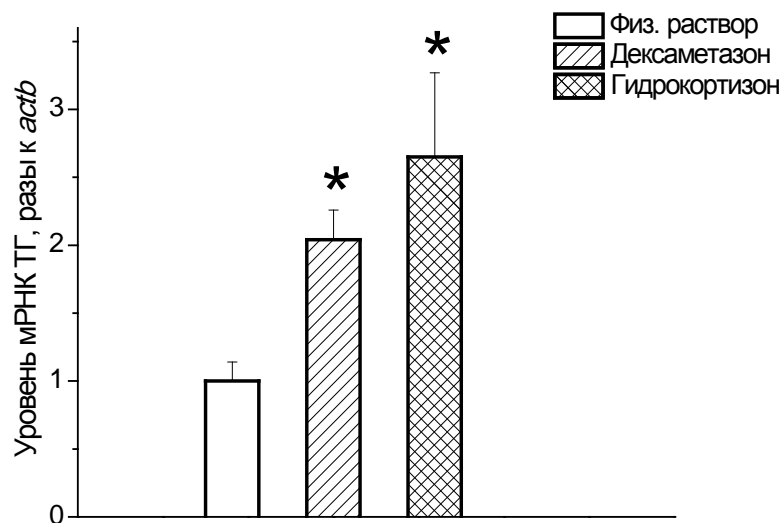


Рис. 8. Уровень мРНК гена ТГ в стволе мозга трехдневных крысят через 6 часов после введения глюкокортикоидов (* $p < 0,05$ по сравнению с введением физ.раствора).

Следовательно, и на третий день жизни, с обнаруженным количественным преимуществом базальной экспрессии белков семейства Jun над белками Fos, глюкокортикоиды, как и в мозге плодов, индуцируют экспрессию гена ТГ в стволе мозга.

Кроме того, уровни транскриптов генов раннего ответа, как и их соотношение может меняться в результате действия глюкокортикоидов в раннем онтогенезе. Для выяснения этого вопроса в работе анализировали

уровни мРНК генов *c-fos* и *c-jun* в отделах мозга 3-дневных крысят после введения дексаметазона.

3.3. Влияние глюкокортикоидов на экспрессию генов раннего ответа *c-fos* и *c-jun* в отделах неонатального мозга

Уровень мРНК гена *c-fos* имеет ярко выраженные региональные различия в мозге интактных 3-дневных крысят ($F(2, 33)=32,17$; $p<0,001$) (Рис.9А), в отличие от экспрессии гена *c-jun*, которая была сопоставима между исследованными отделами мозга ($F(2, 31)=0,13$; $p<0,88$) (Рис.9Б). Ствол мозга имеет достоверно ($p<0,001$) повышенный уровень мРНК гена *c-fos* по сравнению с гиппокампом и префронтальной корой, также достоверно различающихся друг от друга по количеству транскриптов данного гена ($p<0,01$).

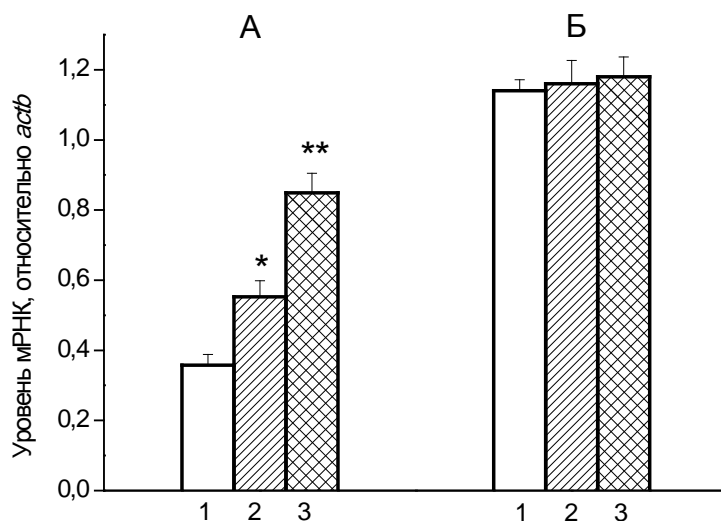
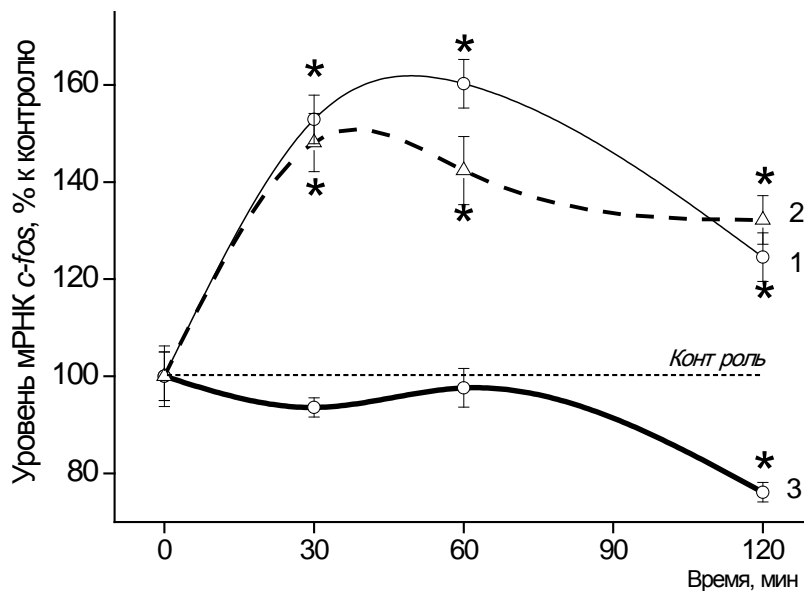


Рис. 9. Уровни мРНК генов *c-fos* (А) и *c-jun* (Б) в гиппокампе (1), префронтальной коре (2) и стволе (3) головного мозга крысят на третьи сутки жизни. * $p<0,01$ по сравнению с гиппокампом; ** $p<0,001$ по сравнению с гиппокампом и префронтальной корой.

Введение дексаметазона меняло уровень экспрессии гена *c-fos* в головном мозге. При этом направление и интенсивность изменений зависели от исследуемого отдела. Так, в передних областях мозга – префронтальной

коре и гиппокампе, гормон индуцировал экспрессию гена *c-fos* уже через 30 минут после введения (Рис. 10А).

А.



Б.

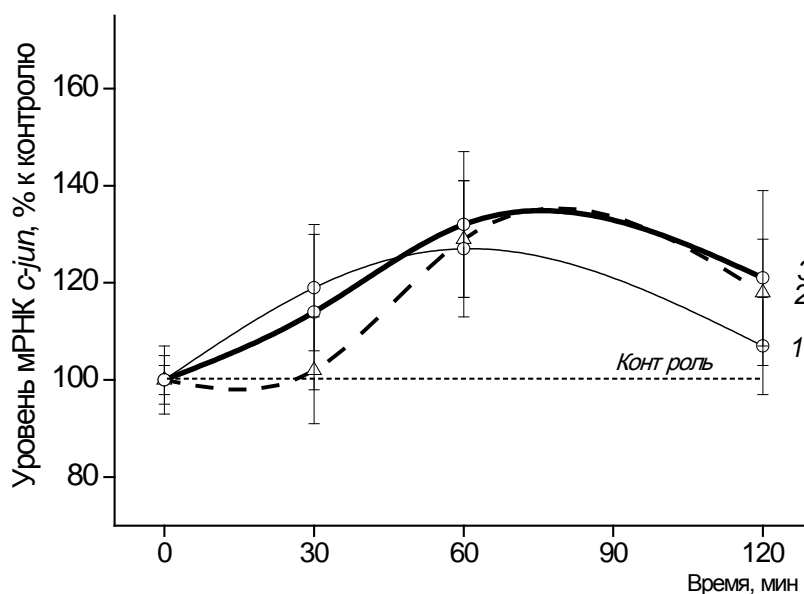


Рис. 10. Уровни мРНК *c-fos* (А) и *c-jun* (Б) под действием дексаметазона в гиппокампе (1), префронтальной коре (2) и стволе (3) головного мозга 3-дневных крысят через 30-60-120 минут после введения гормона. * $p < 0,05$ по сравнению с уровнем животных, получавших физ. раствор.

В гиппокампе гормональная индукция *c-fos* сохранялась на протяжении 60 минут и снижалась через 2 часа после введения, оставаясь повышенной по сравнению с уровнем животных, получавших физиологический раствор (влияние гормона $F(1, 55)=14,88$; $p<0,001$; времени $F(3, 55)=9,05$; $p<0,001$; взаимодействие факторов $F(3, 55)=2,91$; $p<0,05$). В префронтальной коре мозга максимум индукции наблюдался в первые полчаса после введения гормона, незначительно снижаясь к 120 минуте, превышая, как и в гиппокампе, уровень контрольных животных (влияние гормона $F(1, 54)=13,32$; $p<0,001$; времени $F(3, 54)=3,36$; $p<0,05$; взаимодействие факторов $F(3, 54)=2,35$; $p>0,05$).

В стволе мозга выявлен принципиально иной профиль изменения экспрессии гена *c-fos* при действии дексаметазона. Экспрессия гена не повышалась ни через 30, ни через 60 минут после введения гормона, и значительно снижалась через 2 часа после воздействия (влияние гормона $F(1, 54)=1,18$; $p>0,05$; времени $F(3, 54)=9,36$; $p<0,001$; взаимодействие факторов $F(3, 54)=0,43$; $p>0,05$).

Введение дексаметазона не приводило к достоверно значимым изменениям уровня экспрессии гена *c-jun* ни в одной из исследованных областей мозга 3-дневных крысят ни в одной из рассмотренных временных точек ($F=0,02 - 1,03$; $p>0,1$) (Рис. 10Б).

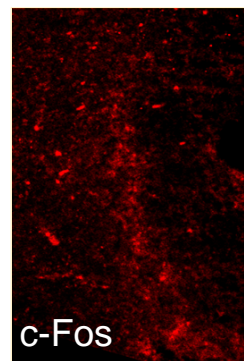
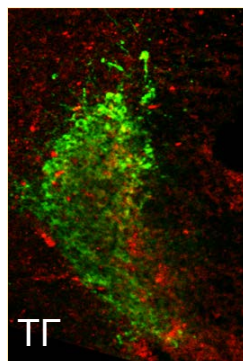
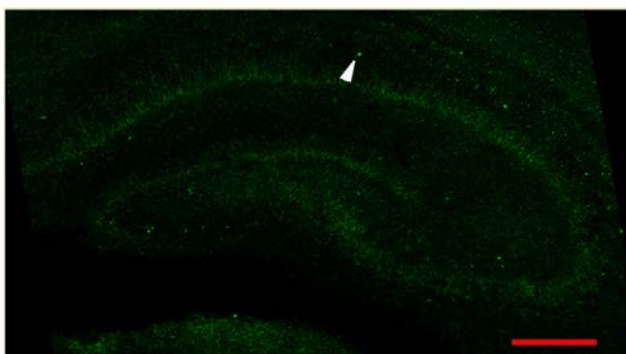
Обнаруженные на уровне мРНК изменения гена *c-fos* согласовались с оценкой экспрессии его белка в отделах мозга методом иммуногистохимического окрашивания со специфическими антителами (Рис. 11А).

Если в гиппокампе выявлено увеличение флуоресценции через час после введения дексаметазона ($F(1, 6)=10,60$; $p<0,05$), то в области синего пятна ствола мозга наблюдалась тенденция к снижению экспрессии *c-Fos* ($F(2, 8)=3,87$; $p<0,1$) (Рис. 11Б).

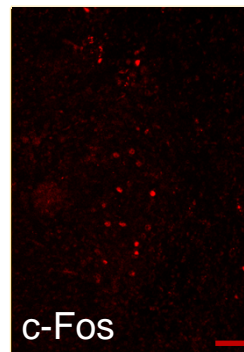
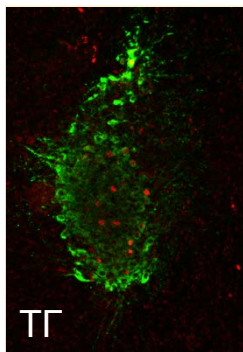
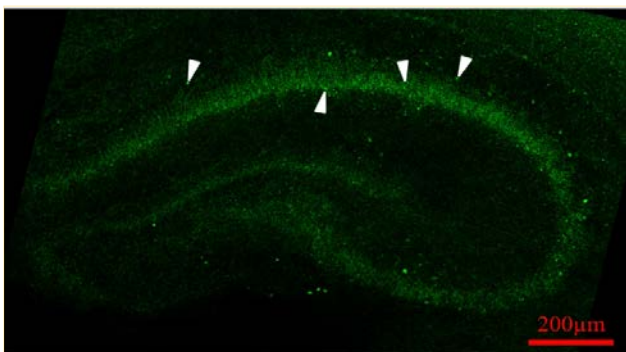
А. Гиппокамп

Синее пятно ствола мозга

Интактные



Дексаметазон



Б. Гиппокамп

Синее пятно ствола мозга

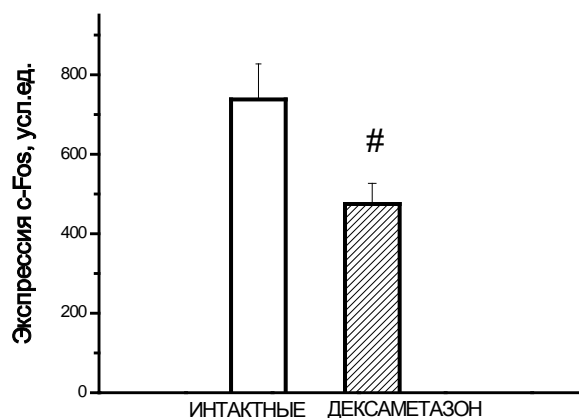
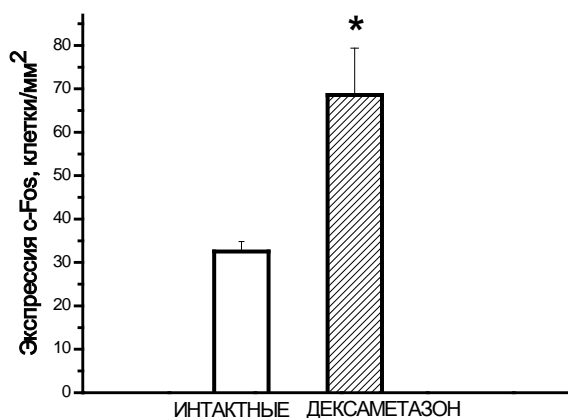


Рис. 11. А. Репрезентативные микрофотографии экспрессии *c-Fos* в клетках гиппокампа и синего пятна ствола мозга 3-дневных крысят через час после введения дексаметазона. **Б.** Экспрессия *c-Fos* под действием дексаметазона в гиппокампе (* $p < 0,05$ относительно контроля) и стволе мозга (# $p < 0,1$ относительно контроля) 3-дневных крысят.

Установленные закономерности изменения экспрессии генов раннего ответа под действием дексаметазона в отделах мозга 3-дневных крысят привели к зависимой от исследуемой области мозга динамике соотношения уровней экспрессии *c-jun* к *c-fos* (Рис.12). Величина соотношения нативной экспрессии мРНК этих белков уменьшалась в ряду: гиппокамп – кора –

ствол. Между всеми отделами мозга были выявлены достоверно различные значения данного показателя у интактных животных ($F(2, 19)=22,93$; $p<0,001$). Введение дексаметазона, существенно не повлияв на соотношение *c-jun/c-fos* во времени в гиппокампе и коре ($p>0.05$), привело к значительному повышению данного показателя в стволе мозга ко второму часу после воздействия ($F(3, 43)=11,81$; $p<0.001$). В результате величина этого соотношения достигала уровня, установленного в гиппокампе.

