

ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
Բ Ի Ո Ք Ի Մ Ի Ա Յ Ի Ի Ն Ս Տ Ի Տ Ո Ւ Տ

ՈՒՂԵՂԻ
ԲԻՈՔԻՄԻԱՅԻ
ՀԱՐՑԵՐ



ԽՄԲԱԳՐՈՒԹՅԱՄԲ՝ Ա.Ա.ԳԱԼՈՅԱՆԻ

ԵՐԵՎԱՆ

1 9 7 8

ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԱ ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ

АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ

ВОПРОСЫ БИОХИМИИ МОЗГА

ПОД РЕДАКЦИЕЙ А.А. ГАЛОЯНА



ЕРЕВАН

1978

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ НЕЙРОПЕПТИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Г. С. ХАЧАТРЯН

Лаборатория биосинтетических реакций мозга и кафедра биохимии Ереванского
медицинского института

Раскрытие основных механизмов генетической информации, одного из величайших достижений естествознания последних 20 лет [1—4], поставило на повестку дня проблемы изучения природы систем, блокирующих и включающих генную активность [5—7], механизмов эпигенетических систем, внутри- и внеклеточных факторов, ответственных за дифференциацию тканей, молекулярных механизмов памяти [8—16] и других высших функций головного мозга [18—20].

Еще в шестидесятые годы получила подтверждение гипотеза относительно репрессоров в качестве если не единственных, то регуляторных факторов, непосредственно воздействующих на геном. Однако в дальнейшем выяснилось, что действительное положение гораздо сложнее, чем думали об этом первооткрыватели [21]. Был выявлен целый ряд факторов, специфически управляющих деятельностью репрессоров, названных эффекторами. Основное свойство эффекторов — способность резко менять сродство репрессора к оператору. Когда репрессор связан с оператором, он создает препятствие для движения *РНК*-полимеразы от промотора к структурным генам и транскрипция тормозится. Отделение репрессора разрешает транскрипцию.

В силу сложной архитектоники и высокой дифференциации клеток у высших животных появляется весьма существенное отличие в генетической информации, в том числе и транскрипции. Усложнение процессов транскрипции и ее регуляции в клетках эукариотов допускает также усложнение механизмов репрессии и дерепрессии. Если допустить, что репрессорный механизм в эволюционном отношении в основном сохраняется, то эффекторами могут служить не только прямые метаболиты, но и регуляторные низкомолекулярные соединения типа гормонов, транмиттеров, внутриклеточных медиаторов, а также высокомолекулярные соединения, в том числе белки и нуклеиновые кислоты.

Физиологические состояния ЦНС базируются на рецепторных перестройках, транмиттерной мобилизации и внутриклеточной медиации сигналов информации, в которых участвуют многие биологически актив-

ные вещества, в том числе гормоны, циклические нуклеотиды и другие физиологически активные вещества.

Наши поиски в изучении влияния эффекторов на генетический аппарат мы начали с циклических нуклеотидов, исходя из их важной физиологической роли в процессах контроля роста, пролиферации и метаболизма [5, 7, 22], а также в стимуляции активности ядерной *РНК*-полимеразы посредством их фосфорилирования циклическими нуклеотид-зависимыми протеинкиназами [23—26]. Наши эксперименты, а также некоторые литературные данные дали основание выдвинуть гипотезу [5], согласно которой 3',5'-АМФ и 3',5'-ГМФ могут действовать как метаболические сигналы для индукции генной активности на биосинтез ядерных *РНК* (в случае 3',5'-АМФ-биосинтез я-*РНК* ГЦ типа, а в случае 3',5'-ГМФ—биосинтез я-*РНК* АУ типа) и их транспорта в цитоплазму.

В механизме индукции транскрипции циклическими нуклеотидами не исключалась также возможность участия и взаимодействия других факторов транскрипции, в том числе ацетилированных гистонов, полиаминов и активных пептидов, точки приложения которых до сих пор не выяснены.

Изучая биологический эффект полиаминов на метаболизм *РНК* и гистонов, Морucci др. [27] высказали предположение, что модификация гистонной структуры и ацетилирование специфической лизиновой ϵ -аминогруппы могут явиться механизмом, обеспечивающим взаимодействие гистонов и *ДНК*. И действительно, этот эффект оказался ускоренным и предшествовал биосинтезу *РНК*. При этом изменений в хроматиновых негистоновых белках не наблюдалось. Сеилер и др. [28], изучая соотношение полиаминов и концентрации нуклеиновых кислот в растущем организме рыбы, наблюдали прямую зависимость между весом мозга, путресцином, спермидином, *РНК* и белком, тогда как в отношении веса мозга, *ДНК* и спермина была выявлена непрямая зависимость.

На основании этих данных авторы пришли к выводу о возможном существовании функциональных или структурных взаимоотношений между спермином и *ДНК* и спермидином и *РНК*. Стивенс [29] считает, что полиамины могут взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами для стабилизации молекул *ДНК* и связывания *p-РНК*. С другой стороны, как спермин, так и спермидин способны стимулировать активность некоторых ферментов, вовлеченных в синтез нуклеиновых кислот, в том числе *РНК*-полимеразы.

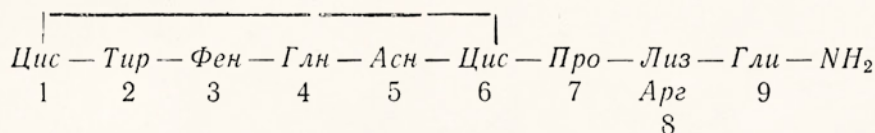
В свете этих данных, а также других работ возникла идея относительно роли активных пептидов, в особенности нейропептидов и других гормонов пептидной природы, в контроле клеточного роста и пролиферации.

