



МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЕНОМА КЛЕТОК

БОЖКО Г. Х.

НИИ неврологии и психиатрии им. В. П. Протопопова, Харьков

Обобщаются результаты исследований, свидетельствующие об универсальном значении активирования аденилатциклазной системы в действии всех известных нейромедиаторов и гормонов, включая стероиды и тиреоиды. Показано, что некоторые пептидные гормоны и катехоламины взаимодействуют с компонентами хроматина. В отдельных случаях обнаружены специфические участки связывания и рецепторы данного класса биологических регуляторов. Рассматриваются результаты исследований о поступлении катехоламинов в ядра нервных клеток и молекулярные механизмы их взаимодействия с компонентами хроматина. В хроматине норадреналин оказывает влияние преимущественно на уровне ДНК-белковых комплексов. Взаимодействие с ДНК и комплексами гистоны-негистоновые белки не может быть решающим в проявлении эффектов катехоламинов на функцию генома. Предполагается, что ответы клеток на действие катехоламинов включают два этапа: интегральное стимулирование при помощи аденилатциклазной системы и регуляцию активности индивидуальных генов в результате взаимодействия с внутриядерными структурами.

Достижения молекулярно-биологических исследований генома нервных клеток позволили приступить к выяснению молекулярных механизмов действия нейромедиаторов. При этом обнаружилось отсутствие принципиальных отличий в первичных (молекулярных) эффектах на геном регуляторов типа гормонов и нейромедиаторов. Напротив, отмечается их существенное подобие [1]. Это дает возможность при рассмотрении молекулярных механизмов действия нейромедиаторов привлекать экспериментальные данные и выводы, полученные в исследовании эффектов на геном типичных гормонов. Открывается перспектива создания общей теории регуляции генома на основе выявления единых закономерностей в действии гормонов и медиаторов на различные типы нервных и соматических клеток.

Цель настоящего обзора заключается в обобщении результатов, полученных при изучении молекулярных механизмов действия, главным образом, одного из нейромедиаторов—норадреналина. Обсуждается возможность его проникновения в ядра клеток и взаимодействия с компонентами хроматина. Отмеченные вопросы частично за-

трагивались в более ранних обзорах [1, 2]. Одна из недавних статей посвящена обобщению результатов влияния катехоламинов на синтез белков и нуклеиновых кислот [3]. Поэтому в обзоре подобные данные за редким исключением не рассматриваются.

Описание общих закономерностей гормонально-медиаторной регуляции приводится в монографии В. А. Ткачука, которую следует оценить как итог установившихся в этом направлении представлений [4]. Вместе с тем рассматриваемая проблема развивается настолько быстро, что уже ощущается противоречивость или неоднозначность не успевших стабилизироваться взглядов.

После того как была обнаружена роль аденилатциклазы и сАМР в опосредованном действии адреналина на стимулирование катаболизма углеводов и липидов, этот механизм экстраполировался на процессы регуляции генома с участием всех гормонов и нейромедиаторов. До недавнего времени господствовало мнение, что все известные гормоны и нейромедиаторы четко разделяются на два типа по способу регуляции активности генома клеток. Стероиды и тиреоиды проникают в ядра клеток и взаимодействуют с хроматином. Другие регуляторы гормонально-медиаторной группы в клетку не проникают; взаимодействуют с рецепторами плазматической мембраны, а дальнейшие эффекты на геном зависят от посреднической роли циклических нуклеотидов. Между тем выяснилось, что на активность аденилатциклазы способны влиять кортикостероиды и тироксин. Был обнаружен белок с величиной M_r 54 кД, представляющий собой регуляторную субъединицу протеинкиназы II, фосфорилирование которого зависит от стероидов и сАМР. Это дало основание заключить, что механизм действия как полипептидных гормонов, так и стероидов и тиреоидов связан с функцией аденилатциклазной системы [5]. В клетках гипоталамуса крыс добавление эстрадиола приводило к увеличению уровня сАМР. Теофиллин усиливал этот эффект, а ингибиторы α - и β -адренорецепторов препятствовали действию эстрадиола [6]. В лимбической области мозга обнаружено взаимодействие эстрогенов с рецепторами для норадреналина, сопряженными с аденилатциклазой [7]. Таким образом, универсальное значение сАМР как посредника действия гормонов существенно расширилось.