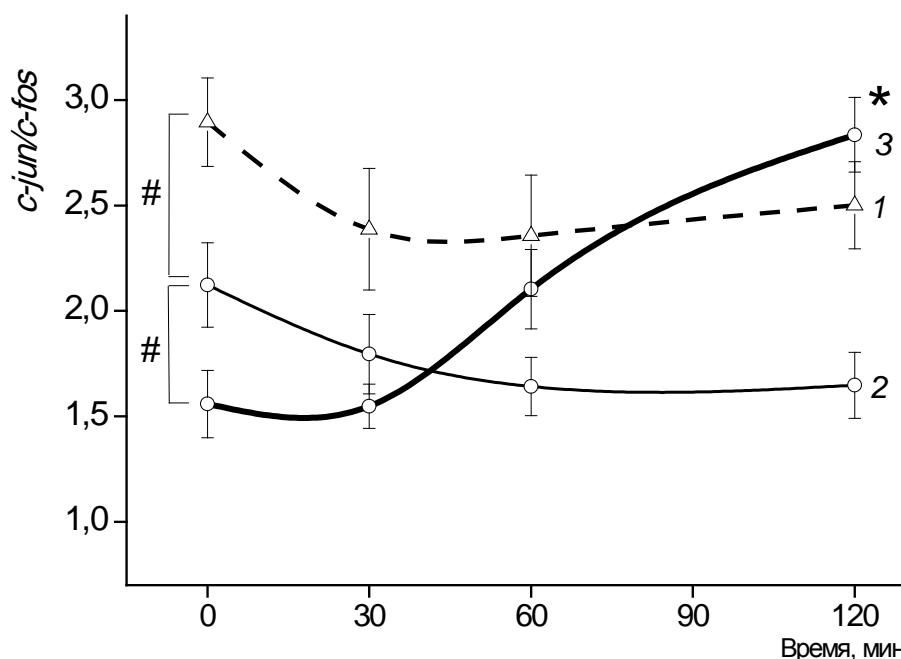


Рис. 12. Соотношение уровней мРНК генов *c-jun* к *c-fos* в гиппокампе (1), префронтальной коре (2) и стволе (3) головного мозга 3-дневных крысят под действием дексаметазона. * $p<0,05$ – по сравнению со стволом мозга интактных крысят (нулевая точка); # $p<0,05$ – между структурами мозга интактных животных.

Такое соотношение транскриптов *c-jun/c-fos* (относительное превышение синтеза Jun) потенциально способно обеспечить индукцию в стволе неонатального мозга генов, содержащих AP-1, за счет белок-белкового взаимодействия рецептора этих гормонов с Jun/Jun гомодимером AP-1 комплекса.

В целом, полученные результаты свидетельствуют, что в период проявления гормональной индукции гена ТГ экспрессия генов и белков семейства Jun выше уровня экспрессии генов и белков семейства Fos как в исходном состоянии, так и при действии дексаметазона. Именно такое соотношение между экспрессией этих белков, согласно неканоническому механизму действия глюкокортикоидов, приводит к индукции гормон-зависимых генов. Смещение в онтогенезе соотношения Jun/Fos, приводящее к увеличению экспрессии Fos на 8 день жизни, может являться основной причиной независимости ТГ от уровня глюкокортикоидов в этом возрасте. Определение степени непосредственного взаимодействия белков Jun и Fos с AP-1 элементом промотора гена ТГ в периоды разной чувствительности к гормону будет являться весомым подтверждением участия неканонического механизма глюкокортикоидов в регуляции участвующего в долговременной гормональной модификации нейрохимических систем мозга – ключевого фермента синтеза катехоламинов.

3.4. Взаимодействие белков AP-1 комплекса с дистальным AP-1 элементом промотора ТГ при введении дексаметазона в раннем постнатальном онтогенезе

Исходя из полученных в нашей работе закономерностей, логично предположить, что взаимодействие белков Jun и Fos с дистальным AP-1 элементом (-5728/-5734) промотора ТГ, основным участником гормональной индукции гена ТГ *in vitro* (Rani et al., 2009), в период глюкокортикоидной индукции (3 день жизни) и вне его (8 день жизни) будет разным. Если на третий день жизни – в период индукции ТГ количество белков Jun превышает число белков Fos, что способствует образованию гомодимеров Jun/Jun, то и взаимодействие белков Jun с AP-1 элементом будет выше, чем на 8 день развития.

Для доказательства предположения был проведен анализ иммунопреципитации хроматина с использованием специфических антител к белкам JunB, c-Fos и GR в пулированных образцах ствола мозга трех- и восьмидневных крысят через шесть часов после введения дексаметазона с последующей ПЦР в реальном времени (ChIP-qPCR) участка промотора гена ТГ, содержавшего дистальный AP-1 элемент.

Взаимодействие антител к глюкокортикоидному рецептору с AP-1 элементом промотора гена ТГ на 3 и 8 дни жизни было сопоставимым и достоверно не различалось между собой ($F(1, 2)=0,53$; $p>0,1$).

При этом связывание антител к JunB на участке промотора ТГ, содержащем дистальный AP-1 элемент, у 3-дневных крысят было достоверно выше, чем на восьмой день жизни ($F(1, 2)=43,07$; $p<0,05$) (Рис.13.). В отличие от этого, взаимодействие антител к c-Fos с этим же участком промотора гена фермента достоверно не достигало статистической значимости у животных разного возраста ($F(1, 2)=2,88$, $p>0,1$).

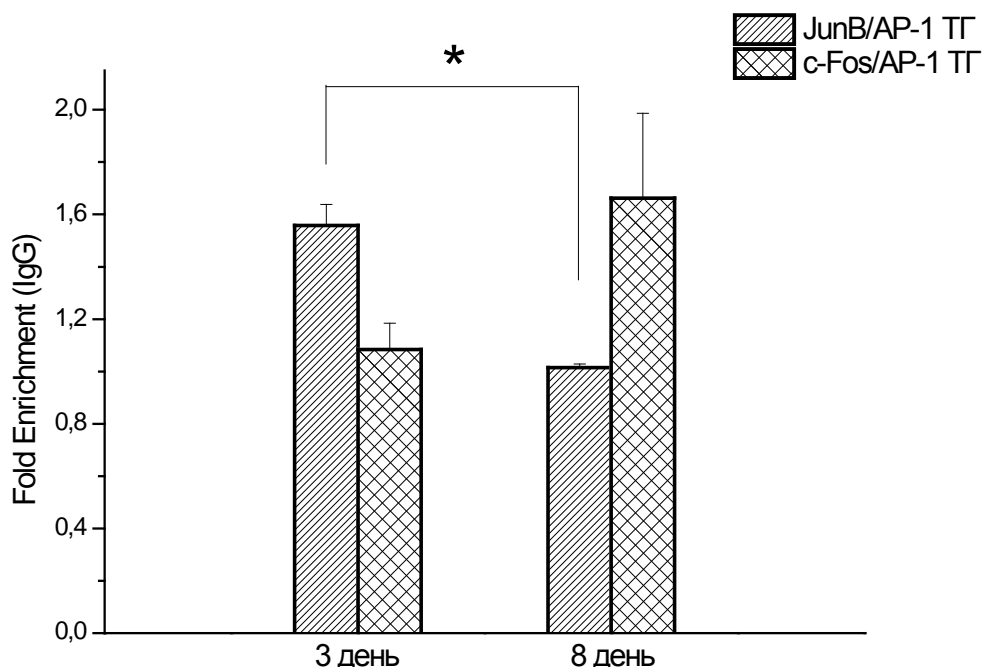


Рис. 13. Связывание белков JunB и c-Fos с дистальным AP-1 элементом промотора ТГ (-5728/-5734) (* $p<0,05$ между животными разного возраста).

Таким образом, глюкокортикоидная индукция тирозингидроксилазы осуществляется через белок-белковое взаимодействие активированного гормона рецептора с транскрипционным фактором AP-1, образованного преобладающими в мозге 3-дневных крысят белками семейства Jun, что способствует связыванию гомодимеров Jun/Jun с AP-1 элементом промотора ТГ, активируя экспрессию гена фермента.

Важность глюкокортикоидной индукции гена ТГ в период внутриутробного развития для долговременной модификации функции норадренергической системы мозга и регулируемых ею форм поведения известна (Дыгало, Калинина, 1993; Калинина, Дыгало, 2013).

Результаты нашей работы расширяют период индуцирующего действия гормона и на первые дни после рождения. Анализ уровня мРНК и белка ТГ после введения дексаметазона на 3 день жизни позволит установить продолжительность глюкокортикоидной индукции ТГ при введении гормона в этот срок развития.

3.5. Экспрессия гена и белка ТГ после введения дексаметазона на третий день жизни

На основании установленной индукции гена ТГ глюкокортикоидами в стволе мозга 3-дневных крысят была прослежена временная динамика активирующего действия дексаметазона. Экспрессия гена ТГ нарастала к шестому часу после введения дексаметазона 3-дневным крысятам (Рис.14), и этот эффект сохранялся через 8, 10 и 24 часа после воздействия ($F(7, 138)=9,92; p<0,001$).

Дексаметазон индуцировал не только мРНК гена ТГ, но и экспрессию белка фермента (Рис.15А). Было установлено, что через шесть часов после введения дексаметазона экспрессия белка ТГ в клетках синего пятна ствола мозга 3-дневных крысят повышалась по сравнению с контрольными группами ($F(2,31) = 5,22, p<0,01$) (Рис.15Б).

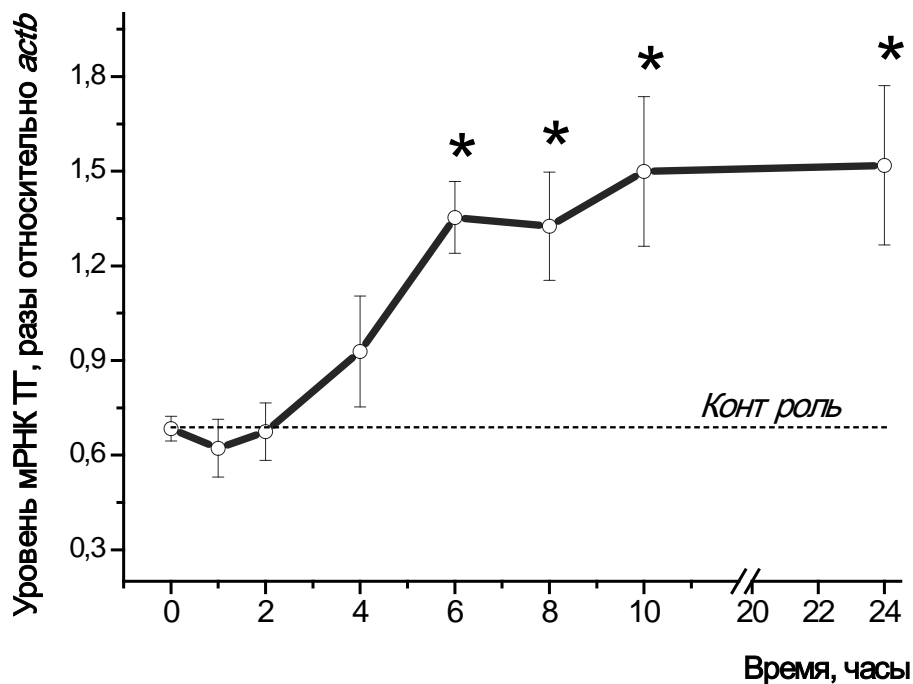
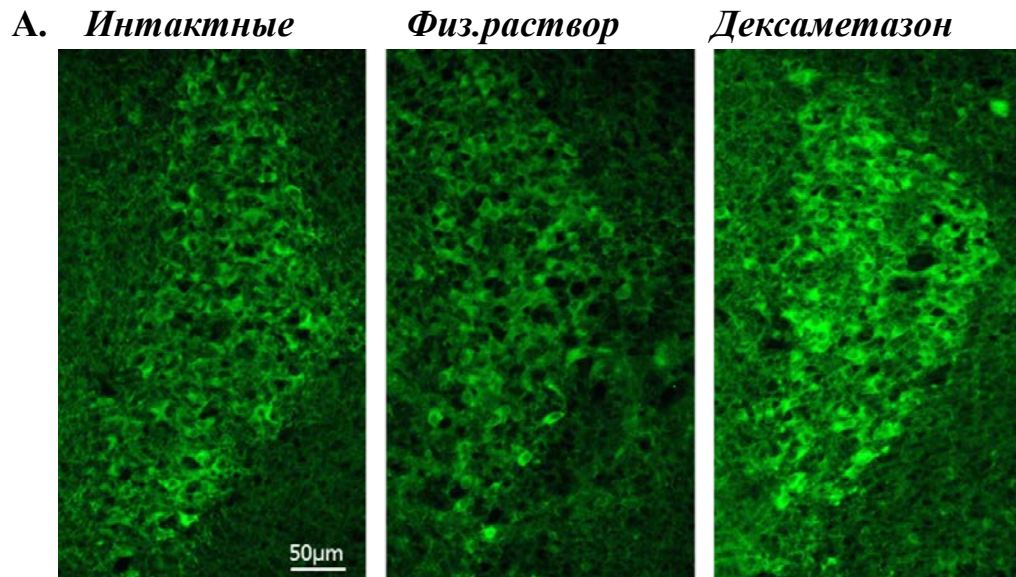


Рис. 14. Экспрессия гена ТГ в стволе мозга 3-дневных крысят после введения дексаметазона (* $p < 0,05$ по сравнению с введением физ.раствора).

Кроме того, введение дексаметазона на третий день жизни привело к изменению экспрессии гена ТГ на протяжении довольно длительного периода онтогенеза. Самцы крыс, перенесшие введение дексаметазона на 3 день жизни, имели достоверно повышенный уровень мРНК ТГ в стволе мозга в ювенильном (25 дней) ($F(1, 14)=10,40, p < 0,01$) и взрослом (70 дней) возрасте ($F(1, 9)=9,31, p < 0,05$) (Рис.16).

Следовательно, гормональная индукция в чувствительный период раннего постнатального онтогенеза способна долговременно модифицировать активность нейромедиаторной системы, обеспечивая изменения в регуляции медиаторной системой функций взрослого организма.



Б.

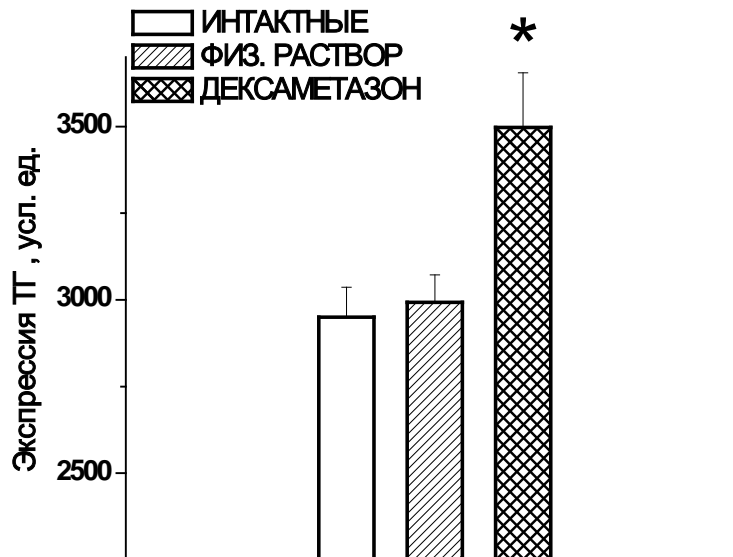


Рис. 15. *А.* Репрезентативные микрофотографии экспрессии ТГ в клетках синего пятна ствола мозга 3-дневных крысят после введения дексаметазона. *Б.* Экспрессия ТГ в стволе мозга 3-дневных крысят после введения дексаметазона (* $p < 0,05$ по сравнению с контрольными группами).