Отправными данными для исследования эффекта введенных в организм (внутрибрюшинно и внутрицистернально) нейропептидов и их аналогов на обмен нуклеиновых кислот послужили три группы работ. Это работы Господаровиц [30], показавшие индуцирующее влияние поли-

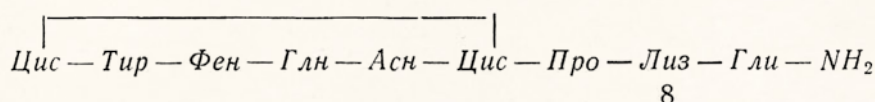
пептида, выделенного из мозга, на рост фибробластов и многих других клеток в культуре. Этот эффект значительно усиливался в присутствии гидрокортизона. Второй группой работ из этой области являлись исследования относительно усиления активирующего влияния ГТФ на аденилатциклазу посредством простагландинов, тиростимулирующего гормона, глюкагона, изопротеренола, окситоцина и адреналина [31—34]. По мнению этих исследователей, влияние гормонов пептидной природы на рост клеток заключается в том, что они повышают уровень 3', 5'-ГМФ в клетках. Они также повышают содержание 3', 5'-АМФ, но сравнительно меньше посредством возрастания активности гуанилатциклазной и аденилатциклазной реакций. Третьей группой работ из области изучения роли нейропептидов в биохимической характеристике деятельности мозга являются исследования Вальтера и сотр. из Чикаго [35], в которых было показано, что лизин-вазопрессин (ЛВП) и его пять аналогов — ДГЛВП, ТриГЛИЛВП, деамино-ЛВП, Лей⁴-ЛВП и АСН¹⁶, ЛВП оказывают воздействие на процессы памяти. Все эти аналоги заметно чувствительно снимают или уменьшают пуромининдуцированную амнезию (потерю памяти, вызванную пуромином, введенным внутричерепной инъекцией; пептиды вводились подкожно через 24 часа после инъекции пуромина).

К этой группе относятся также работы А. А. Галояна [36] относительно кардиотропного действия нейропептида, выделенного из гипоталамуса и охарактеризованного им как гексапептид. Автор синтезировал N-ацетил-гексапептид и показал, что это вещество в 10 раз активнее, чем неацетилированный гексапептид.

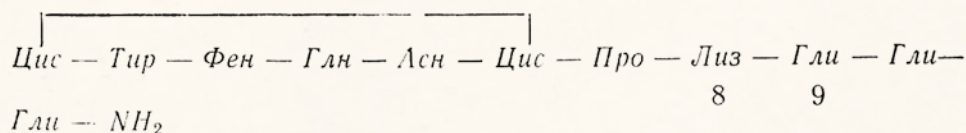
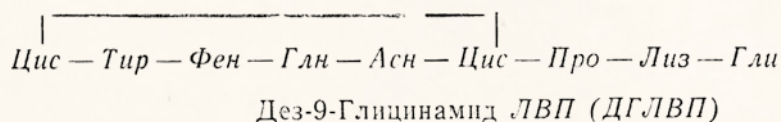
Ниже приводится строение применяемых нами аналогов вазопрессина млекопитающих и гексапептидов.



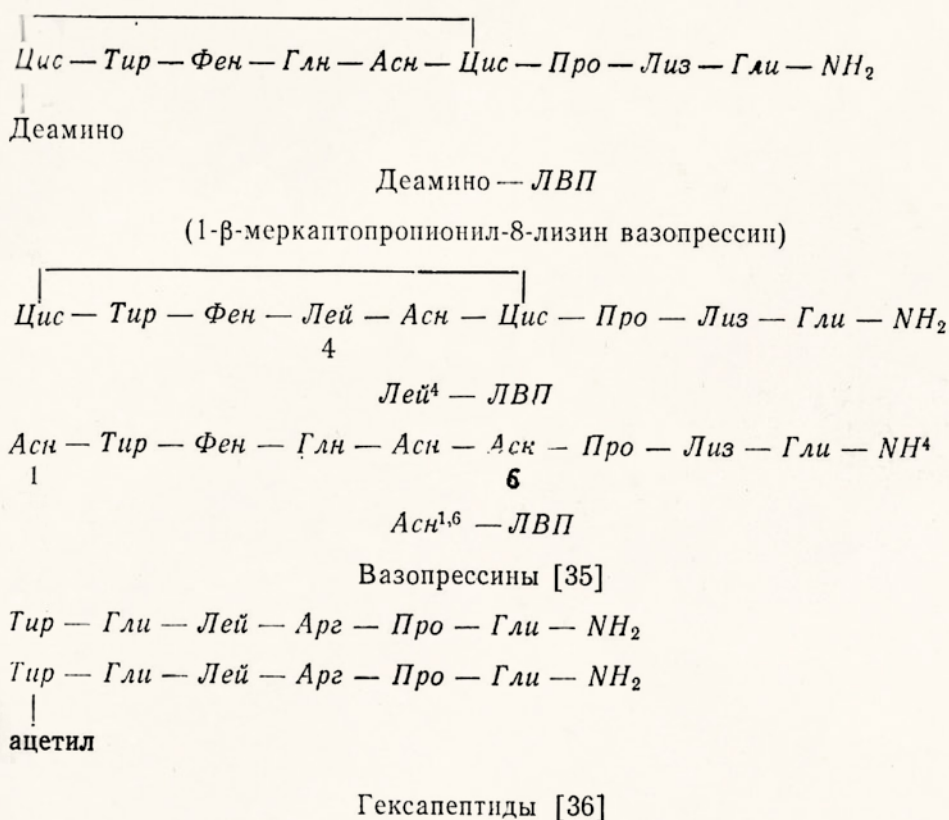
Вазопрессины (ВП) млекопитающих



8-Лизин вазопрессин (ЛВП)



Три-ГлиЛВП



Нами изучалась количественная характеристика различных классов *РНК* в головном мозгу под влиянием пяти аналогов лизин-вазопрессина, любезно представленных профессором Иллинойского университета (США) Вальтером [35], и 2 кардиотропных гексапептида (ацетилированный и неацетилированный), представленных Галояном. Пользуясь случаем, выражаю им свою признательность.