С другой стороны, можно считать твердо установленным, что для таких гормонов полипептидной природы как инсулин, помимо рецепторов, находящихся в плазматической мембране, присутствуют специфические участки связывания в ядре клетки. Описан механизм транспорта инсулина в ядра гепатоцитов и ядерные рецепторы, специфичные к инсулину в клетках печени. Эти данные настолько убедительны, что вошли в авторитетный учебник по биохимии [8]. Первичное действие пролактина так же, как инсулина, осуществляется не через аденилатциклазную систему. Этот пептидный гормон селективно усиливает транскрипцию казенновой мРНК и время ее полураспада (в 17—25 раз). Число подобных примеров постоянно возрастает. С полной

уверенностью к ним можно отнести эритропоэтин, который сначала способствует дифференцировке стволовых клеток крови по эритроидному пути, а затем индуцирует в эритроблестах синтез глобиновой мРНК. Характерно также действие соматотропина, один из ранних эффектов которого заключается в усилении синтеза рРНК, повышении активности ядрышковой РНК-полимеразы. Введение гормона роста приводит к уменьшению фосфорилирования негистоновых белков и увеличению фосфатных групп в гистонах. К числу низкомолекулярных гормонов, действующих через генетический аппарат клетки, непосредственно участвующих в регуляции синтеза РНК, относится большая группа гормонов растений—ауксины, гибберелины, цитокинины. Для них, как и для стероидов, показано существование рецепторных белков, ограниченное количество мест связывания на хроматине и прямое влияние на синтез РНК всех классов [9, 10].

Результаты экспериментов по изучению действия гормонов и нейромедиаторов, в том числе катехоламинов, на концентрацию сАМР и направленность изменений метаболизма белков и нуклеиновых кислот, связанную с соответствующим изменением уровня сАМР, весьма противоречивы. Наблюдались все возможные варианты—увеличение, уменьшение и отсутствие эффекта [11, 12]. Также далеко не однозначны данные по исследованию конечного этапа в цепи реакций, обусловленных активацией катехоламинами аденилатциклазы—процесса фосфорилирования белков [14]. Катехоламины способны изменять синтез белков и нуклеиновых кислот в самых различных типах эффекторных клеток, однако конкретные механизмы, точки приложения этих влияний, концентрационные зависимости, особенности эффектов в различных дифференцированных тканях остаются неизвестными.

Между тем можно с уверенностью сказать, что в пролиферирующих клетках стимуляция синтеза специализированных белков, РНК и ДНК не зависит от увеличения содержания сАМР. В пользу этого свидетельствуют следующие убедительные результаты экспериментов, выполненных на культивируемых клетках асцитной карциномы и хрящевой ткани куриных эмбрионов. При введении в инкубационную среду дибутирил-сАМР или сАМР вместе с ингибитором ФДЭ 3-изобутил-1-метилксантином было установлено, что причиной стимулирования белков и нуклеиновых кислот является внутриклеточный АТР из продуктов метаболизма сАМР [13].

Анализ молекулярных механизмов регуляции активности генома клеток катехоламинами с учетом накопленного к настоящему времени экспериментального материала приводит к следующим заключениям. сАМР далеко не единственный второй посредник в действии нейрогормонов. В этом качестве столь же существенна роль олиго-А, кальмодулина и Ca^{2+} . Эти и некоторые другие факторы формируют регуляторные циклы, согласованная работа которых обеспечивает оптимальную специализированную функцию клеток [2, 15]. Вероятно, что недооценка этого обстоятельства служит одной из причин неоднознач-

ности результатов экспериментов при исследовании изолированных циклических нуклеотидов (сАМР, сГМР).

Значение процессов сАМР-зависимого фосфорилирования в ядрах клеток для регуляции активности генома весьма ограничено. Существенную роль играет также сАМР-независимый перенос фосфатных остатков. В отдельных звеньях регуляторных систем, включающих сАМР, стимулирование процесса достигается при дефосфорилировании [16]. Недавно было установлено, что в клетках мозга протеинкиназная активность преимущественно сосредоточена в цитоплазме. В мембранной фракции активность киназ составляла 38%, и лишь 6,3% приходилось на долю клеточных ядер. В ядрах при увеличении содержания сАМР наблюдалось лишь незначительное стимулирование фосфорилирования в отличие от цитозоля, где оно возрастало в несколько раз [17]. Это согласуется с тем фактом, что в ядрах нейронов и других клеток присутствуют преимущественно сАМР-независимые протеинкиназы. сАМР-зависимые протеинкиназы характеризуются низкой субстратной специфичностью и могут фосфорилировать многие белки, в том числе и в хроматине, в состав которого входит около 500 индивидуальных белков. Причем они лучше катализируют фосфорилирование гистонов по сравнению с негистоновыми белками хроматина [16].

Фосфорилирование гистонов хроматина имеет значение для проявления эффектов катехоламинов и сАМР в индукции или ингибировании транскрипции. Известно, что диссоциация гистона Н1 является первым необходимым условием деконденсации хроматина. Этот процесс в свою очередь способствует началу транскрибирования ДНК. Вместе с тем фосфорилирование Н1 снижает его способность вызывать конформационные изменения в ДНК. Модифицированный Н1 связывается со многими или со всеми ДНК в препарате, а кооперативность его взаимодействия с ДНК нарушается. Показана корреляция между конденсацией хромосом в профазе митотического цикла и фосфорилированием Н1. Фосфорилированный при участии специфических киназ гистон более эффективно вызывает поперечные сшивки ДНК и агрегацию полинуклеотида, чем нефосфорилированный, что не согласуется с изменением величины положительного заряда его молекулы [18].