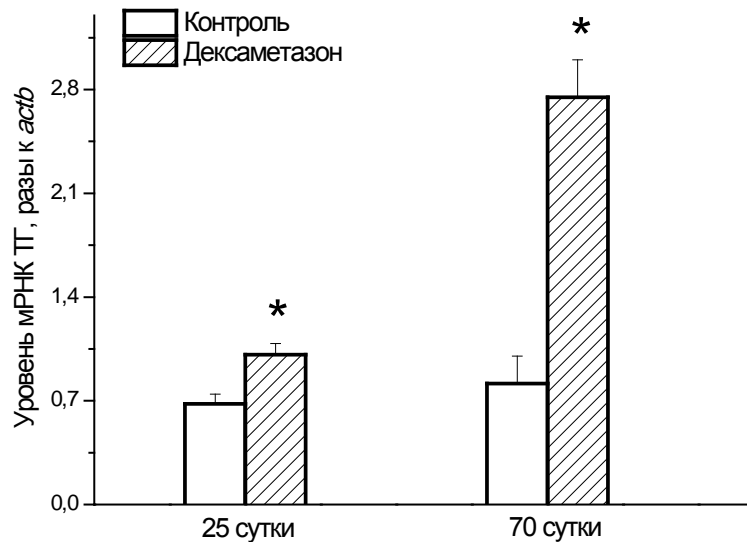


Рис. 16. *Отдаленные последствия введения дексаметазона на третьи сутки жизни на уровень мРНК ТГ в стволе мозга (* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой).*

Таким образом, индукция глюкокортикоидами тирозингидроксилазы в перинатальном онтогенезе осуществляется по неканоническому действию гормонов при участии транскрипционного комплекса AP-1. Функциональные элементы этого комплекса определяют эффект глюкокортикоидов – повышенное число белков Jun и, как следствие, большее образование гомодимеров Jun/Jun, которые связываются с дистальным AP-1 элементом промотора ТГ, приводит к индуцирующему действию глюкокортикоидов. Индукция фермента, определяющего функцию медиаторной системы, в чувствительный период онтогенеза способна изменить активность и функционирование медиаторной системы мозга на протяжении длительного периода развития.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования впервые установлено, что соотношение экспрессии белков Jun/Fos в стволе мозга в перинатальном онтогенезе у крыс коррелирует со способностью глюкокортикоидов индуцировать ключевой фермент синтеза катехоламинов – тирозингидроксилазу (ТГ).

Изменение экспрессии генов, определяющих функциональную активность медиаторных систем, в критический период развития, является основой феномена «онтогенетического программирования», приводящего к долговременному изменению активности этих систем и регулируемых ими функций (Meaney et al., 2007; Harris, Seckl, 2011; Drake et al., 2012). Кратковременное снижение экспрессии гена альфа2А-адренорецепторов, важного регулятора норадренергической нейротрансмиссии, введением антисмысловых нуклеотидов или РНК-интерференцией в первую неделю жизни вызывает изменение функционирования этой нейрохимической системы у взрослых животных и изменение зависимого от нее поведения, связанного со страхом и тревожностью (Shishkina et al., 2004a; Shishkina et al., 2004b; Dygalo et al., 2008). Вместе с тем, не только специфические ген-направленные экспериментальные воздействия, но и более естественные факторы, такие как гормоны стресса, способны изменить экспрессию генов в формирующемся мозге. Так, обнаружена глюкокортикоидная индукция гена ключевого фермента биосинтеза норадреналина – ТГ, в головном мозге плодов крыс *in vivo* (Kalinina et al., 2012). Гормональная индукция экспрессии гена ТГ в стволе мозга плодов проявлялась уже через 6 часов после однократного введения гормона и сохранялась в течение трех суток после двукратного введения глюкокортикоидов. Увеличение уровня матричной РНК сопровождалось ростом активности ТГ и уровня норадреналина в мозге 20- и 21-дневных плодов крыс. Кроме того, введение глюкокортикоидов в период гормональной индукции гена ТГ – последнюю треть пренатального

развития – модифицировало сам ход онтогенеза норадренергической системы мозга. Введение гормона активировало нейромедиаторную систему коры неонатальных крысят и повышало активность ТГ в стволе и коре мозга взрослых животных (Калинина, Дыгало, 2013). Известно, что период позднего пренатального онтогенеза является критическим для формирования норадренергической системы мозга (Калинина, Дыгало, 1991; Kreider et al., 2005; Kalinina et al., 2012), а ТГ определяет ее функциональную активность (Kvetnansky et al., 2009). Именно поэтому воздействия в этот период способны вызывать столь долговременные для медиаторных систем последствия.

Изучение механизма отдаленных последствий действия глюкокортикоидов требует прояснения механизма изменения экспрессии гена ТГ непосредственно после введения гормональных препаратов *in vivo*. Этот вопрос далек от понимания, поскольку все попытки обнаружения гормон-зависимого элемента (GRE) в промоторе гена ТГ, не увенчались успехом (Lewis et al., 1983; Tank et al., 1986; Nagerty et al., 2001). Несмотря на это, факт гормональной индукции ТГ *in vitro* достоверно установлен и многократно подтвержден (Rani et al., 2009; Rani et al., 2013). В этой связи логично предположить активацию иных, не обусловленных взаимодействием глюкокортикоидных рецепторов с GRE, механизмов, прежде всего, так называемого неканонического действия глюкокортикоидов, опосредованного взаимодействием гормон-рецепторного комплекса с другими транскрипционными факторами, такими как AP-1, Oct1, Ets1 и CREB (Sapolsky et al., 2000; Kassel, Herrlich, 2007). Вклад такого механизма в регуляцию транскрипции глюкокортикоидами экспрессии гормон-зависимых генов весьма значителен. Среди генов, меняющих свою экспрессию под действием глюкокортикоидов в культуре феохромоцитомы, 42% не имеют GRE в своих промоторах, и их реакция на гормон обеспечивается взаимодействием с другими транскрипционными факторами (Polman et al., 2012).

Наиболее значимый вклад в неканоническое действие глюкокортикоидов приносят белки, образующие AP-1 комплекс (Biddie et al., 2011). Показано, что наличие AP-1 в непосредственной близости от GRE улучшает доступность хроматина, что облегчает взаимодействие с ним гормон-рецепторного комплекса (Biddie et al., 2011; John et al., 2011). Активация белок-белкового взаимодействия между AP-1 и глюкокортикоидными рецепторами наиболее важна для генов, не имеющих GRE в своем промоторе, к которым относится и ген ТГ. В этом случае, направление изменения транскрипции генов будет определяться компонентным составом белков, образующих AP-1 комплекс. Для генов иммунной системы установлено, что при взаимодействии глюкокортикоидного рецептора с AP-1, образованным гомодимером белков семейства Jun/Jun, транскрипция будет активироваться, а гетеродимером Jun/Fos, напротив, подавляться (Diamond et al., 1990; Angel et al., 2001; Kassel, Herrlich, 2007). В промоторе гена ТГ обнаружено два сайта связывания транскрипционного фактора AP-1, при этом дистальный AP-1 элемент задействован в индукции дексаметазоном экспрессии гена ТГ в культуре феохромоцитомы (Rani et al., 2009). Возможность реализации неканонического механизма действия глюкокортикоидов *in vivo* явилась целью настоящего исследования.

На первом этапе работы мы исследовали перинатальный онтогенез транскриптов генов, образующих AP-1 комплекс - генов семейств Jun (*c-jun*, *junB*, *junD*) и Fos (*c-fos*, *fosB*). Были выявлены специфические закономерности экспрессии для каждого из исследованных транскриптов. Анализ онтогенетических особенностей экспрессии этих белков в стволе мозга проведен впервые. По данным литературы известна лишь грубая оценка активности AP-1 комплекса в постнатальном онтогенезе для целого мозга и эпителиальных клеток глаза (Kaminska et al., 1995; Okada et al., 2003). Обнаруженные в работе особенности экспрессии каждого из транскриптов

позволили провести оценку соотношения уровней нативной экспрессии генов раннего ответа в разные сроки онтогенеза.

Определение соотношения каждого из трех транскриптов семейства Jun (*c-jun*, *junB*, *junD*) относительно каждого из двух транскриптов Fos (*c-fos*, *fosB*) выявила существенное, более чем в 5-20 раз, преобладание экспрессии белков Jun над Fos в стволе мозга 20-21-дневных плодов и 3-дневных крысят по сравнению с 8-дневными животными. Такое соотношение экспрессии белков, образующих AP-1 транскрипционный комплекс, способно обеспечить индукцию гена ТГ, обнаруженную ранее в мозге плодов последнего триместра беременности и объяснить отсутствие гормональной индукции гена фермента в мозге неонатальных 8-дневных животных (Kalinina et al., 2012).

Особый интерес в этой связи представляют собой 3-дневные крысята, у которых обнаружено аналогичное пренатальному онтогенезу соотношение транскриптов Jun/Fos в стволе мозга, а также белков JunB к c-Fos, определенное иммуногистохимически, в области синего пятна ствола мозга, что свидетельствует о большем уровне экспрессии Jun по сравнению с Fos и позволяет предполагать стимулирующее действие гормона и в этот период онтогенеза.

Увеличение уровня мРНК ТГ, динамично нарастающее к 6 часу и остающееся повышенным в течение 24 часов после введения дексаметазона, сопровождалось ростом экспрессии белка фермента в области синего пятна ствола мозга, что подтверждает вовлечение неканонического механизма действия глюкокортикоидов, опосредованного белками AP-1 транскрипционного комплекса, в гормональную регуляцию гена ТГ в раннем онтогенезе. Кроме того, введение дексаметазона на 3 день жизни вызывает долговременное повышение экспрессии гена ТГ, сохраняющееся вплоть до взрослого состояния.

Выявленные закономерности являются подтверждением долговременной модификации медиаторной системы воздействиями в

раннем онтогенезе, в результате изменения экспрессии ключевых генов, определяющих функцию медиаторной системы, к которым относится и ген ТГ (Калинина, Дыгало, 2013; Сухарева et al., 2016,б).

Исследования последних лет предполагают, что одним из возможных механизмов закрепления измененной экспрессии гена на протяжении длительного периода онтогенеза может быть эпигенетическая модификация степени метилирования его промоторной области. Метилированные участки ДНК становятся недоступными для действия транскрипционных факторов, в отличие от деметилированных (Li, 2002; Hashimshony et al., 2003). Уровень метилирования ДНК устанавливается в эмбриогенезе (Reik et al., 2001), но под действием внешних факторов активность ацетилаз гистонов потенциально может меняться, что делает ДНК доступной для действия демитилирующих агентов и, как следствие, приводит к повышению уровня транскрипции генов (Cervoni, Szyf, 2001). Так, одним из возможных механизмов повышения экспрессии рецепторов глюкокортикоидов в гиппокампе взрослых животных после неонатальных воздействий рассматривается снижение уровня метилирования одного из некодирующих экзонов промотора гена рецептора, взаимодействующего с NGF, что активирует экспрессию рецептора на протяжении онтогенеза (Meaney, Szyf, 2005; Szyf et al., 2005; Weaver et al., 2005; Weaver et al., 2006). В промоторной области гена ТГ крысы и человека также обнаружены области метилирования, зависящие от активности демитилирующих агентов и определяющие уровень транскрипции гена в разных тканях (Okuse et al., 1997; Aranyi et al., 2005). Зависимость степени метилирования промотора гена фермента от внешних воздействий требует дальнейшего исследования. Недавно было обнаружено возраст-специфическое гиперметилирование промотора гена ТГ в дофаминергических нейронах мозга (Niwa et al., 2013; 2016).

Исследование влияния глюкокортикоидов на уровень экспрессии гена и белка ТГ в мозге крысят на 3 день жизни позволило верифицировать

гипотезу о возможности неканонического механизма действия глюкокортикоидов для гормональной регуляции гена ТГ *in vivo*. Обнаруженная в работе индукция гена ТГ в стволе мозга 3-дневных крысят как после введения синтетического глюкокортикоида - дексаметазона, так и природного – гидрокортизона являются убедительным подтверждением нашей гипотезы. Более того, сопоставимая индукция гена ТГ после введения этих гормонов, один из которых является селективным агонистом глюкокортикоидных рецепторов (дексаметазон), а другой взаимодействует еще и с минералокортикоидными рецепторами (гидрокортизон), указывает на приоритетное вовлечение именно глюкокортикоидных рецепторов в гормональную активацию ТГ. Таким образом, чувствительность ТГ к индукции глюкокортикоидами не ограничена исключительно пренатальным периодом онтогенеза и сохраняется в первые дни жизни, что расширяет гормон-зависимый период регуляции экспрессии нейрогена, детерминирующего активность медиаторной системы (Kvetnansky et al., 2009). Отсутствие зависимости экспрессии ТГ от уровня стрессорных гормонов на 8 день жизни, в так называемый гипореактивный период, который у крыс наблюдается с 4 по 14 дни развития (Schapiro et al., 1962) может быть онтогенетически целесообразно. Несмотря на способность повышения эндогенного уровня кортикостероидов в этот период после достаточно сильных стрессорных воздействий, таких как суточная изоляция от матери (Schmidt et al., 2004), функциональная активность гипоталамо-надпочечниковой системы в этот период значительно ослаблена (Levine, 1994), а уровень гормонов в крови в первые две недели постнатального развития крыс минимален (Korte, 2001).

В нашей работе впервые показано, что базальная экспрессия генов раннего ответа *c-fos* и *c-jun* в отделах неонатального мозга 3-дневных животных, а также в ответ на введение дексаметазона, имеет ярко выраженные региональные особенности.

Гены белков раннего ответа, формирующих транскрипционный комплекс AP-1, в мозге взрослых животных в состоянии покоя практически не "работают", но начинают экспрессироваться практически мгновенно при воздействии самых разных стимулов – от стресса до процесса формирования следа памяти (Healy et al., 2013), что и позволяет рассматривать их, действительно, как показатели активности клеток, в том числе, – нервной системы. Результаты нашего исследования свидетельствуют, что в период раннего онтогенеза наблюдается уверенно детектируемый уровень базальной экспрессии генов *c-fos* и *c-jun* в мозге трехсуточных крысят. Кроме того, интенсивность экспрессии гена *c-fos* не одинакова в передних и задних отделах мозга (Сухарева et al., 2016a). Более высокий уровень мРНК *c-fos* в переднем и среднем мозге животных первых десяти дней жизни, по сравнению с взрослыми животными, наблюдали и другие исследователи (Parma et al., 1991). С возрастом происходит дальнейшее снижение уровня экспрессии гена *c-fos* (Salehi et al., 1999). Количественно различный уровень синтеза белка c-Fos наблюдается даже в отдельных ядрах неонатального гипоталамуса крыс (Olesen, Auger, 2005). Межрегиональные различия в уровне базальной экспрессии гена *c-fos* трехсуточных крысят, по-видимому, отражают, главным образом, отличия в уровнях активности нейронов в исследуемых областях неонатального мозга. Причины обнаруженных межструктурных различий остаются до конца не ясными. Повышение экспрессии гена *c-fos* в стволе мозга неонатальных крысят может, например, являться следствием высокой активности процессов нейроонтогенеза в этом отделе мозга (Dygalo et al., 2008), которые сопровождаются, в частности, повышением экспрессии гена основного медиатора апоптоза – *casp3* (Калинина et al., 2001).

Известно, что индукция генов раннего ответа после воздействия стимула происходит в течение нескольких минут, при этом синтеза белка *de novo* не происходит (O'Donnell et al., 2012). Ингибиторы трансляции не оказывают влияния на синтез их белков (Healy et al., 2013). Как

свидетельствуют многочисленные данные, уровень экспрессии генов раннего ответа повышается в интервале от 30 до 60 мин после действия стимула, затем, в следующие полтора часа, наблюдается возвращение к базальному уровню экспрессии (Nealy et al., 2013). Исходя из этого, в нашей работе экспрессию генов *c-fos* и *c-jun* исследовали через 30, 60 и 120 мин после гормонального воздействия в трех областях головного мозга – гиппокампе, префронтальной коре и стволе.

Динамика экспрессии гена *c-fos* в передних областях мозга – гиппокампе и префронтальной коре – свидетельствует об активации нейронов этих структур уже через 30 мин после введения дексаметазона (Lanshakov et al., 2016). Индукция гена *c-fos* сохраняется на высоком уровне в течение часа, оставаясь далее, хоть и на несколько ослабленном, но достоверно более высоком уровне, чем у контрольных животных, и через 2 ч после воздействия. Эти результаты подтверждают данные литературы о повышении уровня мРНК гена *c-fos* под действием дексаметазона в целом мозге плодов крыс (Slotkin et al., 1998), а также под действием кортикостерона в гиппокампе и коре взрослых животных (Szakacs et al., 2010).

Действие глюкокортикоидов на экспрессию гена *c-fos*, однако, не всегда однозначно. Снижение уровня эндогенных кортикостероидов в результате адреналэктомии также повышает уровень мРНК гена *c-fos* в мозге крыс (Brown, Sawchenko, 1997), а введение кортикостерона, на фоне адреналэктомии, приводит к снижению экспрессии *c-fos*, в частности, в гиппокампе (Hansson, Fuxe, 2008). Использование дексаметазона перед иммобилизацией животных снижает экспрессию *c-fos*, вызванную стрессом, в сомато-сенсорной коре, паравентрикулярном ядре гипоталамуса и в синем пятне ствола мозга (de Medeiros et al., 2005).