Исследования проводились на белых крысах. Аналоги лизин-вазопрессина вводились внутрицистернально и внутрибрюшинно в концентрации 50 и 100 $\mu\text{кг}$ на 150 г веса животного. Гексапептид вводили тем же путем в концентрации 0,1 и 1 мкг /150 г веса. Через 30 и 60 мин после введения указанных нейропептидов (аналогов лизин-вазопрессина и гексапептидов) подопытных животных замораживали в жидком азоте и в условиях холодной комнаты исследовали мозг на содержание различных классов РНК. Единовременное выделение, очистка и количественное определение различных классов РНК (я-РНК ГЦ и АУ типов, р-РНК, т-РНК проводили комбинированным методом [11] фенольной экстракции, дифференциальной ультрацентрифугации и гельфильтрации с последующей ультрафиолетовой спектроскопией, разработанным в нашей лаборатории (рис. 1) на основании работ Кирби [37], Сибатани [38], Г. П. Георгиева и др. [39], Шнейдера [40], Хогбума [41], Дельвега [42] и др.



Рис. 1. Схема выделения и количественного определения различных форм РНК в мозгу комбинированным методом фенольной экстракции, дифференциальной ультрацентрифугации и гельфильтрации.

Как показывают приведенные данные (табл. 1), ДГЛВП 50 мкг/150 г веса значительно (почти вдвое) повышает содержание р-РНК. Удвоенная концентрация пептида вызывает повышение содержания не только р-РНК (более чем в два раза), но и т-РНК. Другой аналог ЛВП-ТриГЛИЛВП вызвал повышение содержания как р-РНК, так и я-РНК АУ-типа. Сравнительная характеристика действия этих двух аналогов ЛВП показывает, что ДГЛВП оказывает более сильный эффект на количественные сдвиги в содержании р-РНК, чем ТриГЛИЛВП. Испытание действия деамино-ЛВП (1-β-меркаптопропионил-лизинвазопрессин) выявило другой, отличный от первых двух нейропептидов (ДГЛВП и ТриГЛИЛВП) эффект значительного увеличения содержания я-РНК АУ-типа (почти в два раза). При этом количество р-РНК особым изменениям не подвергалось. Лей⁴-ЛВП также вызывает значительное (почти в два раза) повышение содержания р-РНК. Менее эффективным оказался Асн^{1,6} — ЛВП. При действии последнего нейропептида содержание исследуемых РНК особым изменениям не подвергается.

При испытании различных концентраций предложенного Галояном гексапептида от 0,1 до 4 мкг/150 г наибольший эффект на повышение содержания различных классов РНК был выявлен при действии меньших доз. Большие концентрации гексапептида оказывали ингиби-

Таблица 1

Содержание различных классов РНК (в мкг/г) в мозгу при внутримозговом введении аналогов 8-лизинвазопрессина

Класс РНК	Конт- роль	ДГЛВП		Три-Г-ЛИЛВП		Дезино-ЛВП		Лей ^{1,6} -ЛВП		Асн ^{1,6} -ЛВП			
		на 30 мин		на 30 мин		на 30 мин		на 30 мин		на 30 мин			
		50	100	50	100	50	100	50	100	50	100		
концентрации внутривитеринально вводимых аналогов ЛВП в мкг/150 г веса животного													
я-РНК ГЦ типа	71,02 ±2,79	30,0 ±2,63	45,0 ±5,78	30,0 ±2,11	21,0 ±1,17	24,0 ±1,80	20,0 ±1,35	14,0 ±0,45	12,0 ±0,59	21,0 ±1,11	21,0 ±1,40	6,0 ±0,24	
	272,40 ±3,97	207,0 ±6,54	250,0 ±6,54	343,0 ±5,81	302,0 ±7,33	469,0 ±8,9	576,0 ±7,73	157,0 ±5,20	282,0 ±7,24	267,0 ±8,60	214,0 ±6,73	384,0 ±10,32	
	1214,26 ±8,87	2161,0 ±18,50	2760,0 ±15,91	1622,0 ±13,76	1764,0 ±11,71	1305,0 ±10,07	1253,0 ±9,26	2318,0 ±19,32	1612,0 ±11,92	1116,0 ±9,76	1520,0 ±13,92	1443,0 ±10,45	
т-РНК	287,0 ±8,12	330,0 ±9,42	550,0 ±6,91	272,0 ±7,37	304,0 ±7,56	425,0 ±8,31	435,0 ±7,06	198,0 ±9,23	164,0 ±8,55	272,0 ±5,84	198,0 ±1,05	138,0 ±7,43	
	1844,87	2728,0	3575,0	2267,0	2391,0	2223,0	2284,0	2687,0	2070,0	1676,0	1953,0	1971,0	
Общая РНК	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Число опытов*													

* В каждом опыте использовано 5 экспериментальных животных

рующее влияние на биосинтез РНК мозга, в частности 1—4 мкг/150 г. Поэтому наши исследования мы проводили с гексапептидом в концентрации 0,1 мкг/150 г. Приведенные данные (табл. 2) показывают, что кардиотропный гексапептид в концентрации 0,1 мкг/150 г веса вызывает достоверное повышение содержания *я-РНК* АУ-типа, *р-РНК* и *т-РНК*, в то время как количество *я-РНК* ГЦ-типа уменьшается. Большие дозы гексапептида (1 мкг/150 г), повышая содержание *р-РНК* на 60 мин, вызвали понижение содержания других форм РНК.