Механизмы регуляции генетического аппарата клеток с участием аденилатциклазной системы характеризуются невысоким уровнем специфичности. Усиление в результате гормонального эффекта функции индивидуальных генов или группы генов, кодирующих синтез белков одной ферментной системы, трудно представить в рамках классической схемы: активирование аденилатциклазы, синтез сАМР, стимулирование протеинкиназ, фосфорилирование хроматиновых белков. Возникает противоречие между относительно низкой специфичностью передаточного звена (сАМР) и высокоспецифическим ответом клетки—активацией определенного набора генов. Сигнал с плазматической мембраны передается на систему низкомолекулярных веществ, которые неспособны нести информацию, необходимую для высокоспецифической актива-

ции генов. В жировых клетках—адипоцитах увеличение концентрации сАМР достигается при действии, по крайней мере, восьми гормонов (АКТГ, глюкагон, адреналин и др.). Все они располагают собственными рецепторами, однако активируется при этом одна и та же аденилатциклаза [10].

Полагают, что катехоламины осуществляют свои специфические эффекты благодаря изменению компартментализации веществ в клетке. Это согласуется с их быстрым (порядка секунд или минут) действием. Однако в этом случае понятие компартментализации подменяется изменением проницаемости клеточных мембран. Катехоламины связываются с рецепторами, расположенными в плазматической мембране и открывают каналы пассивного транспорта ионов. Происходит перераспределение веществ в клетке или между клетками [4]. Синаптические эффекты катехоламинов несомненно сопровождаются изменением работы ионных каналов, в то время как регуляция функций генома не связана непосредственно с изменением проницаемости клеточных мембран. Естественно, при этом действие нейрогормона может лишь опосредованно влиять на синтез белков путем изменения обеспеченности систем белкового синтеза субстратами и энергией. Существенно, что сАМР-зависимое фосфорилирование направлено прежде всего на модификацию мембранных структур [4].

При активировании аденилатциклазной системы ускоряется или замедляется общий белковый синтез. Такая фаза в действии гормонов и нейромедиаторов наблюдалась в многочисленных экспериментах. В большинстве случаев стимулируется или индуцируется синтез *de novo* одновременно значительного количества различных белков, и повышается активность общего метаболизма [19]. Вероятно, что эти процессы обеспечивают подготовку клетки для реализации специфического эффекта нейромедиаторов и гормонов на геном и являются причиной хорошо известного для стероидов латентного периода, предшествующего синтезу индивидуальных мРНК. Вместе с тем следует предположить, что это лишь один из этапов нейрогормональной регуляции, подобный стрессу на клеточном уровне, неспецифической реакции готовности. Однако для клетки наиболее важна специфическая индукция и репрессия синтеза белков, то есть изменение концентрации лишь одного или нескольких белков при неизменной концентрации всех остальных [4]. Эта мысль все больше занимает исследователей. В отношении регуляции синтеза стероидов она формулируется таким образом, что вполне может быть распространена и на синтез белков. «Существует, по-видимому, два одинаково важных и согласованно работающих механизма активации стероидогенеза. Один из них опосредуется реакциями сАМР-зависимого фосфорилирования ферментов, а другой—изменением матричной активности генома» [4].

Одним из главных аргументов при обосновании необходимости вторичных посредников в механизмах действия катехоламинов считается наличие каскадной системы усиления сигнала этих нейрогормонов.

монов, поскольку физиологические их концентрации ($\sim 10^{-9}$ М) на один-два порядка ниже концентрации субстратов. При этом упускается из виду, по крайней мере, два существенных обстоятельства. Эффективная концентрация катехоламинов может быть значительно больше, чем 10^{-8} М. Например, в процессах проведения нервного импульса концентрация норадреналина в синаптической щели в момент выброса нейромеднатора составляет 10^{-4} — 10^{-3} М [20]. С другой стороны, хорошо известно, что действующие концентрации стероидов равны 10^{-10} — 10^{-8} М, то есть по порядку величин не отличаются от значений, характерных для норадреналина. Получается, что два класса гормонов, которым приписываются альтернативные механизмы регуляции активности генома, обладают одинаково важным качеством—присутствуют в клетках в близких друг другу концентрациях. Следовательно, выбор особенностей регуляции по этому признаку, предусматривающий усиление сигнала для одного вида гормонов и отсутствие такой необходимости для другого, выглядит неубедительно. Рассмотренные результаты дают основание предположить, что первичный ответ клетки на действие стероидов и катехоламинов осуществляется по типу стресс-реакции, вызванной активированием аденилатциклазной системы. Дальнейшие регуляторные эффекты этих биологически активных веществ на геном обуславливаются особенностями их химической структуры и реализуются на уровне хроматина: индуцируется транскрипция структурных генов, активных в данной специализированной клетке.