В нашей работе показано, что уровень экспрессии *c-fos* в стволе головного мозга через 2 ч после введения гормона понижается. В мозге взрослых крыс понижение экспрессии *c-fos* наблюдается после хронического

введения высокой дозы кортикостерона (Skorzewska et al., 2006). Причиной разнонаправленного влияния глюкокортикоидов на уровень мРНК *c-fos* в передних и задних отделах мозга может быть активация гормоном как повышающих, так и понижающих путей регуляции экспрессии этого гена. Действительно, глюкокортикоиды увеличивают разрядную активность нейронов передних отделов головного мозга, таких как кора и гиппокамп (Karst, Joels, 2005), что приводит к повышению экспрессии *c-fos* (van Hasselt et al., 2012). В тоже время дексаметазон подавляет активность каскада ERK/MAPK, стимулирующего экспрессию *c-fos* (Kassel et al., 2001). Высокая активность этого молекулярного каскада в стволе неонатального мозга (Dygalo et al., 2008) обеспечивает, по-видимому, повышенный, по сравнению с корой и гиппокампом, базальный уровень мРНК *c-fos* в этом отделе мозга. При угнетении гормоном активности каскада ERK/MAPK следует ожидать снижения экспрессии *c-fos*, что, очевидно, и происходит в наших опытах через 120 мин после введения дексаметазона в области ствола мозга. Однако пути влияния глюкокортикоидов на экспрессию генов раннего ответа остаются пока неясными и нуждаются в дальнейшем исследовании.

Согласно нашим данным, экспрессия другого гена раннего ответа – *c-jun* – в отделах неонатального головного мозга существенно не изменяется под воздействием применявшейся в работе дозы дексаметазона. Следует отметить, что в опытах на культурах клеток феохромоцитомы и фибробластов дексаметазон подавляет экспрессию гена *c-jun* уже в первые 30 мин после воздействия (Wei et al., 1998; Speksnijder et al., 2012). Это может свидетельствовать об активации гормоном, по-видимому, специфических для каждого типа клеток путей регуляции его экспрессии. Следует отметить, что регуляция синтеза каждого из белков семейств Fos и Jun также имеет свои особенности. Мы не обнаружили взаимосвязи между изменениями мРНК *c-fos* и *c-jun* и введением дексаметазона; такой корреляции не наблюдается и при действии других стимулов (Briski et al., 1997; Kovacs, 2008; Shah, Tyagi, 2013).

Важным результатом нашей работы является впервые установленное изменение соотношения уровней мРНК *c-jun/c-fos* в стволе головного мозга крысят под действием гормона. Соотношение уровней синтеза белков семейств Jun/Fos, образующих транскрипционный комплекс AP-1, важно для определения направления изменения экспрессии регулируемых им транскриптов, в том числе, и при действии глюкокортикоидов (Teurich, Angel, 1995; Kassel, Herrlich, 2007). Соотношения между уровнями базальной экспрессии *c-jun* и *c-fos* достоверно различаются в разных областях мозга трехсуточных крысят. Для ствола мозга характерно минимальное значение этого показателя, по сравнению с корой и гиппокампом, а для последнего – максимальное значение соотношения транскриптов. Введение дексаметазона не влияет на соотношение транскриптов *c-jun/c-fos* в передних областях мозга в исследованном временном интервале, но в стволе мозга через 2 ч после введения гормона это соотношение двукратно увеличивается и, в результате, достигает уровня, характерного для гиппокампа. Именно такое соотношение транскриптов *c-jun/c-fos* (относительное превышение синтеза Jun) потенциально способно обеспечить индукцию в стволе неонатального мозга экспрессии генов, содержащих AP-1, каким является и ген ТГ, в случае активации неканонического механизма действия глюкокортикоидов, за счет белок-белкового взаимодействия рецептора этих гормонов с Jun/Jun гомодимером комплекса AP-1 (Teurich, Angel, 1995; Kassel, Herrlich, 2007). Следовательно, введение гормона приводит к дополнительному смещению соотношения белков, образующих AP-1 комплекс, в сторону преобладания белков семейства Jun.

Исходя из установленного в работе преобладания белков семейства Jun над Fos в период проявления гормональной индукции гена ТГ в стволе мозга, можно ожидать и большее количество участков промотора гена ТГ, содержащих AP-1 элемент, взаимодействующих с белками Jun. А вне

периода глюкокортикоидной индукции можно ожидать преобладание участков промотора гена ТГ, связанных с белками Fos (Рис. 17).

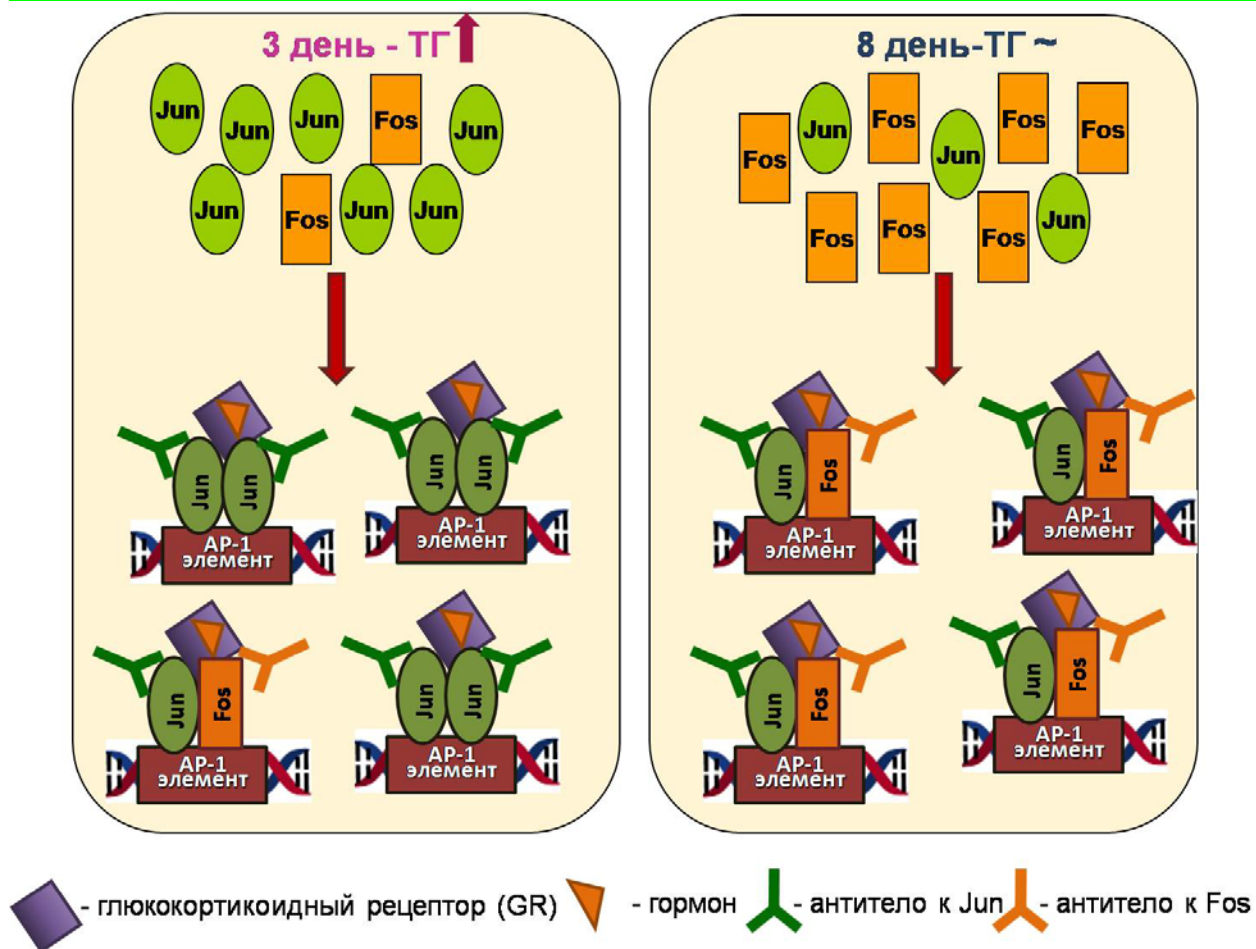


Рис. 17. Схема возраст-зависимой регуляции глюкокортикоидами тирозингидроксилазы мозга в результате взаимодействия рецептора гормона с AP-1 элементом промотора гена фермента, выявляемая методом иммунопреципитации хроматина.

Подтверждением этого предположения являются результаты иммунопреципитации хроматина со специфическими антителами к белкам JunB и c-Fos, проведенной на пулированных образцах стволов мозга животных разного возраста, различающихся по чувствительности к глюкокортикоидам.

Нами впервые выявлено, что на 3 день жизни после введения дексаметазона число участков промотора ТГ дистального AP-1 комплекса в стволе головного мозга, образованным гомодимером Jun/Jun, больше, чем на 8 день развития – период, когда число белков Fos превосходит количество

белков Jun. Следовательно, способность глюкокортикоидов индуцировать экспрессию ТГ в раннем онтогенезе определяется таким соотношением экспрессии белков Jun и Fos, которое запускает транскрипцию зависимых генов, согласно неканоническому механизму действия глюкокортикоидов (Teurich, Angel, 1995; Kassel, Herrlich, 2007; Калинина и др., 2016). Несмотря на обнаружение глюкокортикоидной индукции ТГ более 30 лет назад (Lewis et al., 1983), механизмы, с помощью которых глюкокортикоиды опосредуют такое действие, оставались неизвестными. Лишь в 2009 году в высоко гомологичной области промоторов гена ТГ мыши и крысы (примерно -5700 пп) был обнаружен AP-1 сайт, который задействован в индукции дексаметазоном гена ТГ в культуре феохромоцитомы (Rani et al., 2009).

Полученные в работе результаты являются впервые установленным прямым доказательством функционирования неканонического механизма действия глюкокортикоидов *in vivo* и показано его участие в онтогенетической регуляции гормоном экспрессии нейрогена, определяющего активность медиаторной системы.

Обобщая результаты работы можно заключить, что индуцирующее действие глюкокортикоидов на экспрессию ключевого фермента синтеза норадреналина – ТГ определяется соотношением нативной экспрессии генов Jun и Fos, образующих AP-1 комплекс, в чувствительные периоды раннего онтогенеза. Неканонический механизм действия гормона, опосредованный AP-1 транскрипционным комплексом, участвует в гормональной регуляции генов, не имеющих глюкокортикоид-зависимых элементов в своем промоторе, что показано *in vivo* на примере гена ТГ. Последствия гормонального воздействия в «глюкокортикоид-чувствительный» период перинатального онтогенеза оставляют длительный след на экспрессию ТГ - ключевого фермента синтеза катехоламиновых нейротрансмиттеров и, тем самым, на нейрохимию головного мозга в последующие периоды жизни.

Выводы

1. Уровни мРНК генов семейств Jun (*c-jun*, *junB*, *junD*) и Fos (*c-fos*, *fosB*) существенно изменяются в стволе головного мозга в ходе перинатального онтогенеза. Для периода чувствительности ТГ мозга плодов крыс к глюкокортикоидной индукции характерно существенное превышение количества транскриптов Jun над Fos. Похожее соотношение экспрессии Jun и Fos выявлено в стволе мозга 3-дневных, но не 8-дневных крысят. В головном мозге последних, в отличие от плодов, экспрессия ТГ не индуцируется глюкокортикоидами.

2. Действие дексаметазона на соотношение экспрессии генов раннего ответа (Jun и Fos) зависит от отдела неонатального мозга. У 3-дневных крысят гормон повышает уровень мРНК *c-fos* в передних областях мозга – коре и гиппокампе, но снижает количество транскриптов в стволе мозга, что согласуется с изменением экспрессии белка c-Fos. В результате действия гормона соотношение транскриптов *c-jun/c-fos* в стволе мозга двукратно увеличивается.

3. Глюкокортикоид (дексаметазон или гидрокортизон) введенный 3-дневным крысятам, имеющим аналогичное мозгу плодов преобладание транскриптов и белков семейства Jun над Fos, индуцирует экспрессию гена ТГ в стволе головного мозга. Повышение уровня мРНК ТГ развивается к 6 часу после введения дексаметазона, что согласуется с ростом белка фермента к этому времени, и остается повышенным через 8, 10 и 24 часа после гормонального воздействия. Гормональная индукция гена ТГ на 3-ий день жизни вызывает долговременное изменение экспрессии этого гена. Уровни мРНК ТГ остаются повышенными в стволе мозга ювенильных – 25- дневных и взрослых – 70-дневных животных.

4. Взаимодействие белка JunB с дистальным AP-1 элементом промотора гена ТГ в период выявленной глюкокортикоидной индукции гена

ТГ на 3 день жизни выше, чем в период нечувствительности экспрессии гена фермента к гормону у 8-дневных животных.

5. В целом, зависимость от возраста индукция глюкокортикоидами ТГ в перинатальном головном мозге ассоциирована с преобладанием количества транскриптов и белков Jun над Fos, а также большей степенью взаимодействия белка JunB с AP-1 элементом промотора гена ТГ, являющимися компонентами неканонического механизма действия гормона, активирующего экспрессию генов. Важно, что последствия гормонального воздействия в «глюкокортикоид-чувствительный» период перинатального онтогенеза оставляют длительный след на экспрессию ТГ - ключевого фермента синтеза катехоламиновых нейротрансмиттеров и, тем самым, на нейрохимию головного мозга в последующие периоды жизни.

Библиография

1. Дыгало Н.Н. Приобретение стероидами гормональных функций в эволюции и их эффекты в раннем онтогенезе // Успехи совр. биологии. — 1993. № 113. — С. 162-175.
2. Дыгало Н.Н., Калинина Т.С. Эффекты взаимодействия генотипа и глюкокортикоидов на активность тирозингидроксилазы мозга плодов крыс // Генетика. — 1993. № 29. — С. 1453-1459.
3. Калинина Т.С., Дыгало Н.Н. Онтогенез мозга и пресинаптических маркеров катехоламиновой системы крыс // Сиб. биол. журн. — 1991. № 2. — С. 61-65.
4. Калинина Т.С., Баннова А.В., Дыгало Н.Н. Уровень мРНК фермента апоптоза - каспазы-3 в стволе и коре головного мозга крыс в постнатальном онтогенезе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2001. № 8. — С. 161.
5. Калинина Т.С., Дыгало Н.Н. Развитие норадренергической системы мозга крыс после пренатального воздействия кортикостероном // Известия РАН. Серия биологическая. — 2013. № 4. — С. 447-452.
6. Калинина Т.С., Сухарева Е.В., Дыгало Н.Н. Канонический и неканонический механизмы действия глюкокортикоидных гормонов стресса. // Успехи физиологических наук. — 2016. № 3. — С. 59-69.
7. Сухарева Е.В., Дыгало Н.Н., Калинина Т.С. Влияние дексаметазона на экспрессию генов раннего ответа c-fos и c-jun в различных отделах неонатального мозга // Молекулярная биология. — 2016а. № 2. — С. 266-271.
8. Сухарева Е.В., Калинина Т.С., Булыгина В.В., Дыгало Н.Н. Тирозингидроксилаза мозга и ее регуляция глюкокортикоидами // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2016б. № 2. — С. 212-219.

9. Турпаев К.Т. Роль фактора транскрипции AP-1 в интеграции внутриклеточных сигнальных систем // Молекулярная биология. — 2006. № 40. — С. 945-961.
10. Acconcia F., Ascenzi P., Bocedi A., Spisni E., Tomasi V., Trentalance A., Visca P., Marino M. Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol // Molecular biology of the cell. — 2005. — Vol. 16. — P. 231-237.
11. Alberini C.M. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity // Physiological reviews. — 2009. — Vol. 89. — P. 121-145.
12. Altmann C.R., Brivanlou A.H. Neural patterning in the vertebrate embryo // International review of cytology. — 2001. — Vol. 203. — P. 447-482.
13. Angel P., Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation // Biochimica et biophysica acta. — 1991. — Vol. 1072. — P. 129-157.
14. Angel P., Szabowski A., Schorpp-Kistner M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology // Oncogene. — 2001. — Vol. 20. — P. 2413-2423.
15. Arányi T., Faucheux B.A., Khalfallah O., Vodjdani G., Biguet N.F., Mallet J., Meloni R. The tissue-specific methylation of the human tyrosine hydroxylase gene reveals new regulatory elements in the first exon // J Neurochem. — 2005. — Vol. 94. — P. 129-139.
16. Aronsson M., Fuxe K., Dong Y., Agnati L.F., Okret S., Gustafsson J.A. Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1988. — Vol. 85. — P. 9331-9335.
17. Bademci G., Vance J.M., Wang L. Tyrosine hydroxylase gene: another piece of the genetic puzzle of Parkinson's disease // CNS & neurological disorders drug targets. — 2012. — Vol. 11. — P. 469-481.
18. Bakker J.M., Schmidt E.D., Kroes H., Kavelaars A., Heijnen C.J., Tilders F.J., van Rees E.P. Effects of short-term dexamethasone treatment during

pregnancy on the development of the immune system and the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the rat // *Journal of neuroimmunology*. — 1995. — Vol. 63. — P. 183-191.