Таблица 2

Содержание различных классов РНК (в мкг/г) в мозгу при внутрицистернальном введении гексапептида и его ацетилпроизводного

Класс РНК	Контроль	Гексапептид			Ацетилгексапептид	
		на 30 мин	на 60 мин	на 30 мин	на 60 мин	
		Концентрации гексапептидов в мкг/150 г веса				
		0,1	1,0	0,1	0,1	0,1
я-РНК ГЦ-типа	71,02±2,79	39,0±2,10	31,0±1,75	17,0±0,62	11,0±0,67	19,0±0,86
я-РНК АУ-типа	272,2±3,97	316,0±6,14	240,0±4,44	232,0±7,35	405,0±7,73	310,0±13,14
р-РНК	1214,26±8,87	1425,0±13,92	1560,0±14,58	1536,0±11,97	1560,0±12,84	1630,0±2,64
т-РНК	287,0±8,12	303,0±8,68	172,0±5,96	336,0±8,21	480,0±9,11	334,0±6,81
Общая РНК	1844,87	2083,0	2003,0	2121,0	2456,0	2293
Число опытов*	8	8	8	8	8	8

* В каждом опыте использовано 5 экспериментальных животных

При сопоставлении этих данных с данными экспериментов с применением аналогов ЛВП мы можем констатировать, что они, по всей вероятности, оказывают воздействие на нуклеиновый обмен мозга как сходными, так и отличными путями и при совершенно несравнимых концентрациях. Гексапептид свое влияние оказывает при в 500 и 1000 раз меньшей концентрации по сравнению с действиями аналогов ЛВП. Во-вторых, количественные сдвиги в содержании различных классов РНК мозга при действии ряда аналогов ЛВП оказываются более ощутимыми, чем при действии гексапептида. Весьма интересно, что действие ацетилированного гексапептида, в отличие от гексапептида, вызывает совершенно другой эффект, значительно индуцируя биосинтез *я-РНК* АУ-типа. Как показывают данные таблицы, ацетилированный гексапептид, наряду с повышением содержания *р-РНК* почти до уровня, вызванного свободным гексапептидом, на 30 мин значительно (почти в два

раза) повышает содержание *я-РНК* *АУ*-типа и *т-РНК*, в то время как количество *я-РНК* *ГЦ*-типа оказывается резко пониженным (более чем в 7 раз). Характерный эффект ацетилгексапептида на нуклеиновый обмен был отмечен также на 60-й *мин*, однако по сравнению с данными 30 *мин* исследования он оказался менее выраженным. Таким образом, ацетилпроизводное гексапептида в регуляции обмена *РНК* мозга оказалось более эффективным, чем свободный пептид.

На основании анализа результатов, полученных нами при изучении влияния нейропептидов на обмен нуклеиновых кислот мозга, изученные нейропептиды по эффекту их действия можно подразделить на 3 группы: нейропептиды, которые стимулируют биосинтез только *р-РНК*, быть может и *т-РНК* (*ДГЛВП*, *Лей⁴-ЛВП*, кардиотропный гексапептид); нейропептиды, стимулирующие биосинтез как *р-РНК*, так и *и-РНК* (*дезамино-ЛВП*, *Три-ГлиЛВП*, кардиотропный ацетилгексапептид) и нейропептиды, которые не оказывают специфического влияния на регуляцию биосинтеза *РНК* мозга (*Асн^{1,6} — ЛВП*).

Основной вопрос, который встает перед специалистами психомолекулярной и молекулярной биологии, а также нейрохимии при рассмотрении механизмов регуляции биосинтеза нуклеиновых кислот в мозгу, — это вопрос механизма приложения нейропептидов и других индукторов при транскрипции. Заключается ли их роль в осуществлении функции первичного мессенжера в индукции 3', 5'-циклический-нуклеотид синтезирующих и протеинкиназных реакций, направленных на активацию *РНК*-полимераз, или же она сводится к непосредственному участию в промоторном участке геномы в качестве эффектора для изменения сродства репрессора к оператору для снятия препятствия при движении *РНК*-полимеразы от промотора к структурным генам? Нам представляется, что нейропептиды могут реализовать свое действие как в роли первичного мессенжера, так и в роли эффектора, участвующего непосредственно в генетическом аппарате. Об этом говорят также немногочисленные данные литературы относительно ацетилированных гистонов и полиаминов в качестве непосредственных эффекторов индукции инициации транскрипции. Об этом же говорят данные литературы о роли гормонов, и в особенности многих нейрогормонов, в качестве первичного мессенжера в реакциях локального протеолиза и фосфорилирования белков-ферментов в механизме их активации, в том числе и активации *РНК*-полимеразы. Если принять эту трактовку в качестве рабочей схемы для интерпретации полученных нами данных, то возникает другой вопрос, чем объяснить неодинаковое действие различных нейропептидов на индукцию биосинтеза различных классов *РНК* мозга? Почему одни нейропептиды вызывают индукцию биосинтеза *р-РНК*, а другие — как *р-РНК*, так и *т-РНК*? Для ответа на поставленные вопросы мы обратимся к новейшим данным литературы по классификации и номенклатуре и некоторым кинетическим характеристикам *РНК*-полимераз у эукариотов, в особенности у высших животных (табл. 3). В настоящее время можно считать доказанным, что в клетках высших животных существует множество форм полимераз. Установлена внутриклеточ-

ная локализация и субъединичный состав некоторых РНК-полимераз (табл. 4) и начинают говорить о роли каждой формы РНК-полимеразы, т.е. об отдельных механизмах регуляции активности различных РНК-полимераз в клетке. В животных клетках РНК-полимеразы *AI*, *AII*

Таблица 3

Номенклатура и локализация животных ДНК-зависимых РНК-полимераз [43]