Как уже упоминалось, в результате сАМР-зависимого активирования протенинказ в хроматине фосфорилируются преимущественно гистоны. Эти белки представляют собой неспецифические интегральные ингибиторы транскрипции. Взаимодействие их с ДНК в отличие от негистоновых белков включает или выключает функцию участков генома в целом. Тонкая регуляция активности индивидуальных генов гистонами по многим причинам не может осуществляться. Модификация (фосфорилирование) гистонов должна вызывать сразу крупный генерализованный ответ генетического аппарата клеток. В пользу такого заключения свидетельствуют также данные о том, что введение животным сАМР в широком интервале концентраций вызывает стимуляцию синтеза в ткани головного мозга только рРНК и тРНК, в то время как синтез ядерных РНК АУ-типа даже угнетается. Иными словами, активируется предсуществовавшая программа новообразования макромолекул. Индукция синтеза мРНК отсутствует. Интересно, что противоположный эффект вызывает введение сСМР. В этом случае индуцируется накопление ядерных РНК АУ-типа (пре-мРНК) [14].

Показано, что повсеместно нервные и соматические клетки обладают рецепторами соответственно к различным нейромеднаторам и гормонам, причем, как правило, разнонаправленного действия. Осуществляется независимая регуляция определенных участков хроматина, а не модуляция одного гормона другим [21, 22]. Непонятно в этом случае, как реализуется специфичность регуляторных эффектов на геном от-

дельных катехоламинов, других нейромедиаторов и гормонов, если все они активируют аденилатциклазу. Трудно понять также, как происходит дифференциация физиологических ответов в таких клетках на основе механизмов, ограниченных взаимодействием эффектора с рецепторами плазматической мембраны. Известно, что специфичность определяется соответствующими рецепторами компетентных клеток, то есть гормон или нейромедиатор способен действовать на все ткани, а специфический эффект, проявляется только в клетках, располагающих нужным рецептором. Вместе с тем, поскольку синтез рецептора, как и других белков, кодируется нуклеотидными последовательностями ДНК, надо полагать, что специфичность регуляторных влияний обусловлена в конечном итоге свойствами генома.

Неизбежным следствием представлений о специфической роли сАМР в регуляции является необходимость допущения жесткой детерминированности структуры и функции генома. В какой-то мере, подразумевая дифференцировку тканей в многоклеточных организмах, структура нуклеогистонов действительно детерминирована и наследуется по эпигенетическому типу. Однако речь при этом может идти лишь о той структуре, функция которой затем уже будет регулироваться гормонами и нейромедиаторами. В этом случае нет оснований считать геном строго запрограммированным, поскольку в многочисленных экспериментах с эукариотическими клетками наблюдалось явление гормональной индукции [22].

Происходят качественные сдвиги в экспрессии генов—показано, например, что до введения эстрадиола в печени птиц специфические мРНК отсутствуют [9]. В эукариотических клетках синтезируется около 10^5 различных молекул ядерных РНК. При этом даже в специализированных секреторных клетках специфические для них мРНК составляют лишь незначительную часть ($\sim 0,1—0,7\%$), то есть для поддержания стационарного состояния (нужды самоуправления) необходимо подавляющее большинство транскрибируемых мРНК. Вместе с тем понятно, что гены внутреннего жизнеобеспечения клетки не могут быть детерминированы, так как должны реагировать на изменение многих факторов внутренней и внешней среды, а не только на один гормон или нейромедиатор. Против детерминированности генома свидетельствуют также данные о том, что разные гормоны в одних и тех же клетках могут активировать синтез различных белков [9, 10, 22]. Не было обнаружено у прокариот специфического связывания рецепторного для сАМР белка с ДНК. Этот белок способен связывать нативные ДНК самого различного происхождения: фаговую, тимуса теленка, спермы лосося, эритроцитов курицы. Наблюдалось также связывание с денатурированной ДНК и с одиночными нитями нерепликативной формы фаговой ДНК. Следовательно, избирательность в регуляции каких-то определенных генов при активации аденилатциклазы и в этой простой системе отсутствует [23].

Гормональная регуляция не обладает триггерными свойствами.

