



УДК 577.175.522+823:612.822

## ВЛИЯНИЕ НОРАДРЕНАЛИНА И СЕРОТОНИНА НА АКТИВНОСТЬ ДНКазы ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

ИВАНОВ В. А., СЕМЕНОВА Т. П., ТРЕТЬЯК Т. М., ГРОМОВА Е. А.

Институт биологической физики АН СССР, Пушкино

Ранее нами по оригинальной методике из головного мозга крыс была выделена отличающаяся от известных нуклеаз млекопитающих экзодезоксирибонуклеаза, которую не удается обнаружить в другой ткани этих животных [1]. Было показано, что фермент, названный ДНКазой «bgain III» (VIII), локализован в основном в ядрах нейронов. Мы предположили о его участии в процессах репарации ДНК [2], которая функционально вписана в сложнейший механизм ДНК-координации клеточных процессов и, как предполагается, может участвовать в обеспечении высших функций головного мозга [3, 4]. Детальное изучение ДНКазы VIII, биологическая роль которой связана, по-видимому, с тканеспецифическими функциями нейронов, представляется одним из возможных путей исследования функциональной специфики нервной ткани.

В предыдущем исследовании установлено существование определенного соотношения между активностью ДНКазы VIII и количеством нейромедиаторов в различных отделах головного мозга [5]. Целью данной работы явилось изучение влияния норадреналина (НА) и серотонина (5-ОТ) на активность ДНКазы VIII *in vitro*. Работу проводили на двух препаратах (П) фермента: П1—высокоочищенном электрофоретически гомогенном препарате [2] и П2—частично очищенном препарате, который был получен в результате гель-хроматографии растворимой фракции ядерных белков клеток головного мозга (фракция с величиной  $M_r$  60 кД, рисунок, [6]). Активность фермента определяли спектрофотометрически по приросту кислоторастворимых продуктов, как описано ранее [2, 6], белок—по методу Bradford [7], а ДНК—посредством дифениламиновой реакции [8]. Препараты П1 и П2 различаются субстратной специфичностью; П1 высокоспецифичен к одноцепочечной ДНК (ОЦ-ДНК): его активность с двухцепочечной ДНК (ДЦ-ДНК) в качестве субстрата составляет менее 0,1% от активности с ОЦ-ДНК [2, 6]. В этих же условиях реакции активность П2 с ДЦ-ДНК составляет 25%.

Установлено, что нейромедиаторы действуют на эти препараты фермента различным образом. Ни НА, ни 5-ОТ (в концентрациях от  $10^{-9}$  до  $10^{-3}$  М) не влияли на активность высокоочищенного препарата П1 с ОЦ-ДНК в качестве субстрата. При этом можно было регистрировать лишь ингибирующее действие нейромедиаторов на активность фермента, поскольку одноцепочечный субстрат в процессе реакции претерпевает «исчерпывающий» гидролиз [6], и дальнейшее увеличение кислоторастворимых продуктов, очевидно, не может быть индуцировано. В то же время в реакциях с ДЦ-ДНК в присутствии НА в достаточно высокой концентрации ( $\geq 10^{-5}$  М) активность П1 возрастала и достигала (при концентрации  $\sim 10^{-3}$  М) его активности с ОЦ-ДНК. Такой результат поз-

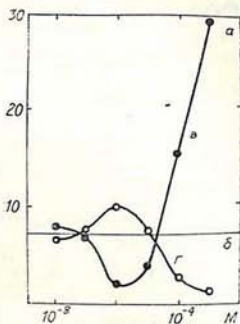


Рис. Влияние норадrenalина и серотонина на активность частично очищенного препарата ДНКазы VIII. Реакция с одноцепочечной (ОЦ-) (а) и двухцепочечной (ДЦ-) (б) ДНК в качестве субстрата без нейротрансмиттеров. Реакция с ДЦ-ДНК в присутствии НА (в) или 5-ОТ (г). Величина У.А. выражена в мкг превращенного субстрата/ч/мг белка в пробе

воляет допускать, что, во-первых, сама молекула фермента не претерпевает функциональных модификаций под влиянием этих нейромедиаторов, и, во-вторых, свободные концы полинуклеотида в одноцепочечных разрывах ДЦ-ДНК, которые образуются в результате действия НА [9], могут являться эффективными субстратными точками для атаки ДНКазы VIII. Правомерность такого вывода основывается на данных, полученных нами ранее, по действию ДНКазы VIII на предварительно «активированную» ДНКазой I ДЦ-ДНК. Было показано, что ДЦ-ДНК, содержащая ограниченное число одноцепочечных разрывов, может быть атакована ДНКазой VIII [2].

При использовании частично очищенной ядерной фракции белков в качестве источника ДНКазы VIII (препарат П2) был получен другой результат. Такой препарат, в отличие от П1, в стандартных условиях реакции обладал значительной активностью с ДЦ-ДНК в качестве субстрата. Было обнаружено, что присутствие НА ( $\sim 10^{-6}$  М) ингибировало (почти в 3 раза), а 5-ОТ ( $\sim 10^{-6}$  М) повышало активность фермента на  $\sim 40\%$  (рисунок, таблица). Такие эффекты обусловлены, вероятно, действием компонентов, присутствующих в неочищенном препарате П2. Вероятно, эти компоненты имеют белковую природу, поскольку в процессе дальнейшей очистки фермента его ДНК-субстратная специфичность изменяется.