Класс ферментов	Ферменты	Другая терминология	Локализация
А не чувствителен к аманитину	<i>AI</i> (a+b) <i>AII</i>	<i>I</i> <i>IB</i>	Ядрышковая Ядрышковая
В чувствителен к аманитину в концентрации 10^{-9} — 10^{-8} М	<i>BO</i> <i>BI</i> <i>BII</i>	<i>IIo</i> <i>IIA</i> <i>IIB</i>	Нуклеоплазматическая
С чувствителен к высоким концентрациям аманитина 10^{-5} — 10^{-4} М	<i>CI</i> <i>CI</i> <i>CIHa</i> <i>CIHb</i>	<i>IIIA</i> <i>IIIB</i>	Нуклеоплазматическая Цитоплазматическая

Таблица 4

Субъединичный состав РНК полимеразы *AI* и *B* из тимуса теленка [43]

Форма <i>AI</i>		Форма <i>AIa</i>		Форма <i>BI</i>		Форма <i>BII</i> или <i>BIIb</i>	
Субъединица	Молекулярный ^а вес	Субъединица	Молекулярный ^а вес	Субъединица	Молекулярный ^а вес	Субъединица	Молекулярный ^а вес
<i>SA</i> ₁	197(1) ^b	<i>SA</i> ₁	197(1) ^b	<i>SB</i> ₁	214(1) ^b	—	—
<i>SA</i> ₂	126(1)	<i>SA</i> ₂	126(1)	—	—	<i>SB</i> _{2a} или <i>SB</i> ₂	180(1) ^b
<i>SA</i> ₃	51(1)	—	—	<i>SB</i> ₃	140(1)	<i>SB</i> ₃	140(2)
<i>SA</i> ₄	44(1)	<i>SA</i> ₄	44(1)	<i>SB</i> ₄	34(1—2)	<i>SB</i> ₄	34(1—2)
<i>SA</i> ₅	25(2)	<i>SA</i> ₅	25(2)	<i>SB</i> ₅	25(2)	<i>SB</i> ₅	25(2)
						<i>SB</i> _{5'}	20(1)
<i>SA</i> ₆	16,5(2)	<i>SA</i> ₆	16,5 2)	<i>SB</i> ₆ (a+b)	16,5(3—4)	<i>SB</i> ₆ (a+b)	16,5(3—4)

а. Молекулярный вес: дальтоны×10⁻³

б. Молярное соотношение субъединиц

и *BO*, *BI* и *BII* соответственно были обнаружены во фракциях ядрышек и нуклеоплазматической фракции, в то время как РНК-полимераза класса *C* найдена в нуклеоплазматической и цитоплазматической фракциях. Однако в последнем случае возможность ядерной утечки не ис-

ключается [44]. Преимущественная ядрышковая локализация амани-тинрезистентной РНК-полимеразы класса А допускает возможность того, что она ответственна за синтез *p*-РНК, в то время как нуклеоплазматическая локализация энзимов класса В приводит к мысли о том, что они, возможно, включены в синтез других видов РНК. Эти гипотезы были проверены исследованиями эффекта введения аманитина на синтез различных классов РНК *in vivo* и *in vitro* экспериментах с изолированными ядрами. Это последнее достижение было весьма успешным и демонстрировало правильность идеи о том, что каждый из энзимных классов полимераз имеет специфическую роль в транскрипции генетической информации.

Включение РНК-полимераз класса В в синтез гетерогенной ядерной РНК, часть которой преимущественно является предшественником *и*-РНК, было показано инкубацией изолированных ядер в присутствии различных концентраций аманитина, который полностью ингибирует очищенные энзимы класса В [45]. В настоящее время ничего не известно о других функциях различных энзимов класса В. Хотя и не было показано прямого включения РНК-полимераз класса В в синтез специфической клеточной матрицы (*и*-РНК), несколько новых сообщений показывают, что РНК-полимеразы класса В включаются в синтез вирусной *и*-РНК как в ранние, так и в поздние сроки и в течение заражения животных ДНК-вирусами [46, 47]. Более того, РНК-полимеразы класса В, по-видимому, отвечают за транскрипцию вирусной ДНК в изолированных ядрах, препарированных из клеток зараженных РНК опухолевых вирусов [48, 49].

Предполагается, что в изолированных ядрах нуклеоплазматическая РНК-полимераза, проявляющая некоторые свойства энзима класса С (III), может катализировать синтез 5S или предшественника 4S РНК (цитоплазматическая *т*-РНК) [47, 45]. Так как клетки содержат несколько энзимов класса С и все они имеют ту же модель ингибирования аманинитом, пока не удастся указать на специфическую роль различных РНК-полимераз класса С в транскрипции 5S или предшественника 4S РНК. РНК-полимераза класса С также включается в транскрипцию 5, 5S РНК, связанную с вирусом в продуктивном заражении КВ клеток аденовирусом-2 [50].

Полученные несколько улик после введения аманитина *in vivo* подтверждают, что различные гены или группы генов транскрибируются различными энзимами. Во-первых, биохимические, ауторадиографические и электронно-микроскопические исследования [51, 52] показывают, что синтез гигантских гетерогенных ядерных РНК ингибируется при введении *in vivo* аманитина или при инкубации с полиеновыми хромосомами. Во-вторых, подтверждено возможное включение РНК-полимераз класса В (или II) в синтез гигантских гетерогенных ядерных РНК выделением клеточных мутантов, которые содержат измененные РНК-полимеразы класса В, резистентные к аманитину и растущие нормально в присутствии аманитина. Эти исследования указывают на то, что регуляция активности РНК-полимеразы класса В независима от регуляции ак-

тивности класса *A* (*I*) и что может иметь место аутогенное регулирование активности фермента, как это встречается в холоэнзимах бактерий [53].