Наблюдается не включение или выключение определенной функции, а только ее усиление или ослабление [4]. Между тем этот принцип обесценивается, если считать, что специфичность гормонального сигнала определяется набором генов и белков, функционирующих в данных клетках [2, 4]. В этом случае оказывается, что достаточно клетке пройти этапы дифференцировки, а в дальнейшем уже не важно, какой сигнал химической или физической природы активирует ген. Получается, что нет необходимости в разнообразии гормонов, нейромедиаторов и т. д., так как ответ клетки жестко детерминирован. Между тем наблюдается согласованность физиологических эффектов адреналина и норадреналина и противоположно направленное влияние их на процессы трансляции, транскрипции и репликации. Это находит отражение в том, что адреналин угнетает митотическую активность, а норадреналин ее стимулирует. Вместе с тем оба эти катехоламина, способные активировать аденилатциклазу, выступают как агонисты α - и β -адренорецепторов. В присутствии же сАМР деление клеток подавляется [3]. Следовательно, должны быть рецепторы со знаком «+» и «-». Между тем понятно, что регулирующих белков должно быть меньше, чем структурных генов, иначе создается порочный круг, в котором за каждым структурным геном будет стоять бесконечная цепочка регуляторных белков и генов, контролирующих друг друга [10]. Рецепторы, таким образом, выступают в качестве молекул, лишь совершающих гормонально-медиаторную регуляцию. Предшественник синтеза катехоламинов—ДОФА оказывает выраженные эффекты на состояние макромолекулярных синтезов, отличающееся от действия катехоламинов, между тем специальные рецепторы для этой аминокислоты неизвестны [1]. Возбуждение адренергических β -рецепторов, что закономерно связано с повышением уровня сАМР, ингибирует митотическую активность, а возбуждение α -рецепторов стимулирует регенерацию печени [24]. В какой-то мере названные противоречия могут сглаживаться, если допустить, что высокие и низкие концентрации сАМР активируют различные классы протеинкиназ, обуславливающих, в свою очередь, даже противоположные эффекты на процессы пролиферации [5]. Однако объяснить специфичность действия различных гормонов и нейромедиаторов на основе одного и того же механизма (индукция синтеза сАМР) по-прежнему затруднительно. Отмечается неопределенность зависимости функции отдельных нейронов от состояния аденилатциклазной системы. Описаны эксперименты, в которых не удалось подтвердить подобие влияния норадреналина и сАМР на возбудимость нейронов [25].

Таким образом, участие аденилатциклазной системы в опосредовании действия на ген катехоламинов характеризуется в основном интегральными эффектами, что дает основание предполагать возможность регуляции генома клеток нейромедиаторами путем взаимодействия с ядерными структурами. Важным свидетельством этого было бы наблюдение изменения матричной активности хроматина изолиро-

ванных ядер в присутствии катехоламинов. Постановка таких опытов была затруднена тем, что оптимум pH активности РНК-полимераз находится вблизи pH 8,0, а катехоламины в этих условиях окисляются. Методические трудности удалось преодолеть, используя свойство цитозоля ингибировать самоокисление катехоламинов. В результате было установлено, что норадреналин вызывал увеличение синтеза мРНК [26]. Существенно, что изменение матричного ДНК-зависимого синтеза РНК в изолированных ядрах нейронов многократно воспроизводилось под влиянием нейромедиаторов (АХ, серотонин, ГАМК), молекулы которых более устойчивы по сравнению с норадреналином. Актиномицин D устранял эти эффекты нейромедиаторов [20, 27].

При рассмотрении механизмов регуляторного действия катехоламинов, предусматривающих их взаимодействие с внутриядерными структурами, необходимо располагать данными о проникновении нейромедиатора в клетки. В экспериментах с радиоактивно меченым норадреналином было обнаружено, что он легко транспортируется в изолированные ядра нервной ткани и связывается с различными фракциями хроматиновых белков [28]. Катехоламины проникают также в ядра различных типов культивируемых клеток [29—31]. Весьма существенно, что норадреналин способен связываться с белками хроматина и карิโอплазмы *in vivo* после введения в боковые желудочки мозга с интенсивностью, пропорциональной скорости синтеза соответствующих фракций. Получены результаты, указывающие на то, что меченый норадреналин связывается с вновь синтезированными белками хроматина, новообразование которых было индуцировано в результате интракраниального введения нейромедиатора. Исследование кинетики взаимодействия с различными ядерными структурами выявляет последовательность процесса движения нейромедиатора: уменьшение уровня метки в карิโอплазме соответствует ее увеличению в хроматине [28].

Практически весь норадреналин, содержащийся в карิโอплазме, находится в связанном состоянии с высокомолекулярными ее компонентами. В остаточном ДНК-протеиновом комплексе, белки которого наиболее вероятные претенденты на роль специфических регуляторов активности хроматина, норадреналин связывается с полипептидными компонентами, а не с ДНК.

Известно, что при рассмотрении специфичности взаимодействия нейромедиатора или гормона с рецепторами, учитывается блокирование связывания нейrogормона его химическими аналогами. Лучшими в этом смысле аналогами по сравнению с любыми агонистами или антагонистами являются стереоизомеры. Как выяснилось, значение величины связывания dl- и l-норадреналина с различными белковыми фракциями хроматина не было одинаковым. С ДНК-белковым комплексом l-изомер взаимодействовал в два раза интенсивнее, чем dl-препарат, то есть можно полагать, что величина связывания dl-норадреналина определялась количеством l-изомера в рацемической смеси. С белками карิโอплазмы l-изомер взаимодействовал в 7 раз интенсивнее, чем dl-но-

радреналин. Это, по-видимому, не зависело от различной проницаемости стереоизомеров норадреналина, так как величина связывания d1-препарата с гистонами и негистоновыми белками отличалась незначительно по сравнению с ДНК-белковым комплексом и материалом карноплазмы.