19. Bamberger C.M., Schulte H.M., Chrousos G.P. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids // *Endocrine reviews*. — 1996. — Vol. 17. — P. 245-261.

20. Barbazanges A., Piazza P.V., Le Moal M., Maccari S. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. — 1996. — Vol. 16. — P. 3943-3949.

21. Barella L.F., de Oliveira J.C., Mathias P.C. Pancreatic islets and their roles in metabolic programming // *Nutrition*. — 2014. — Vol. 30. — P. 373-379.

22. Barker D.J. In utero programming of chronic disease // *Clin Sci (Lond)*. — 1998. — Vol. 95. — P. 115-128.

23. Barsegyan A., Mackenzie S.M., Kurose B.D., McGaugh J.L., Roozendaal B. Glucocorticoids in the prefrontal cortex enhance memory consolidation and impair working memory by a common neural mechanism // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2010. — Vol. 107. — P. 16655-16660.

24. Barth K.A., Kishimoto Y., Rohr K.B., Seydler C., Schulte-Merker S., Wilson S.W. Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate // *Development*. — 1999. — Vol. 126. — P. 4977-4987.

25. Basbous J., Jariel-Encontre I., Gomard T., Bossis G., Piechaczyk M. Ubiquitin-independent- versus ubiquitin-dependent proteasomal degradation of the c-Fos and Fra-1 transcription factors: is there a unique answer? // *Biochimie*. — 2008. — Vol. 90. — P. 296-305.

26. Beck I.M., Vanden Berghe W., Vermeulen L., Yamamoto K.R., Haegeman G., De Bosscher K. Crosstalk in inflammation: the interplay of

glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases // *Endocrine reviews*. — 2009. — Vol. 30. — P. 830-882.

27. Beger C., Gerdes K., Lauten M., Tissing W.J., Fernandez-Munoz I., Schrappe M., Welte K. Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach // *British journal of haematology*. — 2003. — Vol. 122. — P. 245-252.

28. Biddie S.C., Conway-Campbell B.L., Lightman S.L. Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease // *Rheumatology (Oxford)*. — 2012. — Vol. 51. — P. 403-412.

29. Biddie S.C., John S., Sabo P.J., Thurman R.E., Johnson T.A., Schiltz R.L., Miranda T.B., Sung M.H., Trump S., Lightman S.L., Vinson C., Stamatoyannopoulos J.A., Hager G.L. Transcription factor AP1 potentiates chromatin accessibility and glucocorticoid receptor binding // *Molecular cell*. — 2011. — Vol. 43. — P. 145-155.

30. Bledsoe R.K., Montana V.G., Stanley T.B., Delves C.J., Apolito C.J., McKee D.D., Consler T.G., Parks D.J., Stewart E.L., Willson T.M., Lambert M.H., Moore J.T., Pearce K.H., Xu H.E. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition // *Cell*. — 2002. — Vol. 110. — P. 93-105.

31. Bohmann D., Bos T.J., Admon A., Nishimura T., Vogt P.K., Tjian R. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1 // *Science*. — 1987. — Vol. 238. — P. 1386-1392.

32. Bohn M.C., Dean D., Hussain S., Giuliano R. Development of mRNAs for glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in rat hippocampus // *Brain research. Developmental brain research*. — 1994. — Vol. 77. — P. 157-162.

33. Bolt R.J., van Weissenbruch M.M., Lafeber H.N., Delemarre-van de Waal H.A. Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant // *Pediatric pulmonology*. — 2001. — Vol. 32. — P. 76-91.

34. Bonnin A., de Miguel R., Rodriguez-Manzanque J.C., Fernandez-Ruiz J.J., Santos A., Ramos J.A. Changes in tyrosine hydroxylase gene expression in mesencephalic catecholaminergic neurons of immature and adult male rats perinatally exposed to cannabinoids // *Brain research. Developmental brain research.* — 1994. — Vol. 81. — P. 147-150.
35. Bornstein S.R., Tian H., Haidan A., Bottner A., Hiroi N., Eisenhofer G., McCann S.M., Chrousos G.P., Roffler-Tarlov S. Deletion of tyrosine hydroxylase gene reveals functional interdependence of adrenocortical and chromaffin cell system in vivo // *P Natl Acad Sci USA.* — 2000. — Vol. 97. — P. 14742-14747.
36. Bos T.J., Bohmann D., Tsuchie H., Tjian R., Vogt P.K. v-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1 // *Cell.* — 1988. — Vol. 52. — P. 705-712.
37. Boschi N.M., Takeuchi K., Sterling C., Tank A.W. Differential Expression of Polycytosine-Binding Protein Isoforms in Adrenal Gland, Locus Coeruleus and Midbrain // *Neuroscience.* — 2015. — Vol. 286. — P. 1-12.
38. Breslin M.B., Geng C.D., Vedeckis W.V. Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids // *Mol Endocrinol.* — 2001. — Vol. 15. — P. 1381-1395.
39. Briski K.P., DiPasquale B.M., Gillen E. Induction of immediate-early gene expression in preoptic and hypothalamic neurons by the glucocorticoid receptor agonist, dexamethasone // *Brain research.* — 1997. — Vol. 768. — P. 185-196.
40. Brown E.R., Sawchenko P.E. Hypophysiotropic CRF neurons display a sustained immediate-early gene response to chronic stress but not to adrenalectomy // *Journal of neuroendocrinology.* — 1997. — Vol. 9. — P. 307-316.
41. Brown J.R., Ye H., Bronson R.T., Dikkes P., Greenberg M.E. A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fosB // *Cell.* — 1996. — Vol. 86. — P. 297-309.

42. Brunton P.J., Russell J.A. Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex-specific effects // *Journal of neuroendocrinology*. — 2010. — Vol. 22. — P. 258-271.
43. Burlet G., Fernet B., Blanchard S., Angel E., Tankosic P., Maccari S., Burlet A. Antenatal glucocorticoids blunt the functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of neonates and disturb some behaviors in juveniles // *Neuroscience*. — 2005. — Vol. 133. — P. 221-230.
44. Candy J., Collet C. Two tyrosine hydroxylase genes in teleosts // *Biochimica et biophysica acta*. — 2005. — Vol. 1727. — P. 35-44.
45. Carson R.P., Robertson D. Genetic manipulation of noradrenergic neurons // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. — 2002. — Vol. 301. — P. 410-417.
46. Cervoni N., Szyf M. Demethylase activity is directed by histone acetylation // *J Biol Chem*. — 2001. — 276. — P. 40778-40787.
47. Chambliss K.L., Yuhanna I.S., Mineo C., Liu P., German Z., Sherman T.S., Mendelsohn M.E., Anderson R.G., Shaul P.W. Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae // *Circulation research*. — 2000. — Vol. 87. — P. E44-52.
48. Champagne D.L., de Kloet E.R., Joels M. Fundamental aspects of the impact of glucocorticoids on the (immature) brain // *Seminars in fetal & neonatal medicine*. — 2009. — Vol. 14. — P. 136-142.
49. Chandler V.L., Maler B.A., Yamamoto K.R. DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo // *Cell*. — 1983. — Vol. 33. — P. 489-499.
50. Chen J., Kelz M.B., Hope B.T., Nakabeppu Y., Nestler E.J. Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. — 1997. — Vol. 17. — P. 4933-4941.

51. Chinenov Y., Kerppola T.K. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity // *Oncogene*. — 2001. — Vol. 20. — P. 2438-2452.

52. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analytical biochemistry*. — 1987. — Vol. 162. — P. 156-159.

53. Choy M.K., Movassagh M., Goh H.G., Bennett M.R., Down T.A., Foo R.S. Genome-wide conserved consensus transcription factor binding motifs are hyper-methylated // *BMC genomics*. — 2010. — Vol. 11. — P. 519.

54. Cintra A., Solfrini V., Bunnemann B., Okret S., Bortolotti F., Gustafsson J.A., Fuxe K. Prenatal development of glucocorticoid receptor gene expression and immunoreactivity in the rat brain and pituitary gland: a combined in situ hybridization and immunocytochemical analysis // *Neuroendocrinology*. — 1993. — Vol. 57. — P. 1133-1147.

55. Cochran B.H., Zullo J., Verma I.M., Stiles C.D. Expression of the c-fos gene and of an fos-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor // *Science*. — 1984. — Vol. 226. — P. 1080-1082.

56. Cole T.J. Glucocorticoid action and the development of selective glucocorticoid receptor ligands // *Biotechnology annual review*. — 2006. — Vol. 12. — P. 269-300.

57. Cole T.J., Blendy J.A., Monaghan A.P., Schmid W., Aguzzi A., Schutz G. Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development // *Steroids*. — 1995. — Vol. 60. — P. 93-96.

58. Condon J., Gosden C., Gardener D., Nickson P., Hewison M., Howie A.J., Stewart P.M. Expression of type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and corticosteroid hormone receptors in early human fetal life // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. — 1998. — Vol. 83. — P. 4490-4497.

59. Cottrell E.C., Seckl J.R. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease // *Frontiers in behavioral neuroscience*. — 2009. — Vol. 3. — P. 19.

60. Craig S.P., Buckle V.J., Lamouroux A., Mallet J., Craig I. Localization of the human tyrosine hydroxylase gene to 11p15: gene duplication and evolution of metabolic pathways // *Cytogenetics and cell genetics*. — 1986. — Vol. 42. — P. 29-32.
61. Curran T., MacConnell W.P., van Straaten F., Verma I.M. Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells // *Molecular and cellular biology*. — 1983. — Vol. 3. — P. 914-921.
62. Czock D., Keller F., Rasche F.M., Haussler U. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids // *Clinical pharmacokinetics*. — 2005. — Vol. 44. — P. 61-98.
63. De Bosscher K., Vanden Berghe W., Haegeman G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression // *Endocrine reviews*. — 2003. — Vol. 24. — P. 488-522.
64. de Kloet E.R., Claessens S.E., Kentrop J. Context modulates outcome of perinatal glucocorticoid action in the brain // *Frontiers in endocrinology*. — 2014. — Vol. 5. — P. 100.
65. de Kloet E.R., Fitzsimons C.P., Datson N.A., Meijer O.C., Vreugdenhil E. Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: about receptors, transcription machinery and microRNA // *Brain research*. — 2009. — Vol. 1293. — P. 129-141.
66. de Kloet E.R., Joels M., Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease // *Nature reviews. Neuroscience*. — 2005a. — Vol. 6. — P. 463-475.
67. de Kloet E.R., Sibug R.M., Helmerhorst F.M., Schmidt M.V. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life // *Neuroscience and biobehavioral reviews*. — 2005b. — Vol. 29. — P. 271-281.

68. De Kloet E.R., Vreugdenhil E., Oitzl M.S., Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease // *Endocrine reviews*. — 1998. — Vol. 19. — P. 269-301.

69. de Medeiros M.A., Reis L.C., Mello L.E. Stress-induced c-Fos expression is differentially modulated by dexamethasone, diazepam and imipramine // *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. — 2005. — Vol. 30. — P. 1246-1256.

70. Dent G.W., Smith M.A., Levine S. Stress-induced alterations in locus coeruleus gene expression during ontogeny // *Brain research. Developmental brain research*. — 2001. — Vol. 127. — P. 23-30.

71. Di S., Malcher-Lopes R., Halmos K.C., Tasker J.G. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. — 2003. — Vol. 23. — P. 4850-4857.

72. Di S., Malcher-Lopes R., Marcheselli V.L., Bazan N.G., Tasker J.G. Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons // *Endocrinology*. — 2005. — Vol. 146. — P. 4292-4301.

73. Di S., Maxson M.M., Franco A., Tasker J.G. Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. — 2009. — Vol. 29. — P. 393-401.

74. Diamond M.I., Miner J.N., Yoshinaga S.K., Yamamoto K.R. Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element // *Science*. — 1990. — Vol. 249. — P. 1266-1272.

75. Diaz R., Brown R.W., Seckl J.R. Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. — 1998. — Vol. 18. — P. 2570-2580.

76. Ding B., Kilpatrick D.L. Chromatin immunoprecipitation assay of brain tissues using Percoll gradient-purified nuclei // *Methods Mol Biol.* — 2013. — Vol. 1018. — P. 199-209.

77. Drake A.J., McPherson R.C., Godfrey K.M., Cooper C., Lillycrop K.A., Hanson M.A., Meehan R.R., Seckl J.R., Reynolds R.M. An unbalanced maternal diet in pregnancy associates with offspring epigenetic changes in genes controlling glucocorticoid action and foetal growth // *Clinical endocrinology.* — 2012. — Vol. 77. — P. 808-815.

78. Druker J., Liberman A.C., Antunica-Noguerol M., Gerez J., Paez-Pereda M., Rein T., Iniguez-Lluhi J.A., Holsboer F., Arzt E. RSUME enhances glucocorticoid receptor SUMOylation and transcriptional activity // *Molecular and cellular biology.* — 2013. — Vol. 33. — P. 2116-2127.

79. Dunkley P.R., Bobrovskaya L., Graham M.E., von Nagy-Felsobuki E.I., Dickson P.W. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences // *Journal of neurochemistry.* — 2004. — Vol. 91. — P. 1025-1043.

80. Durchdewald M., Angel P., Hess J. The transcription factor Fos: a Janus-type regulator in health and disease // *Histology and histopathology.* — 2009. — Vol. 24. — P. 1451-1461.

81. Dygalo N.N., Kalinina T.S., Shishkina G.T. Neonatal programming of rat behavior by downregulation of alpha2A-adrenoreceptor gene expression in the brain // *Annals of the New York Academy of Sciences.* — 2008. — Vol. 1148. — P. 409-414.

82. Edelstein K., Beaulieu C., D'Abramo R., Amir S. Expression profiles of JunB and c-Fos proteins in the rat circadian system // *Brain research.* — 2000. — Vol. 870. — P. 54-65.

83. Edwards C.R., Benediktsson R., Lindsay R.S., Seckl J.R. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? // *Lancet.* — 1993. — Vol. 341. — P. 355-357.

84. Edwards H.E., Burnham W.M. The impact of corticosteroids on the developing animal // *Pediatric research.* — 2001. — Vol. 50. — P. 433-440.

85. Eferl R., Sibia M., Hilberg F., Fuchsbichler A., Kufferath I., Guertl B., Zenz R., Wagner E.F., Zatloukal K. Functions of c-Jun in liver and heart development // *The Journal of cell biology*. — 1999. — Vol. 145. — P. 1049-1061.

86. Eferl R., Wagner E.F. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis // *Nature reviews. Cancer*. — 2003. — Vol. 3. — P. 859-868.

87. Entringer S., Wadhwa P.D. Developmental programming of obesity and metabolic dysfunction: role of prenatal stress and stress biology // *Nestle Nutrition Institute workshop series*. — 2013. — Vol. 74. — P. 107-120.

88. Evanson N.K., Herman J.P., Sakai R.R., Krause E.G. Nongenomic actions of adrenal steroids in the central nervous system // *Journal of neuroendocrinology*. — 2010. — Vol. 22. — P. 846-861.

89. Fossum L.H., Sterling C.R., Tank A.W. Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription rate and tyrosine hydroxylase mRNA stability by cyclic AMP and glucocorticoid // *Molecular pharmacology*. — 1992. — Vol. 42. — P. 898-908.

90. Fowden A.L., Li J., Forhead A.J. Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? // *P Nutr Soc*. — 1998. — Vol. 57. — P. 113-122.

91. Friggi-Grelin F., Coulom H., Meller M., Gomez D., Hirsh J., Birman S. Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase // *Journal of neurobiology*. — 2003. — Vol. 54. — P. 618-627.