Существование различных *РНК*-полимераз со специфическими функциями и с неодинаковой субклеточной локализацией подтверждает, что генная экспрессия в эукариотических клетках может быть регулирована, по крайней мере частично, через различные ферменты, которые должны специфически транскрибировать различные гены или классы генов. Механизм транскрипции, возможно, предусматривает специфическую рекогносцировку последовательности различными полимеразми, которая должна быть характерной для класса генов, хотя и нет очевидности того, что эукариотические геномы содержат регуляторные участки, подобные прокариотическим промоторным и терминаторным участкам [54]. Тем не менее сходство между общей молекулярной структурой прокариотических и эукариотических *РНК*-полимераз приводит к мысли о том, что некоторые регуляторные механизмы, действующие в прокариотических клетках, могут иметь свои аналоги и в эукариотических клетках и что различные эукариотические ферменты поэтому могут играть положительную роль в регуляции проявления генетической информации.

С помощью акриламид-гель-электрофореза очищенной *РНК*-полимеразы *I* Хирш и Мартело [55] выявили шесть субъединиц фермента (*SA*₁, *SA*₂, *SA*₃, *SA*₄, *SA*₅ и *SA*₆). От *SA*₁ до *SA*₆ отмечается уменьшение молекулярного веса и увеличение электрофоретической подвижности, что подтверждается данными Кедингер и др. [43, 56]. Было показано, что дибутирил-3', 5'-АМФ стимулирует общий *РНК*-синтез и активирует *РНК*-полимеразу *I*. При этом циклические нуклеотиды не стимулируют активирования *РНК*-полимеразы *II*. Полиакриламид-гель-электрофорез фосфорилированной *РНК*-полимеразы *I* в присутствии 0,1% *Na*-додецилсульфата показал первичную ауторадиографическую локализацию ³²*P* в субъединицах *SA*₁, *SA*₃ и *SA*₅—*SA*₆. Высоковольтный электрофорез на бумаге и частичный кислотный гидролиз фосфорилированной *РНК*-полимеразы *I* установили фосфатные связи на уровне серина и треонина в молекулах соответствующих субъединиц фермента.

Если допустить возможность существования различных механизмов индукции активности *РНК*-полимераз, то становится правомерным то подтверждение, что с усложнением механизмов репрессии и дерепрессии число эффекторов в клетках эукариотов и, в особенности у высших животных, может нарастать. Одни нейропептиды в нашем эксперименте, например *ДГЛВП*, *Лей*⁴-*ЛВП* и кардиотропный гексапептид, могут индуцировать *РНК*-полимеразы класса *A* или *I*, которые имеют нуклеолярную локализацию и ответственны в основном за биосинтез *p-РНК* и *t-РНК* (соответственно и *я-РНК* ГЦ-типа), в то время как другие нейропептиды (в нашем эксперименте *деамино-ЛВП*, *ТриГЛИЛВП*, кардиотропный ацетилгексапептид) могут индуцировать *РНК*-полимеразы классов *B* и *C*, имеющих нуклеоплазматическое происхождение и от-

ветственных в основном за биосинтез я-РНК АУ-типа, предшественника и-РНК, молекула которой окончательно дифференцируется из высокомолекулярной гетерогенной я-РНК в результате модификации. Не исключена возможность, что одни и те же нейропептиды могут индуцировать активность и тех, и других форм РНК-полимераз. Можно допустить, что, по-видимому, регуляторный белок одним центром может соединяться с оператором для узнавания последовательности оснований ДНК, а другим—взаимодействовать с эффектором (в случае транскрипции р-РНК с ДГЛВП, Лей⁴-ЛВП, гексапептидом, а в случае и-РНК с деамино-ЛВП, ацетилгексапептидом) и этот комплекс может дать сигнал к инициации транскрипции.

Другим возможным, быть может основным, механизмом приложения нейропептидов в качестве первичных мессенжеров, участвующих в регуляции уровня циклических нуклеотидов (3', 5'-АМФ и 3', 5'-ГМФ) и осуществляющих через них регуляцию биосинтеза различных классов РНК в клетках высших животных, является механизм циклоаденилат- и циклогуанилатчувствительной транскрипции [5] (рис. 2).

Гольдберг и сотр. [6] выдвигают гипотезу, согласно которой 3', 5'-АМФ и 3', 5'-ГМФ действуют совместно по принципу *yin-yang*