При изучении механизмов регуляции процессов транскрипции и репликации ДНК стероидными гормонами было обнаружено, что ингибиторы РНК- и ДНК-полимераз, действующие путем блокирования связывания этих ферментов с ДНК, препятствуют также взаимодействию гормон-рецепторных комплексов с хроматином [4]. Интересно, что взаимодействие 1-норадреналина с ДНК-белковым комплексом и белками карноплазмы в отличие от гистонов и фракции негистоновых белков полностью блокировалось актиномицином D при интракраниальном введении его вместе с нейромедиатором. Таким образом, эффект актиномицина D на взаимодействие норадреналина с хроматином подобен действию на связывание стероидных гормонов. Эти факты косвенно указывают на присутствие в ядрах клеток мозга рецепторов норадреналина и служат обоснованием для их поисков и выделения в виде индивидуальных белков [32].

Результаты молекулярно-биологических исследований свидетельствуют, что биологически активные вещества участвуют в регуляции активности генома, оказывая влияние на структуру ДНК, ДНК-белковые и белок-белковые взаимодействия в хроматине. В связи с этим при исследовании молекулярных механизмов действия норадреналина на генетический аппарат клеток изучали его эффекты на ДНК, комплексы ДНК-белок и гистоны-негистоновые белки. Было установлено, что норадреналин связывается с очищенными молекулами ДНК в результате ионных, водородных и гидрофобных взаимодействий. Данные ЯМР-спектроскопии свидетельствовали, что ковалентные связи или интеркаляция норадреналина между плоскостями оснований ДНК не наблюдаются [33, 34]. Избирательность взаимодействия норадреналина по отношению к различным классам очищенных поли- или мононуклеотидов отсутствовала, то есть реакция с ДНК была не специфической [35].

Макромолекулярная структура ДНК в присутствии норадреналина изменялась незначительно. Вместе с тем следует подчеркнуть, что при соблюдении условий, препятствующих окислению нейромедиатора, дефекты двойной спирали не возникают. Какие-либо признаки деградации ДНК не наблюдались [36, 37]. Отсюда следует, что реакция связывания норадреналина и ДНК не имеет сколько-нибудь существенно-го биологического значения [38]. Структура комплексов гистоны-негистоновые белки под влиянием норадреналина не изменялась. Таким образом, на уровне белок-белковых взаимодействий в хроматине норадреналин также не действует [39].

Результаты спектроскопии в оптическом и радиодиапазонах, а

также удаление радиоактивно меченного норадреналина после обработки нуклеопротеидов проназой, указывали на преимущественное взаимодействие нейромедиатора с белковыми компонентами хроматина. Изучение параметров тепловой денатурации ДНК-белковых комплексов показало, что норадреналин в концентрации 10^{-9} — 10^{-8} М вызывал нарушение связи ДНК-белок. В пользу этого свидетельствовали также эксперименты по гель-хроматографии, в результате которых удалось наблюдать частичную депротенинизацию этого комплекса в присутствии норадреналина. Существенно, что эффект обладал кооперативностью: одна молекула нейромедиатора была способна оказывать влияние на участок ДНК, лишь немногим уступающий по величине средним размерам генов. Возможно, что физиологические концентрации норадреналина достаточны для возникновения серьезных изменений в структуре хроматина [40, 41].

Было установлено, что необходимым условием для этого является наличие фенильных атомов кислорода в 3- и 4-ом положении бензольного кольца норадреналина, способных к образованию хелатных связей [42, 43]. На этом основании можно заключить, что в составе комплекса ДНК-белок норадреналин взаимодействовал не собственно с белками, а с двухвалентными катионами, при помощи которых белки связаны с ДНК, что согласуется с данными, свидетельствующими о большом значении этих катионов в формировании структуры хроматина. Связь гистонов с ДНК стабилизируется двухвалентными катионами, и при этом фиксируется определенная конформация двойной спирали [44]. Наблюдали связывание с ДНК индивидуальных негистоновых белков, опосредованное Me^{2+} [45]. Обработка хроматина комплексами приводит к его деконденсации [46]. ЭДТА—классический комплексон—подобно норадреналину изменял величину параметров тепловой денатурации ДНК и вызывал диссоциацию части белков в составе их комплекса с ДНК [40, 47]. Определение в нем содержания многовалентных катионов металлов показало, что эффективная концентрация катехоламинов и ЭДТА соответствует суммарному содержанию Mg^{2+} и Ca^{2+} [42]. Все это позволяет считать, что молекулярный механизм взаимодействия норадреналина с хроматином может включать изменение его свойств после нейтрализации названных катионов, что вызывает освобождение части белков, деконденсацию определенных участков хроматина, подготавливающих таким образом к началу транскрипции. Этот механизм согласуется с данными о том, что при умеренной транскрипции структурной области генов происходит удаление гистона H1 и части коровых гистонов, а при интенсивной—всех гистонов. Важно, что удаление H1—процесс кооперативный [48].