92. Fujinaga M., Scott J.C. Gene expression of catecholamine synthesizing enzymes and beta adrenoceptor subtypes during rat embryogenesis // *Neuroscience letters*. — 1997. — Vol. 231. — P. 108-112.

93. Fung B.P., Yoon S.O., Chikaraishi D.M. Sequences That Direct Rat Tyrosine-Hydroxylase Gene-Expression // *Journal of neurochemistry*. — 1992. — Vol. 58. — P. 2044-2052.

94. Fuxe K., Harfstrand A., Agnati L.F., Yu Z.Y., Cintra A., Wikstrom A.C., Okret S., Cantoni E., Gustafsson J.A. Immunocytochemical studies on the localization of glucocorticoid receptor immunoreactive nerve cells in the lower brain stem and spinal cord of the male rat using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor // *Neuroscience letters*. — 1985a. — Vol. 60. — P. 1-6.

95. Fuxe K., Wikstrom A.C., Okret S., Agnati L.F., Harfstrand A., Yu Z.Y., Granholm L., Zoli M., Vale W., Gustafsson J.A. Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor // *Endocrinology*. — 1985b. — Vol. 117. — P. 1803-1812.

96. Galliher-Beckley A.J., Williams J.G., Cidlowski J.A. Ligand-independent phosphorylation of the glucocorticoid receptor integrates cellular stress pathways with nuclear receptor signaling // *Molecular and cellular biology*. — 2011. — Vol. 31. — P. 4663-4675.

97. Gass P., Herdegen T., Bravo R., Kiessling M. Spatiotemporal induction of immediate early genes in the rat brain after limbic seizures: effects of NMDA receptor antagonist MK-801 // *The European journal of neuroscience*. — 1993. — Vol. 5. — P. 933-943.

98. Goridis C., Rohrer H. Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons // *Nature reviews. Neuroscience*. — 2002. — Vol. 3. — P. 531-541.

99. Grad I., Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones // *Molecular and cellular endocrinology*. — 2007. — Vol. 275. — P. 2-12.

100. Groeneweg F.L., Karst H., de Kloet E.R., Joels M. Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response // *The Journal of endocrinology*. — 2011. — Vol. 209. — P. 153-167.

101. Guo S., Brush J., Teraoka H., Goddard A., Wilson S.W., Mullins M.C., Rosenthal A. Development of noradrenergic neurons in the zebrafish hindbrain

requires BMP, FGF8, and the homeodomain protein *soulless/Phox2a* // *Neuron*. — 1999. — Vol. 24. — P. 555-566.

102. Hagerty T., Morgan W.W., Elango N., Strong R. Identification of a glucocorticoid-responsive element in the promoter region of the mouse tyrosine hydroxylase gene // *Journal of neurochemistry*. — 2001. — Vol. 76. — P. 825-834.

103. Hai T., Hartman M.G. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis // *Gene*. — 2001. — Vol. 273. — P. 1-11.

104. Halazonetis T.D., Georgopoulos K., Greenberg M.E., Leder P. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities // *Cell*. — 1988. — Vol. 55. — P. 917-924.

105. Haller J., Mikics E., Makara G.B. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings // *Frontiers in neuroendocrinology*. — 2008. — Vol. 29. — P. 273-291.

106. Hammes S.R., Levin E.R. Extranuclear steroid receptors: nature and actions // *Endocrine reviews*. — 2007. — Vol. 28. — P. 726-741.

107. Hansson A.C., Fuxe K. Time-course of immediate early gene expression in hippocampal subregions of adrenalectomized rats after acute corticosterone challenge // *Brain research*. — 2008. — Vol. 1215. — P. 1-10.

108. Harrington W.R., Kim S.H., Funk C.C., Madak-Erdogan Z., Schiff R., Katzenellenbogen J.A., Katzenellenbogen B.S. Estrogen dendrimer conjugates that preferentially activate extranuclear, nongenomic versus genomic pathways of estrogen action // *Mol Endocrinol*. — 2006. — Vol. 20. — P. 491-502.

109. Harris A., Seckl J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease // *Horm Behav*. — 2011. — Vol. 59. — P. 279-289.

110. Hashimshony T., Zhang J., Keshet I., Bustin M., Cedar H. The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development // *Nat Genet.* — 2003. — Vol. 34. — P. 187-192.

111. Hata R., Maeda K., Hermann D., Mies G., Hossmann K.A. Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice // *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* — 2000. — Vol. 20. — P. 306-315.

112. Hauser J., Feldon J., Pryce C.R. Direct and dam-mediated effects of prenatal dexamethasone on emotionality, cognition and HPA axis in adult Wistar rats // *Horm Behav.* — 2009. — Vol. 56. — P. 364-375.

113. Haycock J.W. Species differences in the expression of multiple tyrosine hydroxylase protein isoforms // *Journal of neurochemistry.* — 2002. — Vol. 81. — P. 947-953.

114. Healy S., Khan P., Davie J.R. Immediate early response genes and cell transformation // *Pharmacology & therapeutics.* — 2013. — Vol. 137. — P. 64-77.

115. Hebert M.A., Serova L.I., Sabban E.L. Single and repeated immobilization stress differentially trigger induction and phosphorylation of several transcription factors and mitogen-activated protein kinases in the rat locus coeruleus // *Journal of neurochemistry.* — 2005. — Vol. 95. — P. 484-498.

116. Herdegen T., Skene P., Bahr M. The c-Jun transcription factor--bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration // *Trends in neurosciences.* — 1997. — Vol. 20. — P. 227-231.

117. Herdegen T., Waetzig V. AP-1 proteins in the adult brain: facts and fiction about effectors of neuroprotection and neurodegeneration // *Oncogene.* — 2001. — Vol. 20. — P. 2424-2437.

118. Herlenius E., Lagercrantz H. Development of neurotransmitter systems during critical periods // *Experimental neurology.* — 2004. — Vol. 190 Suppl 1. — P. S8-21.

119. Hernandez-Sanchez C., Bartulos O., Valenciano A.I., Mansilla A., de Pablo F. The regulated expression of chimeric tyrosine hydroxylase-insulin transcripts during early development // *Nucleic acids research*. — 2006. — Vol. 34. — P. 3455-3464.

120. Hess J., Angel P., Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings // *Journal of cell science*. — 2004. — Vol. 117. — P. 5965-5973.

121. Hinz B., Hirschelmann R. Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats // *Pharmaceutical research*. — 2000. — Vol. 17. — P. 1273-1277.

122. Hippenmeyer S., Kramer I., Arber S. Control of neuronal phenotype: what targets tell the cell bodies // *Trends in neurosciences*. — 2004. — Vol. 27. — P. 482-488.

123. Hirsch M.R., Tiveron M.C., Guillemot F., Brunet J.F., Gordinis C. Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system // *Development*. — 1998. — Vol. 125. — P. 599-608.

124. Holm P.C., Rodriguez F.J., Kele J., Castelo-Branco G., Kitajewski J., Arenas E. BMPs, FGF8 and Wnts regulate the differentiation of locus coeruleus noradrenergic neuronal precursors // *Journal of neurochemistry*. — 2006. — Vol. 99. — P. 343-352.

125. Hudson W.H., Youn C., Ortlund E.A. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression // *Nature structural & molecular biology*. — 2013. — Vol. 20. — P. 53-58.

126. Jochum W., Passegue E., Wagner E.F. AP-1 in mouse development and tumorigenesis // *Oncogene*. — 2001. — Vol. 20. — P. 2401-2412.

127. Joels M., Karst H., DeRijk R., de Kloet E.R. The coming out of the brain mineralocorticoid receptor // *Trends in neurosciences*. — 2008. — Vol. 31. — P. 1-7.

128. 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 // *Nature genetics*. — 2011. — Vol. 43. — P. 264-268.
129. Johnson L.R., Farb C., Morrison J.H., McEwen B.S., LeDoux J.E. Localization of glucocorticoid receptors at postsynaptic membranes in the lateral amygdala // *Neuroscience*. — 2005. — Vol. 136. — P. 289-299.
130. Johnson R.S., Spiegelman B.M., Papaioannou V. Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene // *Cell*. — 1992. — Vol. 71. — P. 577-586.
131. Kalinina T.S., Shishkina G.T., Dygalo N.N. Induction of tyrosine hydroxylase gene expression by glucocorticoids in the perinatal rat brain is age-dependent // *Neurochemical research*. — 2012. — Vol. 37. — P. 811-818.
132. Kallunki T., Deng T., Hibi M., Karin M. c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions // *Cell*. — 1996. — Vol. 87. — P. 929-939.
133. Kaminska B., Mosieniak G., Gierdalski M., Kossut M., Kaczmarek L. Elevated Ap-1 Transcription Factor DNA-Binding Activity at the Onset of Functional Plasticity during Development of Rat Sensory Cortical Areas // *Mol Brain Res*. — 1995. — Vol. 33. — P. 295-304.
134. Kapoor A., Petropoulos S., Matthews S.G. Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids // *Brain Res Rev*. — 2008. — Vol. 57. — P. 586-595.
135. Kappelmann M., Bosserhoff A., Kuphal S. AP-1/c-Jun transcription factors: regulation and function in malignant melanoma // *European journal of cell biology*. — 2014. — Vol. 93. — P. 76-81.
136. Karandrea D., Kittas C., Kitraki E. Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors // *Neuroendocrinology*. — 2002. — Vol. 75. — P. 217-226.

137. Karst H., Berger S., Erdmann G., Schutz G., Joels M. Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterone // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2010. — Vol. 107. — P. 14449-14454.

138. Karst H., Berger S., Turiault M., Tronche F., Schutz G., Joels M. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2005. — Vol. 102. — P. 19204-19207.

139. Karst H., Joels M. Corticosterone slowly enhances miniature excitatory postsynaptic current amplitude in mice CA1 hippocampal cells // *Journal of neurophysiology*. — 2005. — Vol. 94. — P. 3479-3486.

140. Kassel O., Herrlich P. Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects // *Molecular and cellular endocrinology*. — 2007. — Vol. 275. — P. 13-29.

141. Kassel O., Sancono A., Kratzschmar J., Kreft B., Stassen M., Cato A.C. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1 // *The EMBO journal*. — 2001. — Vol. 20. — P. 7108-7116.

142. Kino T., Su Y.A., Chrousos G.P. Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology // *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. — 2009. — Vol. 66. — P. 3435-3448.

143. Kobayashi K., Kaneda N., Ichinose H., Kishi F., Nakazawa A., Kurosawa Y., Fujita K., Nagatsu T. Structure of the human tyrosine hydroxylase gene: alternative splicing from a single gene accounts for generation of four mRNA types // *Journal of biochemistry*. — 1988. — Vol. 103. — P. 907-912.

144. Kobayashi K., Morita S., Sawada H., Mizuguchi T., Yamada K., Nagatsu I., Hata T., Watanabe Y., Fujita K., Nagatsu T. Targeted Disruption of the Tyrosine-Hydroxylase Locus Results in Severe Catecholamine Depletion and

Perinatal Lethality in Mice // *Journal of Biological Chemistry*. — 1995. — Vol. 270. — P. 27235-27243.

145. Korte S.M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology // *Neuroscience and biobehavioral reviews*. — 2001. — Vol. 25. — P. 117-142.

146. Kovacs K.J. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond // *Journal of neuroendocrinology*. — 2008. — Vol. 20. — P. 665-672.

147. Kreider M.L., Aldridge J.E., Cousins M.M., Oliver C.A., Seidler F.J., Slotkin T.A. Disruption of rat forebrain development by glucocorticoids: critical perinatal periods for effects on neural cell acquisition and on cell signaling cascades mediating noradrenergic and cholinergic neurotransmitter/neurotrophic responses // *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. — 2005. — Vol. 30. — P. 1841-1855.

148. Kreider M.L., Tate C.A., Cousins M.M., Oliver C.A., Seidler F.J., Slotkin T.A. Lasting effects of developmental dexamethasone treatment on neural cell number and size, synaptic activity, and cell signaling: critical periods of vulnerability, dose-effect relationships, regional targets, and sex selectivity // *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. — 2006. — Vol. 31. — P. 12-35.

149. Kumar R., Thompson E.B. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship // *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. — 2005. — Vol. 94. — P. 383-394.

150. Kumer S.C., Vrana K.E. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression // *Journal of neurochemistry*. — 1996. — Vol. 67. — P. 443-462.

151. Kvetnansky R., Sabban E.L. Stress and molecular biology of neurotransmitter-related enzymes // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 1998. — Vol. 851. — P. 342-356.

152. Kvetnansky R., Sabban E.L., Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches // *Physiological reviews*. — 2009. — Vol. 89. — P. 535-606.

153. Langlais D., Couture C., Balsalobre A., Drouin J. The Stat3/GR interaction code: predictive value of direct/indirect DNA recruitment for transcription outcome // *Molecular cell*. — 2012. — Vol. 47. — P. 38-49.

154. Langley-Evans S.C. Maternal carbenoxolone treatment lowers birthweight and induces hypertension in the offspring of rats fed a protein-replete diet // *Clin Sci (Lond)*. — 1997. — Vol. 93. — P. 423-429.

155. Lanshakov D.A., Sukhareva E.V., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Dexamethasone-induced acute excitotoxic cell death in the developing brain // *Neurobiol Dis*. — 2016. — Vol. 91. — P. 1-9.

156. Lau L.F., Nathans D. Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1987. — Vol. 84. — P. 1182-1186.

157. Lenartowski R., Goc A. Epigenetic, transcriptional and posttranscriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene // *Int J Dev Neurosci*. — 2011. — Vol. 29. — P. 873-883.

158. Lesage J., Blondeau B., Grino M., Breant B., Dupouy J.P. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat // *Endocrinology*. — 2001. — Vol. 142. — P. 1692-1702.

159. Levine S. Infantile experience and resistance to physiological stress // *Science*. — 1957. — Vol. 126. — P. 405.

160. Levine S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 1994. — Vol. 746. — P. 275-288; discussion 289-293.

161. Levitt N.S., Lindsay R.S., Holmes M.C., Seckl J.R. Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene

expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat // *Neuroendocrinology*. — 1996. — Vol. 64. — P. 412-418.

162. Lewis-Tuffin L.J., Cidlowski J.A. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 2006. — Vol. 1069. — P. 1-9.

163. Lewis E.J., Tank A.W., Weiner N., Chikaraishi D.M. Regulation of tyrosine hydroxylase mRNA by glucocorticoid and cyclic AMP in a rat pheochromocytoma cell line. Isolation of a cDNA clone for tyrosine hydroxylase mRNA // *The Journal of biological chemistry*. — 1983. — Vol. 258. — P. 14632-14637.

164. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. // *Nat Rev Genet*. — 2002. — Vol. 3. — P. 662-673.

165. Li Y., Gonzalez P., Zhang L. Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: mechanisms and possible interventions // *Progress in neurobiology*. — 2012. — Vol. 98. — P. 145-165.

166. Liberman A.C., Refojo D., Druker J., Toscano M., Rein T., Holsboer F., Arzt E. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction // *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. — 2007. — Vol. 21. — P. 1177-1188.

167. Liggins G.C., Howie R.N. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants // *Pediatrics*. — 1972. — Vol. 50. — P. 515-525.

168. Limbourg F.P., Huang Z., Plumier J.C., Simoncini T., Fujioka M., Tuckermann J., Schutz G., Moskowitz M.A., Liao J.K. Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids // *The Journal of clinical investigation*. — 2002. — Vol. 110. — P. 1729-1738.

169. Lindsay R.S., Lindsay R.M., Edwards C.R., Seckl J.R. Inhibition of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring // *Hypertension*. — 1996. — Vol. 27. — P. 1200-1204.

170. Liu X.H., Zeng J.W., Zhao Y.D., Chen P.H., Xiao Z., Ruan H.Z. Rapid inhibition of ATP-induced currents by corticosterone in rat dorsal root ganglion neurons // *Pharmacology*. — 2008. — Vol. 82. — P. 164-170.

171. Lopez-Sanchez C., Bartulos O., Martinez-Campos E., Ganan C., Valenciano A.I., Garcia-Martinez V., De Pablo F., Hernandez-Sanchez C. Tyrosine hydroxylase is expressed during early heart development and is required for cardiac chamber formation // *Cardiovascular research*. — 2010. — Vol. 88. — P. 111-120.