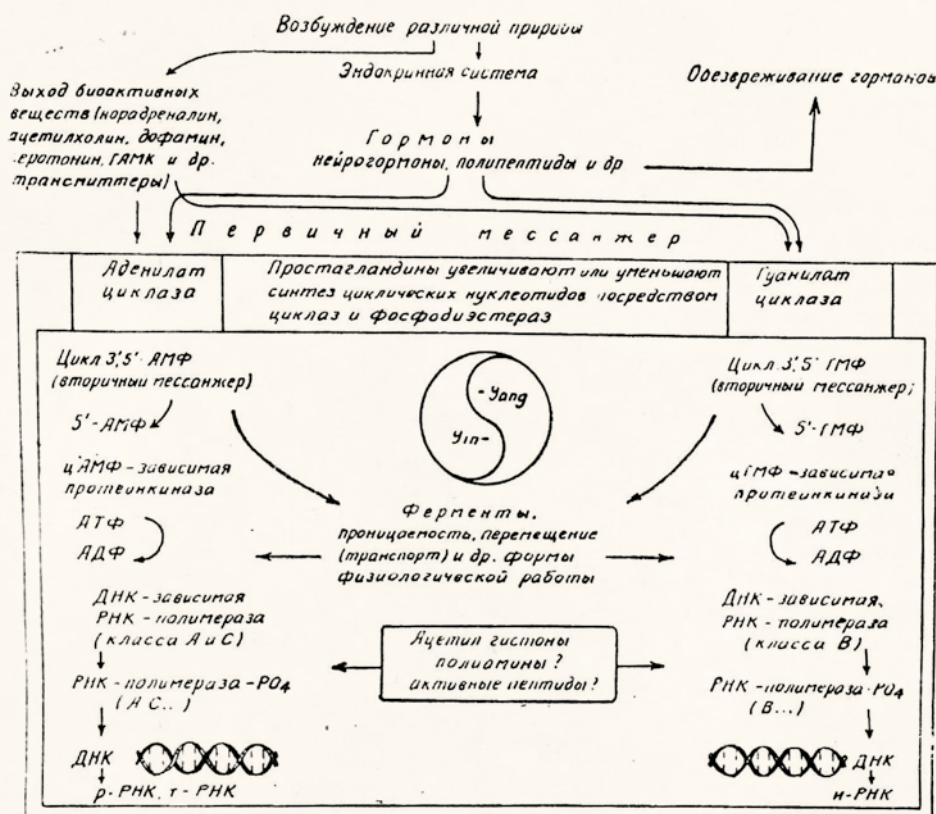


Рис. 2. Схематическое воспроизведение мессенджерной и циклической—3',5'—монофосфатнуклеотидзависимой транскрипции.

(один сменяет другого как время года) и регулируют рост клеток и их функцию. Данное предположение частично основано на том факте, что в фибробластах, в которых происходит инициация синтеза ДНК, содержание 3', 5'-ГМФ значительно увеличено, а количество 3', 5'-АМФ понижено, в то время как вне фазы роста соотношение указанных циклических нуклеотидов в клетке диаметрально противоположно. Выдвинутая нами концепция о наличии и взаимодействии циклоаденилат- и циклогуанилатчувствительной транскрипции, основанная на собственных и некоторых литературных данных, предусматривает участие циклических нуклеотидов в качестве вторичных мессенжеров в протеинкиназных реакциях в пути активации различных РНК-полимераз. Фосфорилированная модификация различных форм РНК-полимераз в присутствии других факторов транскрипции может специфическим образом вести биосинтез различных классов РНК. На основании собственных и литературных данных мы приходим к заключению, что 3', 5'-зависимые протеинкиназные реакции осуществляют фосфорилирование ДНК-зависимых РНК-полимераз класса А или I, локализованных в ядрышках и ответственных за транскрипцию р-РНК и т-РНК, в то время как 3', 5'-ГМФ зависимые протеинкиназные реакции фосфорилируют ДНК-зависимые полимеразы класса В, локализованные в нуклеоплазме и ответственные в основном за биосинтез я-РНК АУ-типа, который после определенной модификации переходит в и-РНК. Этот возможный механизм участия активных пептидов в регуляции уровня циклических нуклеотидов — через аденилат- и гуанилатциклазные и фосфодиэстеразные реакции — может реципрожно включать и выключать указанные реакции и реализовать циклоаденилат- и циклогуанилатчувствительные транскрипции.

POSSIBLE ROLE OF NEUROPEPTIDES IN THE REGULATION OF BRAIN NUCLEIC ACID BIOSYNTHESIS

G. S. KHACHATRIAN

Laboratory of the brain biosynthetic reactions and the Department of biochemistry of the Yerevan Medical Institute.

A b s t r a c t

It has been studied the role of intracisternal administration of neuropeptides—five analogous of 8-lysinvasopressin (LVP) [*Des*-9-Glycine-amide-LVP (*DGLVP*), *Tri*-Gly-LVP, deamino-LVP (1-β-mercaptopropionic acid-LVP), *Leu*⁴-LVP, *Asn*^{1,6}-LVP] and two cardiotrop hexapeptides (acetylated and non) separated from the hypothalamus in the regulation of various types of RNA (*GC* and *AU* types *n*-RNA, *r*-RNA, *t*-RNA) biosynthesis in the brain.

Using the combined method of phenol extraction, differential ultracentrifugation, gel-filtration and ultraviolet spectroscopy of various

types of *RNA* has been shown the increase in the content of *r-RNA* and *t-RNA* under the influence of *DGLVP*, *Leu*⁴-*LVP* and cardiotrop hexapeptide. Deamino-*LVP*, *Tri-Gly-LVP* and acetylated hexapeptide stimulate the rise in the content of *r-RNA* and *AU* type *n-RNA* (precursor of *m-RNA*). *Asn*^{1,6}-*LVP* shows a nonspecific influence on the biosynthesis of the brain *RNA*.

It has been suggested a hypothesis about a participation of the neuropeptides in the regulation of various types of the brain *RNA* biosynthesis, as a primary messenger (starting signals) during the stimulation of the initiation of cycloadenylate- and cycloguanylate-sensitive transcription, via phosphorylation of diverse *RNA*-polymerases. It was given a scheme of interaction between the messenger conception of neuropeptides and cyclic-3', 5'-monophosphate nucleotide-dependent transcription by which the cycloadenylate-dependent transcription appears to play a great role in the *r-RNA* and *t-RNA* biosynthesis and the cycloguanylate-dependent transcription — in the biosynthesis of *m-RNA*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Watson J. D., Molecular Biology of the Gene, N. Y., 1970.
2. Спирин А. С. и Гаврилова Л. П., Рибосома, М., «Наука», 1971.
3. Георгиев Г. П., Ж. Всесоюзн. хим. общ. им. Д. И. Менделеева 20, 242, 1975.
4. Sirtlin J. L., Biology of RNA, Acad. Press., N. Y., 1972.
5. Хачатрян Г. С., Первый Всесоюзн. симп. «Циклические нуклеотиды», Красноярск, 81, 1976.
6. Goldberg N. D. et al., Basic Life Sci. 3, 241, 1974.
7. Goldberg N. D. and Haddox M. K., Ann. Rev. Biochem. 46, 823, 1977.
8. Hyden H., RNA and Brain function, memory and learning, Eds. Brazier, Berkeley, 29, 1964.
9. Gaito J., The Structure and function of nervous tissue, Ed. Bourne, Acad. Press N. Y., 2, 493, 1969.
10. Хачатрян Г. С., Биохимия головного мозга, Ереван, «Айастан», 1967.
11. Хачатрян Г. С. и др., Вопросы биохимии мозга, Изд. АН Арм. ССР, 9, 123, 1974.
12. Хачатрян Г. С. и др., Вопросы биохимии мозга, Изд. АН Арм. ССР, 9, 151, 1974.
13. Ашмарин И. П., Загадки и откровения биохимии памяти, Л., «Наука», 1975.
14. Greengard P., Nature 260, 101, 1976.
15. Delgado J. M., Physical control of the mind, N. Y., 1969.
16. Лурия А. Р., Мозг и память, Изд. МГУ, 1975.
17. Eccles J. G. (Ed.), Brain and conscious experience, Berlin, N. Y., 1966.
18. Costa E. and Giacobini E. (Eds.), Biochemistry of simple neuronal models, Adv. Biochem. Psychopharm., 2, 1970.
19. Палладин А. В., Избранные труды, Киев, «Наукова думка», 1975.
20. Бунятыян Г. Х., Вопросы биохимии мозга, Изд. АН Арм. ССР, 10, 5, 1975.
21. Jacob F. and Monod J., J. Biol. Chem. 3, 318, 1961.
22. Pastan I. H. et al., Ann. Rev. Biochem. 44, 491, 1975.
23. Jungmann R. A. et al., J. Biol. Chem. 249, 5444, 1974.
24. Martelo O. J., Protein phosphorylation in control mechanisms, Ed. F. Huijing, Acad. Press, N. Y., 5, 199, 1973.
25. Martelo O. J. et al., Biochemistry 9, 4807, 1970.