* * *

Изложенный в статье материал можно рассматривать как элементы теории гормонально-медиаторной регуляции катехоламинами активности генома эффекторных клеток. Катехоламины, связавшиеся с пост-

синаптической мембраной, активируют аденилатциклазу и стимулируют все последующие процессы интегральной стимуляции систем эффекторной клетки. Часть молекул реутилизируется путем обратного захвата. Одновременно норадреналин проникает внутрь иннервированной клетки и действует на хроматин по механизму, обеспечиваемому его хелатными свойствами. В этом важная роль принадлежит гидроксилсам в 3- и 4-ом положении ароматической части молекулы катехоламинов, при участии которых происходит также взаимодействие с адренорецепторами [43]. Установлено, что обработка ДНК-протеиновых комплексов катехоламинами и эстрогенами вызывала качественно идентичные изменения в их кривых плавления [49]. Обнаружено, что повторные инъекции катехоламинов так же, как стероидов, вызывают обычно более выраженные эффекты, чем первые [50]. Катехоламины, наряду со стероидными и тиреоидными гормонами, выступают в качестве регуляторов роста, развития, дифференцировки клеток [4, 51]. В отличие от быстрых эффектов указанных гормонов в процессах синаптической передачи, время развития этого их действия измеряется часами. Следует обратить также внимание на то обстоятельство, что тиреоидные гормоны и катехоламины являются производными одной и той же аминокислоты—тирозина. Все перечисленное свидетельствует в пользу предположения о наличии общих закономерностей в действии катехоламинов, стероидных и тиреоидных гормонов. Возможно, эти регуляторы действуют на клетки в два этапа, активируя вначале аденилатциклязную систему, а затем проникают в ядро и взаимодействуют с хроматином.

Выявленные закономерности и сформулированные представления не исчерпывают проблему изучения молекулярных механизмов действия катехоламинов, а являются лишь предпосылкой для дальнейших исследований в этом направлении.

MECHANISMS OF CATECHOLAMINE INVOLVEMENT IN THE REGULATION OF CELL GENOME ACTIVITY

BOZHKO G. KH.

Kharkov Research Institute for Neurology and Psychiatry, Ministry of Health, UkrSSR

The universal role of adenylate cyclase-cAMP system activation in the effect of all known classes of neuromediators and hormones is summarized. It has been established that some peptide hormones and catecholamines interact with chromatin. In some cases specific binding sites and receptors for biological regulators are described. Data concerning catecholamine penetration into nuclei of neurons and the molecular mechanisms of CA interaction with chromatin components are considered. It is shown that norepinephrine mainly affects DNA-protein complexes of chromatin. The catecholamine interaction with DNA and histone-

nonhistone complexes cannot be a decisive factor in the realization of ca effect on genome function. Cells response to CA action is supposed to include two steps: a general stimulation through cyclase system and the regulation of individual genes due to interaction with intranuclear structures.

ЛИТЕРАТУРА

1. Третьяк Т. М. Успехи физиол. наук, т. 9, № 4, с. 103—114, 1978.
2. Коветуани П. А. Нейрохимия, т. 1, № 4, с. 394—405, 1982.
3. Божко Г. Х. Пробл. эндокринологии, т. 30, № 2, с. 3—9, 1984.
4. Ткачук В. А. Введение в молекулярную эндокринологию, М., МГУ, 1983.
5. Феденко Е. П., Доман Н. Г. Успехи соврем. биол., т. 96, № 3 (6), с. 323—328, 1983.
6. Ganaga K. P., Menon K. M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 54, № 1, p. 440—448, 1973.
7. Mishra R., Sulger F. Biochem. Pharmacol., v. 30, № 22, p. 3126—3128, 1981.
8. Уайт Л., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р. Основы биохимии, т. 3, М., Мир, 1981.
9. Газарян К. Г., Тарантул В. З. Геном эукариот. Молекулярная организация и экспрессия, М., МГУ, 1983.
10. Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития, М., Наука, 1978.
11. Дорофеев Г. И., Кожемякин Л. А., Ивашкин В. Т. Циклические нуклеотиды и адаптация организма, Л., Наука, 1978.
12. Bloxman D. P., Klaipongpan A. Int. J. Biochem., v. 10, № 1, p. 1—5, 1979.
13. Симхович Б. З., Селина А. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 90, № 9, с. 320—322, 1980.
14. Хачатрян Г. С. Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга, Ереван, Айтастан, 1981.
15. Северин Е. С., Иткес А. В., Туницкая В. Л.—В кн.: Биохимические механизмы регуляции генетической активности, Киев, с. 119, 1984.
16. Kwiatkowska J. Post. Hig. Med. Dosv., v. 34, № 3, p. 169—187, 1980.
17. Кочетков С. Н., Северин Е. С. Биохимия, т. 49, № 2, с. 344—348, 1984.
18. Кучеренко Н. Е., Цудзевич Б. А., Блом Я. Б., Бабенюк Ю. Д. Биохимическая модель регуляции активности хроматина, Киев, Наукова думка, 1983.
19. Хесин Р. Б. Успехи соврем. биол., т. 74, № 2(5), с. 171—197, 1972.
20. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.
21. Сахаров Д. Л. Генеалогия нейронов, М., Наука, 1974.
22. Покровский Б. В. Успехи соврем. биол., т. 95, № 2, с. 194—208, 1983.
23. Nissley P., Anderson W. B., Gallo M. J. Biol. Chem., v. 247, № 13, p. 4264—4269, 1972.
24. Юдаев Н. А., Афиногенова С. А., Покровский Б. В. Успехи соврем. биол., т. 80, № 3(6), с. 351—369, 1975.
25. Lace N., Gordon L. M., Phillis J. W. Nature. New. Biol., v. 240, № 103, p. 248—250, 1972.
26. Елаев Н. Р. Пробл. эндокринологии, т. 27, № 1, с. 58—62, 1981.
27. Елаев Н. Р. Цитология, т. 20, № 10, с. 1173—1179, 1978.
28. Божко Г. Х., Краева В. С., Чурсина В. С. Докл. АН УССР, сер. Б, № 9, с. 58—60, 1983.
29. Axelsson S., Elofsson R., Falek B. Acta dermatovenerol., v. 58, № 78, p. 31—35, 1978.
30. Csaba G., Sudar F., Pados R. Endocrinologi, v. 76, № 3, p. 340—344, 1980.