172. Lowenberg M., Tuynman J., Bilderbeek J., Gaber T., Buttgereit F., van Deventer S., Peppelenbosch M., Hommes D. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn // *Blood*. — 2005. — Vol. 106. — P. 1703-1710.

173. Lu N.Z., Cidlowski J.A. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes // *Molecular cell*. — 2005. — Vol. 18. — P. 331-342.

174. Lu N.Z., Collins J.B., Grissom S.F., Cidlowski J.A. Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor // *Molecular and cellular biology*. — 2007. — Vol. 27. — P. 7143-7160.

175. Maki Y., Bos T.J., Davis C., Starbuck M., Vogt P.K. Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1987. — Vol. 84. — P. 2848-2852.

176. Makino S., Smith M.A., Gold P.W. Regulatory role of glucocorticoids and glucocorticoid receptor mRNA levels on tyrosine hydroxylase gene expression in the locus coeruleus during repeated immobilization stress // *Brain Res*. — 2002. — Vol. 943. — P. 216-223.

177. Manna P.R., Stocco D.M. The role of JUN in the regulation of PRKCC-mediated STAR expression and steroidogenesis in mouse Leydig cells // *Journal of molecular endocrinology*. — 2008. — Vol. 41. — P. 329-341.

178. Markey K.A., Towle A.C., Sze P.Y. Glucocorticoid influence on tyrosine hydroxylase activity in mouse locus coeruleus during postnatal development // *Endocrinology*. — 1982. — Vol. 111. — P. 1519-1523.

179. Matthews K., Dalley J.W., Matthews C., Tsai T.H., Robbins T.W. Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and gender-specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain // *Synapse*. — 2001. — Vol. 40. — P. 1-10.

180. McArthur S., McHale E., Gillies G.E. The size and distribution of midbrain dopaminergic populations are permanently altered by perinatal glucocorticoid exposure in a sex- region- and time-specific manner // *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. — 2007. — Vol. 32. — P. 1462-1476.

181. McEwen B.S. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators // *European journal of pharmacology*. — 2008. — Vol. 583. — P. 174-185.

182. McKay L.I., Cidlowski J.A. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways // *Endocrine reviews*. — 1999. — Vol. 20. — P. 435-459.

183. Meaney M.J., Szyf M., Seckl J.R. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health // *Trends in molecular medicine*. — 2007. — Vol. 13. — P. 269-277.

184. Meijsing S.H., Pufall M.A., So A.Y., Bates D.L., Chen L., Yamamoto K.R. DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity // *Science*. — 2009. — Vol. 324. — P. 407-410.

185. Mendelson C.R. Role of transcription factors in fetal lung development and surfactant protein gene expression // *Annual review of physiology*. — 2000. — Vol. 62. — P. 875-915.

186. Mielke K., Brecht S., Dorst A., Herdegen T. Activity and expression of JNK1, p38 and ERK kinases, c-Jun N-terminal phosphorylation, and c-jun promoter binding in the adult rat brain following kainate-induced seizures // *Neuroscience*. — 1999. — Vol. 91. — P. 471-483.

187. Miller A.H., Spencer R.L., Hassett J., Kim C., Rhee R., Ciurea D., Dhabhar F., McEwen B., Stein M. Effects of selective type I and II adrenal steroid agonists on immune cell distribution // *Endocrinology*. — 1994. — Vol. 135. — P. 1934-1944.

188. Moalli P.A., Pillay S., Krett N.L., Rosen S.T. Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells // *Cancer research*. — 1993. — Vol. 53. — P. 3877-3879.

189. Moisiadis V.G., Matthews S.G. Glucocorticoids and fetal programming part 1: Outcomes // *Nature reviews. Endocrinology*. — 2014. — Vol. 10. — P. 391-402.

190. Monje P., Marinissen M.J., Gutkind J.S. Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor // *Molecular and cellular biology*. — 2003. — Vol. 23. — P. 7030-7043.

191. Morin X., Cremer H., Hirsch M.R., Kapur R.P., Goridis C., Brunet J.F. Defects in sensory and autonomic ganglia and absence of locus coeruleus in mice deficient for the homeobox gene *Phox2a* // *Neuron*. — 1997. — Vol. 18. — P. 411-423.

192. Murphy V.E., Zakar T., Smith R., Giles W.B., Gibson P.G., Clifton V.L. Reduced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity is associated with decreased birth weight centile in pregnancies complicated by asthma // *The*

Journal of clinical endocrinology and metabolism. — 2002. — Vol. 87. — P. 1660-1668.

193. Myers B., McKlveen J.M., Herman J.P. Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: implications for the energetics of stress // *Frontiers in neuroendocrinology*. — 2014. — Vol. 35. — P. 180-196.

194. Nagamoto-Combs K., Piech K.M., Best J.A., Sun B., Tank A.W. Tyrosine hydroxylase gene promoter activity is regulated by both cyclic AMP-responsive element and AP1 sites following calcium influx. Evidence for cyclic amp-responsive element binding protein-independent regulation // *The Journal of biological chemistry*. — 1997. — Vol. 272. — P. 6051-6058.

195. Nagano M., Ozawa H., Suzuki H. Prenatal dexamethasone exposure affects anxiety-like behaviour and neuroendocrine systems in an age-dependent manner // *Neuroscience research*. — 2008. — Vol. 60. — P. 364-371.

196. Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S. Tyrosine Hydroxylase. the Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis // *J Biol Chem*. — 1964. — P. 2910-2917.

197. Naumenko E.V., Dygalo N.N. Noradrenergic brain mechanisms and emotional stress in adult rats after prenatal hydrocortisone treatment // *Biogenic Amines in Development*, Elsevier/North Holland Biomedical Press. . — 1980. — Vol. — P. 373-388.

198. Newton R., Holden N.S. Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor? // *Molecular pharmacology*. — 2007. — Vol. 72. — P. 799-809.

199. Nicolaidis N.C., Galata Z., Kino T., Chrousos G.P., Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function // *Steroids*. — 2010. — Vol. 75. — P. 1-12.

200. Niwa M., Jaaro-Peled H., Tankou S., Seshadri S., Hikida T., Matsumoto Y., Cascella N.G., Kano S., Ozaki N., Nabeshima T., Sawa A. Adolescent stress-induced epigenetic control of dopaminergic neurons via glucocorticoids // *Science*. — 2013. — Vol. 339. — P. 335-339.

201. Niwa M., Lee R.S., Tanaka T., Okada K., Kano S., Sawa A. A critical period of vulnerability to adolescent stress: epigenetic mediators in mesocortical dopaminergic neurons. // *Hum Mol Genet.* – 2016. – Vol. 25. – P. 1370-1381.

202. Noorlander C.W., De Graan P.N., Middeldorp J., Van Beers J.J., Visser G.H. Ontogeny of hippocampal corticosteroid receptors: effects of antenatal glucocorticoids in human and mouse // *The Journal of comparative neurology.* — 2006. — Vol. 499. — P. 924-932.

203. Noorlander C.W., Visser G.H., Ramakers G.M., Nikkels P.G., de Graan P.N. Prenatal corticosteroid exposure affects hippocampal plasticity and reduces lifespan // *Developmental neurobiology.* — 2008. — Vol. 68. — P. 237-246.

204. O'Donnell A., Odrowaz Z., Sharrocks A.D. Immediate-early gene activation by the MAPK pathways: what do and don't we know? // *Biochemical Society transactions.* — 2012. — Vol. 40. — P. 58-66.

205. Oakley R.H., Cidlowski J.A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease // *The Journal of allergy and clinical immunology.* — 2013. — Vol. 132. — P. 1033-1044.

206. Okada S., Wang Z.Q., Grigoriadis A.E., Wagner E.F., von Ruden T. Mice lacking c-fos have normal hematopoietic stem cells but exhibit altered B-cell differentiation due to an impaired bone marrow environment // *Molecular and cellular biology.* — 1994. — Vol. 14. — P. 382-390.

207. Okada Y., Saika S., Shirai K., Ohnishi Y., Senba E. Expression of AP-1 (c-fos/c-jun) in developing mouse corneal epithelium // *Graef Arch Clin Exp.* — 2003. — Vol. 241. — P. 330-333.

208. Okuse K., Matsuoka I., Kurihara K. Tissue-specific methylation occurs in the essential promoter element of the tyrosine hydroxylase gene // *Brain Res Mol Brain Res.* – 1997. – Vol. 46. – P. 197-207.

209. Olesen K.M., Auger A.P. Sex differences in Fos protein expression in the neonatal rat brain // *Journal of neuroendocrinology.* — 2005. — Vol. 17. — P. 255-261.

210. Ortiz L.A., Quan A., Weinberg A., Baum M. Effect of prenatal dexamethasone on rat renal development // *Kidney international*. — 2001. — Vol. 59. — P. 1663-1669.

211. Pan D., Kocherginsky M., Conzen S.D. Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer // *Cancer research*. — 2011. — Vol. 71. — P. 6360-6370.

212. Paratcha G., de Stein M.L., Szapiro G., Lopez M., Bevilaqua L., Cammarota M., de Iraldi A.P., Izquierdo I., Medina J.H. Experience-dependent decrease in synaptically localized Fra-1 // *Brain research. Molecular brain research*. — 2000. — Vol. 78. — P. 120-130.

213. Parma D.L., Benasayag S.J., Szijan I. Expression of c-myc and c-fos oncogenes in different rat brain regions during postnatal development // *Int J Dev Neurosci*. — 1991. — Vol. 9. — P. 613-619.

214. Pattyn A., Goridis C., Brunet J.F. Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b // *Molecular and cellular neurosciences*. — 2000. — Vol. 15. — P. 235-243.

215. Paulding W.R., Schnell P.O., Bauer A.L., Striet J.B., Nash J.A., Kuznetsova A.V., Czyzyk-Krzeska M.F. Regulation of gene expression for neurotransmitters during adaptation to hypoxia in oxygen-sensitive neuroendocrine cells // *Microsc Res Techniq*. — 2002. — Vol. 59. — P. 178-187.

216. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* // Academic Press. — 1998. — Vol. — P.

217. Pedram A., Razandi M., Sainson R.C., Kim J.K., Hughes C.C., Levin E.R. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane // *The Journal of biological chemistry*. — 2007. — Vol. 282. — P. 22278-22288.

218. Pennypacker K.R. AP-1 transcription factor complexes in CNS disorders and development // *The Journal of the Florida Medical Association*. — 1995. — Vol. 82. — P. 551-554.

219. Perez-Cadahia B., Drobic B., Davie J.R. Activation and function of immediate-early genes in the nervous system // *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. — 2011. — Vol. 89. — P. 61-73.

220. Pfahl M. Nuclear receptor/AP-1 interaction // *Endocrine reviews*. — 1993. — Vol. 14. — P. 651-658.

221. Pierce R.A., Mariencheck W.I., Sandefur S., Crouch E.C., Parks W.C. Glucocorticoids upregulate tropoelastin expression during late stages of fetal lung development // *The American journal of physiology*. — 1995. — Vol. 268. — P. L491-500.

222. Polman J.A., Welten J.E., Bosch D.S., de Jonge R.T., Balog J., van der Maarel S.M., de Kloet E.R., Datson N.A. A genome-wide signature of glucocorticoid receptor binding in neuronal PC12 cells // *BMC neuroscience*. — 2012. — Vol. 13. — P. 118.

223. Prager E.M., Brielmaier J., Bergstrom H.C., McGuire J., Johnson L.R. Localization of mineralocorticoid receptors at mammalian synapses // *PloS one*. — 2010. — Vol. 5. — P. e14344.

224. Pratt W.B., Morishima Y., Murphy M., Harrell M. Chaperoning of glucocorticoid receptors // *Handbook of experimental pharmacology*. — 2006. — Vol. — P. 111-138.

225. Purkiss R.J., Legg M.D., Hunt S.P., Davies S.W. Immediate early gene expression in the rat forebrain following striatal infusion of quinolinic acid // *The European journal of neuroscience*. — 1993. — Vol. 5. — P. 1653-1662.

226. Puymirat J., Faivre-Bauman A., Bizzini B., Tixier-Vidal A. Prenatal and postnatal ontogenesis of neurotransmitter-synthetizing enzymes and [125I]tetanus toxin binding capacity in the mouse hypothalamus // *Brain research*. — 1982. — Vol. 255. — P. 199-206.

227. Qian Y., Fritsch B., Shirasawa S., Chen C.L., Choi Y., Ma Q. Formation of brainstem (nor)adrenergic centers and first-order relay visceral sensory neurons is dependent on homeodomain protein Rnx/Tlx3 // *Genes & development*. — 2001. — Vol. 15. — P. 2533-2545.

228. Qiu S., Champagne D.L., Peters M., Catania E.H., Weeber E.J., Levitt P., Pimenta A.F. Loss of limbic system-associated membrane protein leads to reduced hippocampal mineralocorticoid receptor expression, impaired synaptic plasticity, and spatial memory deficit // *Biological psychiatry*. — 2010. — Vol. 68. — P. 197-204.

229. Radcliffe P.M., Sterling C.R., Tank A.W. Induction of tyrosine hydroxylase mRNA by nicotine in rat midbrain is inhibited by mifepristone // *Journal of neurochemistry*. — 2009. — Vol. 109. — P. 1272-1284.

230. Raivich G. c-Jun expression, activation and function in neural cell death, inflammation and repair // *Journal of neurochemistry*. — 2008. — Vol. 107. — P. 898-906.

231. Raivich G., Behrens A. Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain // *Progress in neurobiology*. — 2006. — Vol. 78. — P. 347-363.

232. Rani C.S., Elango N., Wang S.S., Kobayashi K., Strong R. Identification of an activator protein-1-like sequence as the glucocorticoid response element in the rat tyrosine hydroxylase gene // *Molecular pharmacology*. — 2009. — Vol. 75. — P. 589-598.

233. Rani C.S.S., Soto-Pina A., Iacovitti L., Strong R. Evolutionary conservation of an atypical glucocorticoid-responsive element in the human tyrosine hydroxylase gene // *Journal of neurochemistry*. — 2013. — Vol. 126. — P. 19-28.

234. Rao N.A., McCalman M.T., Moulos P., Francoijs K.J., Chatziioannou A., Kolisis F.N., Alexis M.N., Mitsiou D.J., Stunnenberg H.G. Coactivation of GR and NFkB alters the repertoire of their binding sites and target genes // *Genome research*. — 2011. — Vol. 21. — P. 1404-1416.

235. Ratman D., Vanden Berghe W., Dejager L., Libert C., Tavernier J., Beck I.M., De Bosscher K. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering // *Molecular and cellular endocrinology*. — 2013. — Vol. 380. — P. 41-54.

236. Ray D.W., Davis J.R., White A., Clark A.J. Glucocorticoid receptor structure and function in glucocorticoid-resistant small cell lung carcinoma cells // *Cancer research*. — 1996. — Vol. 56. — P. 3276-3280.

237. Razandi M., Oh P., Pedram A., Schnitzer J., Levin E.R. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions // *Mol Endocrinol*. — 2002. — Vol. 16. — P. 100-115.

238. Razandi M., Pedram A., Levin E.R. Heat shock protein 27 is required for sex steroid receptor trafficking to and functioning at the plasma membrane // *Molecular and cellular biology*. — 2010. — Vol. 30. — P. 3249-3261.

239. Reddy S.P., Mossman B.T. Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung // *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. — 2002. — Vol. 283. — P. L1161-1178.

240. Reik W., Dean W., Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian // *Science*. — 2001. — Vol. 293. — P. 1089-1093.

241. Reily M.M., Pantoja C., Hu X., Chinenov Y., Rogatsky I. The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression // *The EMBO journal*. — 2006. — Vol. 25. — P. 108-117.

242. Reul J.M., de Kloet E.R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation // *Endocrinology*. — 1985. — Vol. 117. — P. 2505-2511.

243. Reul J.M., Pearce P.T., Funder J.W., Krozowski Z.S. Type I and type II corticosteroid receptor gene expression in the rat: effect of adrenalectomy and dexamethasone administration // *Mol Endocrinol*. — 1989. — Vol. 3. — P. 1674-1680.

244. Reynolds R.M. Programming effects of glucocorticoids // *Clinical obstetrics and gynecology*. — 2013. — Vol. 56. — P. 602-609.

245. Rios M., Habecker B., Sasaoka T., Eisenhofer G., Tian H., Landis S., Chikaraishi D., Roffler-Tarlov S. Catecholamine synthesis is mediated by tyrosinase in the absence of tyrosine hydroxylase // *Journal of Neuroscience*. — 1999. — Vol. 19. — P. 3519-3526.