Полученные данные позволяют предполагать, что нейромедиаторы осуществляют регуляторное влияние на активность ДНКазы VIII не прямым взаимодействием с молекулами фермента, а, по-видимому, через белковые компоненты, которые, возможно, непосредственно участвуют в функциональной регуляции активности фермента *in vivo*. Такое предположение соответствует известному представлению о том, что НА и 5-ОТ могут выполнять как нейромедиаторную, так и нейромодуляторную функции. Влияние нейромедиаторов на нуклеазную реакцию показано также другими авторами при исследовании регуляторных свойств РНК-полимеразы больших полушарий головного мозга крыс [10]. Следует заметить, что применение указанными авторами очищенного препарата фермента также привело к потере регуляторных свойств.

Таблица

Относительная активность частично очищенного препарата ДНКазы VIII (%) в присутствии норадреналина (НА) или серотонина (5-ОТ) с двухцепочечной ДНК в качестве субстрата

Концентрация нейротрансмиттера (М)	НА	5-ОТ
—	100*	100*
$10^{-8}$	105	98
$10^{-7}$	97	103
$10^{-6}$	34	137
$10^{-5}$	56	104
$10^{-4}$	206	37
$10^{-3}$	391	16

Примечание. \*за 100% принята активность препарата без нейротрансмиттера.

В связи с изучением функциональной регуляции ДНКазы VIII наибольший интерес вызывает исследование влияния малых (физиологических) концентраций нейромедиаторов на активность фермента. Региональный анализ нейромедиаторов в мозгу крыс на основании литературных и наших собственных данных дает возможность вычислить их молярную концентрацию *in vivo* в расчете на единицу объема мозга [11]. Она составляет  $10^{-6}$ — $10^{-3}$  М. В данной работе показано, что нейромедиаторы модулируют активность ДНКазы VIII в препарате П2 различным образом по мере увеличения их количества в реакционной пробе. В концентрациях  $\leq 10^{-7}$  М они не действуют на фермент (одинаковый эффект); увеличение концентраций до  $10^{-6}$  М сопровождается активирующим (5-ОТ) или ингибирующим (НА) влиянием (противоположный эффект); дальнейший рост концентраций ( $\geq 10^{-4}$  М) приводит к обращению действия нейромедиаторов, при этом они оказывают опять же противоположное влияние на активность фермента (рисунок, таблица). Установлено также, что серотонин- и норадреналинергические системы мозга оказывают противоположное влияние на скорость синтеза нейроспецифических белков в ряде мозговых структур: неокортексе, гиппокампе и стриатуме [12]. Подобная разнонаправленность эффектов данных медиаторных си-

ством на молекулярном уровне может лежать в основе проявления реципрокности влияний серотонин- и норадреналинергических систем мозга в регуляции обучения и эмоционального поведения животных [13, 14].

## EFFECT OF NORADRENALINE AND SEROTONIN ON THE ACTIVITY OF RAT BRAIN DNase

IVANOV V. A., SEMYONOVA T. P., TRET'YAK T. M., GROMOVA E. A.

Institute of Biological Physics, USSR Acad. Sci., Poustchino

Effects of epinephrine and serotonin on the brain deoxyribonuclease, DNase BIII activity have been studied. It was established that the effect depends on a concentration of the neurotransmitters. This result may be due to a double function of epinephrine and serotonin which are known to exert both neurotransmitter and neuromodulator function.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов В. А., Третьяк Т. М. Успехи соврем. биол., т. 101, с. 174—187, 1986.
2. Ivanov V. A., Gaziev A. I., Tret'yak T. M. Eur. J. Biochem., v. 137, p. 517—522, 1983.
3. Ашапкин В. В., Романов Г. А., Тушмалова Н. А., Ванюшин Б.Ф. Биохимия, т. 48, с. 355—362, 1983.
4. Васильева В. К., Мейерсон Ф. Э. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 94, с. 63—64, 1982.
5. Иванов В. А., Третьяк Т. М., Семенова Т. П. III Всесоюзн. конф., посвященная Коштыяицу Х. С. «Физиология и биохимия медиаторных процессов», с. 84, М., 1980.
6. Иванов В. А., Терпиловская О. Н., Третьяк Т. М., Смирнова Г. Н. Биохимия, т. 47, с. 398—404, 1982.
7. Bradford M. M. Anal. Biochem., v. 72, p. 248—254, 1976.
8. Croft D. N., Lubraz M. Biochem. J., v. 95, p. 612—620, 1965.
9. Yamafuji K., Itaya S., Murakami H. Enzymologia, v. 42, p. 439—447, 1972.
10. Нечасова Г. А., Шелепина Е. П. Укр. биохим. журн., т. 51, с. 455—458, 1979.
11. Семенова Т. П., Иванов В. А., Третьяк Т. М. Журн. высш. нервн. деят-сти, т. 29, с. 640—642, 1979.
12. Громова Е. А., Вартамян Г. А., Семенова Т. П., Ли О. Н., Нестерова И. В., Клементьев Б. И., Степанов И. И. Докл. АН СССР, т. 246, с. 509—512, 1979.
13. Громова Е. А.—В кн.: Эмоциональная память и ее механизмы, с. 91—128, М., Наука, 1980.
14. Громова Е. А., Семенова Т. П., Чубаков А. Р., Бобкова Н. В. Реципрокность взаимоотношений серотонинергической и норадреналинергической систем мозга и ее значение для регуляции поведения в норме и патологии, Пушкино, препринт, 1985.

Поступила 16. I 1988