31. Murakami H., Yamada K., Shirachata S. Agr. and Biol. Chem., v. 42, № 1, p. 45—48, 1978.
32. Божко Г. Х., Краева В. С.—В кн.: Биохимические механизмы регуляции генетической активности, с. 11—12, Киев, 1984.
33. Божко Г. Х., Веркин Б. И., Панишева Р. Н. Докл. АН УССР, сер. Б, № 6, с. 554—557, 1971.
34. Божко Г. Х., Веркин Б. И., Переверзев Н. П. Укр. біохім. журн., т. 44, № 4, с. 468—472, 1972.
35. Божко Г. Х., Веркин Б. И., Переверзев Н. П. Пробл. эндокринологии, т. 19, № 1, с. 76—78, 1973.
36. Божко Г. Х., Веркин Б. И., Емец Б. Т. Докл. АН УССР, сер. Б, № 4, с. 446—448, 1973.
37. Божко Г. Х., Бондаренко И. Б. Докл. АН УССР, сер. Б, № 4, с. 330—332, 1977.
38. Божко Г. Х. Вопр. мед. химии, т. 30, № 4, с. 12—16, 1984.
39. Божко Г. Х.—В кн.: Структура и функция клеточного ядра, с. 108—109, Пушино, 1984.
40. Благой Ю. П., Сорокин В. А., Божко Г. Х. Молекул. биология, т. 9, № 6, с. 812—819, 1975.
41. Божко Г. Х., Сорокин В. А., Каренина Т. И. Укр. біохім. журн., т. 50, № 2, с. 202—205, 1978.
42. Благой Ю. П., Сорокин В. А., Божко Г. Х. Молекул. биология, т. 10, № 5, с. 1011—1017, 1976.
43. Альберт Э. Избирательная токсичность, М., Мир, 1971.
44. Helene C. Nucl. Acids Res. v. 2, № 6, p. 961—969, 1975.
45. Kawasumi K., Izawa M. Mol. Biol. Repts., v. 3, № 2, p. 113—119, 1976.
46. Vengerov Yu., Popenko V. Nucl. Acids. Res., v. 4, № 9, p. 3017—3027, 1977.
47. Божко Г. Х., Доманский Н. Н., Пуйда Н. Г. Докл. АН УССР, сер. Б, № 6, с. 533—536, 1977.
48. Преображенская О. В., Карпов В. Л., Мирзабеков А. Д. Молекуляр. биология, т. 18, № 1, с. 8—20, 1984.
49. Choi M., Abramson M. B. Biochim. et biophys. acta, v. 540, № 2, p. 337—345, 1978.
50. Комиссаров И. В. Лекарственная регуляция адренергических процессов, Киев. Здоровье, 1976.
51. Aberer W., Kostron H., Huber E. Biochem. J., v. 72, № 3, p. 353—360, 1978.
52. Kirpekar S. M., Jarlia A. A., Prat J. C. Biochem. Pharmacol., v. 29, № 12, p. 3029—3031, 1980.
53. Стефанович Л. Е., Елисеева Л. С., Попова В. С. Биохимия, т. 47, № 8, с. 1370—1374, 1982.
54. Португалов С. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 85, № 4, с. 416—419, 1978.
55. Serota F., Baserga R. Science, v. 167, № 3923, p. 1018—1020, 1970.
56. Бузников Г. А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития, М., 1967.

Поступила 20. II 1985