246. Rivers C., Levy A., Hancock J., Lightman S., Norman M. Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. — 1999. — Vol. 84. — P. 4283-4286.

247. Roberts D., Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth // *The Cochrane database of systematic reviews*. — 2006. — Vol. — P. CD004454.

248. Romano G., Suon S., Jin H., Donaldson A.E., Iacovitti L. Characterization of five evolutionary conserved regions of the human tyrosine hydroxylase (TH) promoter: implications for the engineering of a human TH minimal promoter assembled in a self-inactivating lentiviral vector system // *Journal of cellular physiology*. — 2005. — Vol. 204. — P. 666-677.

249. Ronacher K., Hadley K., Avenant C., Stubbsrud E., Simons S.S., Jr., Louw A., Hapgood J.P. Ligand-selective transactivation and transrepression via the glucocorticoid receptor: role of cofactor interaction // *Molecular and cellular endocrinology*. — 2009. — Vol. 299. — P. 219-231.

250. Roozendaal B., Hernandez A., Cabrera S.M., Hagewoud R., Malvaez M., Stefanko D.P., Haettig J., Wood M.A. Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. — 2010. — Vol. 30. — P. 5037-5046.

251. Rosenfeld P., van Eekelen J.A., Levine S., de Kloet E.R. Ontogeny of corticosteroid receptors in the brain // *Cellular and molecular neurobiology*. — 1993. — Vol. 13. — P. 295-319.

252. Ryder K., Lau L.F., Nathans D. A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-jun // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1988. — Vol. 85. — P. 1487-1491.

253. Sabban E.L., Hebert M.A., Liu X., Nankova B., Serova L. Differential effects of stress on gene transcription factors in catecholaminergic systems //

Annals of the New York Academy of Sciences. — 2004. — Vol. 1032. — P. 130-140.

254. Sabban E.L., Kvetnansky R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events // Trends in neurosciences. — 2001. — Vol. 24. — P. 91-98.

255. Salehi M., Barron M., Merry B.J., Goyns M.H. Fluorescence in situ hybridization analysis of the fos/jun ratio in the ageing brain // Mechanisms of ageing and development. — 1999. — Vol. 107. — P. 61-71.

256. Santos M.S., Joles J.A. Early determinants of cardiovascular disease // Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism. — 2012. — Vol. 26. — P. 581-597.

257. Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions // Endocrine reviews. — 2000. — Vol. 21. — P. 55-89.

258. Schapiro S., Geller E., Eiduson S. Neonatal adrenal cortical response to stress and vasopressin // Proc Soc Exp Biol Med. — 1962. — Vol. 109. — P. 937-941.

259. Schmidt M., Enthoven L., van Woezik J.H., Levine S., de Kloet E.R., Oitzl M.S. The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation // Journal of neuroendocrinology. — 2004. — Vol. 16. — P. 52-57.

260. Schoneveld O.J., Gaemers I.C., Lamers W.H. Mechanisms of glucocorticoid signalling // Biochimica et biophysica acta. — 2004. — Vol. 1680. — P. 114-128.

261. Schorpp-Kistner M., Wang Z.Q., Angel P., Wagner E.F. JunB is essential for mammalian placentation // The EMBO journal. — 1999. — Vol. 18. — P. 934-948.

262. Schreiber M., Wang Z.Q., Jochum W., Fetka I., Elliott C., Wagner E.F. Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1 // Development. — 2000. — Vol. 127. — P. 4937-4948.

263. Seckl J.R. Prenatal glucocorticoids and long-term programming // European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies. — 2004. — Vol. 151 Suppl 3. — P. U49-62.

264. Seckl J.R. Glucocorticoids, developmental 'programming' and the risk of affective dysfunction // Progress in brain research. — 2008. — Vol. 167. — P. 17-34.

265. Shah K., Tyagi S. Barriers to transmission of transcriptional noise in a c-fos c-jun pathway // Molecular systems biology. — 2013. — Vol. 9. — P. 687.

266. Shaulian E., Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival // Oncogene. — 2001. — Vol. 20. — P. 2390-2400.

267. Shishkina G.T., Bulygina V.V., Dygalo N.N. Behavioral effects of glucocorticoids during the first exposures to the forced swim stress // Psychopharmacology. — 2015. — Vol. 232. — P. 851-860.

268. Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Attenuation of alpha2A-adrenergic receptor expression in neonatal rat brain by RNA interference or antisense oligonucleotide reduced anxiety in adulthood // Neuroscience. — 2004a. — Vol. 129. — P. 521-528.

269. Shishkina G.T., Kalinina T.S., Popova N.K., Dygalo N.N. Influence of neonatal short-term reduction in brainstem alpha2A-adrenergic receptors on receptor ontogenesis, acoustic startle reflex, and prepulse inhibition in rats // Behavioral neuroscience. — 2004b. — Vol. 118. — P. 1285-1292.

270. Simon H.H., Scholz C., O'Leary D.D. Engrailed genes control developmental fate of serotonergic and noradrenergic neurons in mid- and hindbrain in a gene dose-dependent manner // Molecular and cellular neurosciences. — 2005. — Vol. 28. — P. 96-105.

271. Skorzewska A., Bidzinski A., Lehner M., Turzynska D., Wislowska-Stanek A., Sobolewska A., Szyndler J., Maciejak P., Taracha E., Plaznik A. The effects of acute and chronic administration of corticosterone on rat behavior in two models of fear responses, plasma corticosterone concentration, and c-Fos

expression in the brain structures // *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. — 2006. — Vol. 85. — P. 522-534.

272. Slotkin T.A., Kreider M.L., Tate C.A., Seidler F.J. Critical prenatal and postnatal periods for persistent effects of dexamethasone on serotonergic and dopaminergic systems // *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. — 2006. — Vol. 31. — P. 904-911.

273. Slotkin T.A., Zhang J., McCook E.C., Seidler F.J. Glucocorticoid administration alters nuclear transcription factors in fetal rat brain: implications for the use of antenatal steroids // *Brain research. Developmental brain research*. — 1998. — Vol. 111. — P. 11-24.

274. Smith M.A., Brady L.S., Glowa J., Gold P.W., Herkenham M. Effects of stress and adrenalectomy on tyrosine hydroxylase mRNA levels in the locus ceruleus by in situ hybridization // *Brain research*. — 1991. — Vol. 544. — P. 26-32.

275. 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 genetics*. — 2007. — Vol. 3. — P. e94.

276. So A.Y., Cooper S.B., Feldman B.J., Manuchehri M., Yamamoto K.R. Conservation analysis predicts in vivo occupancy of glucocorticoid receptor-binding sequences at glucocorticoid-induced genes // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2008. — Vol. 105. — P. 5745-5749.

277. Speksnijder N., Christensen K.V., Didriksen M., De Kloet E.R., Datson N.A. Glucocorticoid receptor and myocyte enhancer factor 2 cooperate to regulate the expression of c-JUN in a neuronal context // *Journal of molecular neuroscience : MN*. — 2012. — Vol. 48. — P. 209-218.

278. Stahn C., Buttgerit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids // *Nature clinical practice. Rheumatology*. — 2008. — Vol. 4. — P. 525-533.

279. Stavreva D.A., Muller 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 // *Molecular and cellular biology*. — 2004. — Vol. 24. — P. 2682-2697.

280. Stewart P.M., Whorwood C.B., Mason J.I. Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life // *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. — 1995. — Vol. 55. — P. 465-471.

281. Sud N., Wiseman D.A., Black S.M. Caveolin 1 is required for the activation of endothelial nitric oxide synthase in response to 17beta-estradiol // *Mol Endocrinol*. — 2010. — Vol. 24. — P. 1637-1649.

282. Sun B., Chen X., Xu L., Sterling C., Tank A.W. Chronic nicotine treatment leads to induction of tyrosine hydroxylase in locus ceruleus neurons: the role of transcriptional activation // *Molecular pharmacology*. — 2004. — Vol. 66. — P. 1011-1021.

283. Surjit M., Ganti K.P., Mukherji A., Ye T., Hua G., Metzger D., Li M., Chambon P. Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor // *Cell*. — 2011. — Vol. 145. — P. 224-241.

284. Szakacs R., Fazekas I., Mihaly A., Krisztin-Peva B., Juhasz A., Janka Z. Single-dose and chronic corticosterone treatment alters c-Fos or FosB immunoreactivity in the rat cerebral cortex // *Acta histochemica*. — 2010. — Vol. 112. — P. 147-160.

285. Tank A.W., Curella P., Ham L. Induction of mRNA for tyrosine hydroxylase by cyclic AMP and glucocorticoids in a rat pheochromocytoma cell line: evidence for the regulation of tyrosine hydroxylase synthesis by multiple mechanisms in cells exposed to elevated levels of both inducing agents // *Molecular pharmacology*. — 1986. — Vol. 30. — P. 497-503.

286. Tank A.W., Xu L., Chen X., Radcliffe P., Sterling C.R. Post-transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase expression in adrenal medulla

and brain // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 2008. — Vol. 1148. — P. 238-248.

287. Tekin I., Roskoski R., Jr., Carkaci-Salli N., Vrana K.E. Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase // *J Neural Transm (Vienna)*. — 2014. — Vol. 121. — P. 1451-1481.

288. Teurich S., Angel P. The glucocorticoid receptor synergizes with Jun homodimers to activate AP-1-regulated promoters lacking GR binding sites // *Chemical senses*. — 1995. — Vol. 20. — P. 251-255.

289. Thepot D., Weitzman J.B., Barra J., Segretain D., Stinnakre M.G., Babinet C., Yaniv M. Targeted disruption of the murine junD gene results in multiple defects in male reproductive function // *Development*. — 2000. — Vol. 127. — P. 143-153.

290. Thomas S.A., Matsumoto A.M., Palmiter R.D. Noradrenaline is essential for mouse fetal development // *Nature*. — 1995. — Vol. 374. — P. 643-646.

291. Tsiarli M.A., Paula Monaghan A., Defranco D.B. Differential subcellular localization of the glucocorticoid receptor in distinct neural stem and progenitor populations of the mouse telencephalon in vivo // *Brain research*. — 2013. — Vol. 1523. — P. 10-27.

292. Van Beveren C., van Straaten F., Curran T., Muller R., Verma I.M. Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini // *Cell*. — 1983. — Vol. 32. — P. 1241-1255.

293. van der Laan S., Meijer O.C. Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors // *European journal of pharmacology*. — 2008. — Vol. 585. — P. 483-491.

294. van Eekelen J.A., Bohn M.C., de Kloet E.R. Postnatal ontogeny of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor gene expression in regions of the rat tel- and diencephalon // *Brain research. Developmental brain research*. — 1991. — Vol. 61. — P. 33-43.

295. van Hasselt F.N., de Visser L., Tieskens J.M., Cornelisse S., Baars A.M., Lavrijsen M., Krugers H.J., van den Bos R., Joels M. Individual variations in maternal care early in life correlate with later life decision-making and c-fos expression in prefrontal subregions of rats // *PloS one*. — 2012. — Vol. 7. — P. e37820.

296. van Straaten F., Muller R., Curran T., Van Beveren C., Verma I.M. Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1983. — Vol. 80. — P. 3183-3187.

297. Vogel-Hopker A., Rohrer H. The specification of noradrenergic locus coeruleus (LC) neurones depends on bone morphogenetic proteins (BMPs) // *Development*. — 2002. — Vol. 129. — P. 983-991.

298. Wang C.C., Wang S.J. Modulation of presynaptic glucocorticoid receptors on glutamate release from rat hippocampal nerve terminals // *Synapse*. — 2009. — Vol. 63. — P. 745-751.

299. Wang X., DeFranco D.B. Alternative effects of the ubiquitin-proteasome pathway on glucocorticoid receptor down-regulation and transactivation are mediated by CHIP, an E3 ligase // *Mol Endocrinol*. — 2005. — Vol. 19. — P. 1474-1482.

300. Wang Z.Q., Ovitt C., Grigoriadis A.E., Mohle-Steinlein U., Ruther U., Wagner E.F. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos // *Nature*. — 1992. — Vol. 360. — P. 741-745.

301. Weaver I.C., Diorio J., Seckl J.R., Szyf M., Meaney M.J. Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 2004. — Vol. 1024. — P. 182-212.

302. Weaver I.C., Meaney M.J., Szyf M. Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that

are reversible in adulthood // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2006. — Vol. 103. — P. 3480-3485.

303. Wei P., Inamdar N., Vedeckis W.V. Transrepression of c-jun gene expression by the glucocorticoid receptor requires both AP-1 sites in the c-jun promoter // *Mol Endocrinol*. — 1998. — Vol. 12. — P. 1322-1333.

304. Welberg L.A., Seckl J.R. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain // *Journal of neuroendocrinology*. — 2001. — Vol. 13. — P. 113-128.

305. Welberg L.A., Seckl J.R., Holmes M.C. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring // *The European journal of neuroscience*. — 2000. — Vol. 12. — P. 1047-1054.

306. Whiteside G., Munglani R. TUNEL, Hoechst and immunohistochemistry triple-labelling: an improved method for detection of apoptosis in tissue sections--an update // *Brain research. Brain research protocols*. — 1998. — Vol. 3. — P. 52-53.

307. Wurst W., Bally-Cuif L. Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer // *Nature reviews. Neuroscience*. — 2001. — Vol. 2. — P. 99-108.

308. Wyrwoll C.S., Holmes M.C. Prenatal excess glucocorticoid exposure and adult affective disorders: a role for serotonergic and catecholamine pathways // *Neuroendocrinology*. — 2012. — Vol. 95. — P. 47-55.

309. Wyrwoll C.S., Mark P.J., Waddell B.J. Developmental programming of renal glucocorticoid sensitivity and the renin-angiotensin system // *Hypertension*. — 2007. — Vol. 50. — P. 579-584.

310. Xiao L., Feng C., Chen Y. Glucocorticoid rapidly enhances NMDA-evoked neurotoxicity by attenuating the NR2A-containing NMDA receptor-mediated ERK1/2 activation // *Mol Endocrinol*. — 2010. — Vol. 24. — P. 497-510.

311. Xiong F., Zhang L. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease // *Frontiers in neuroendocrinology*. — 2013. — Vol. 34. — P. 27-46.

312. Yamamoto K., Ruuskanen J.O., Wullimann M.F., Vernier P. Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain // *Molecular and cellular neurosciences*. — 2010. — Vol. 43. — P. 394-402.

313. Yehuda R., Fairman K.R., Meyer J.S. Enhanced brain cell proliferation following early adrenalectomy in rats // *Journal of neurochemistry*. — 1989. — Vol. 53. — P. 241-248.

314. Yu C.Y., Mayba O., Lee J.V., Tran J., Harris C., Speed T.P., Wang J.C. Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor binding regions in adipocytes reveal gene network involved in triglyceride homeostasis // *PloS one*. — 2010. — Vol. 5. — P. e15188.

315. Yudt M.R., Cidlowski J.A. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene // *Mol Endocrinol*. — 2002. — Vol. 16. — P. 1719-1726.

316. Zhong S., Quealy J.A., Bode A.M., Nomura M., Kaji A., Ma W.Y., Dong Z. Organ-specific activation of activator protein-1 in transgenic mice by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate with different administration methods // *Cancer research*. — 2001. — Vol. 61. — P. 4084-4091.

317. Zhou Q.Y., Quaife C.J., Palmiter R.D. Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development // *Nature*. — 1995. — Vol. 374. — P. 640-643.

318. Zimmermann H., Gardner D.S., Jellyman J.K., Fowden A.L., Giussani D.A., Forhead A.J. Effect of dexamethasone on pulmonary and renal angiotensin-converting enzyme concentration in fetal sheep during late gestation // *American journal of obstetrics and gynecology*. — 2003. — Vol. 189. — P. 1467-1471.

319. Zohar I., Weinstock M. Differential effect of prenatal stress on the expression of corticotrophin-releasing hormone and its receptors in the

hypothalamus and amygdala in male and female rats // Journal of neuroendocrinology. — 2011. — Vol. 23. — P. 320-328.

320. Zuloaga D.G., Carbone D.L., Handa R.J. Prenatal dexamethasone selectively decreases calretinin expression in the adult female lateral amygdala // Neuroscience letters. — 2012. — Vol. 521. — P. 109-114.