26. Северин Е. С. и др., Биохимия, **41**, 384, 1976.
27. Moruzzi G. et al., Mol. Cell. Biochem. **3**, 153, 1973.
28. Seiler N. and Lamberty U., J. Neurochem. **20**, 709, 1973.
29. Stevens L., Biol. Rev. **45**, 1, 1970.
30. Gospodarowicz D., Nature **249**, 123, 1974.
31. Bilesikian J. B. and Aurbach G., J. Biol. Chem. **249**, 157, 1974.
32. Krishna G. et al., J. Biol. Chem. **247**, 2253, 1972.
33. Leray F. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **48**, 1385, 1972.
34. Rodbell M. et al., J. Biol. Chem. **243**, 59, 1974.
35. Walter R. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **72**, 4180, 1975.
36. Галоян А. А., ДАН Арм. ССР **64**, 116, 1977.
37. Kirby K. S., J. Biol. Chem. **6**, 341, 1956.
38. Sibatani A. et al., Biochim. Biophys. Acta. **33**, 590, 1959.
39. Georgiev G. P. et al., Biochim. Biophys. Acta. **37**, 373, 1960.
40. Schneider W. C., J. Biol. Chem. **176**, 259, 1948.
41. Hogeboom G. and Schneider W. C., J. Biol. Chem. **204**, 233, 1953.
42. Dellweg H. et al., J. Neurochem. **15**, 1109, 1968.
43. Chambon P., Ann. Rev. Biochem. **44**, 613, 1975.
44. Seifart H. et al., Arch. Biochem. Biophys. **151**, 519, 1972.
45. Zylber E. A. and Penman S., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **68**, 2861, 1971.
46. Alwine J. C. et al., Virology **60**, 302, 1974.
47. Price R. and Penman S., J. Mol. Biol. **70**, 435, 1972.
48. Jacquet M. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **71**, 3045, 1974.
49. Rymo L. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **71**, 2782, 1974.
50. Weinmann R. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **71**, 3426, 1974.
51. Hadjilov A. A. et al., Biochem. J. **138**, 321, 1974.
52. Jacob S. T., Biochim. Biophys. Res. Commun. **40**, 334, 1970.
53. Somers D. G. et al., Nature **253**, 371, 1975.
54. Chamberlin M. J., Ann. Rev. Biochem. **43**, 721, 1974.
55. Hirsch J. and Martelo O. J., J. Biol. Chem. **251**, 5408, 1976.
56. Keding C. and Simard R., J. Cell Biol. **63**, 831, 1974.

Նեյրոպեպտիդների հնարավոր դերը գլխուղեղում նուկլեինաթթուների կենսասինթեզի կարգավորման մեջ

Գաբրիել Ս. Խաչատրյան

Գլխուղեղի կենսասինթետիկ ռեակցիաների
լաբորատորիա և կենսաքիմիայի ամբիոն, Երևանի
բժշկական ինստիտուտ, Երևան, Հայաստան

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Ուսումնասիրվել է նեյրոպեպտիդների՝ 8-լիզինվազոպրեսինի (ԼՎՊ) հինգ անալոգների [դեն-9-գլիցին-ամիդ-ԼՎՊ (ԴԳԼՎՊ), Եռ-Գլի-ԼՎՊ, դեամինո-ԼՎՊ (1-β-մերկապտոպրոպիոնաթթու-ԼՎՊ), Լեյ4-ԼՎՊ, Ասն1,6-ԼՎՊ] և հիպոթալամուսից առանձնացված երկու կարդիոտրոպ հեքսապեպտիդների (ացետիլացված և ոչ ացետիլացված) ներցիտենոնային ներմուծման դերը գլխուղեղում տարբեր տեսակի ՌՆԹ-ների (ԳՑ և ԱՌ տեսակի ն-ՌՆԹ, Դ-ՌՆԹ և փ-ՌՆԹ) կենսասինթեզի կարգավորման մեջ: Ֆենոլային էքստրակցիայի, դիֆերենցող ուլտրացենտրիֆուգացիայի, գելային ֆիլտրացիայի և տարբեր տեսակի Դ-ՌՆԹ-ների ուլտրամանուշակագույն սպեկտրոսկոպիայի համակցված օգտագործման

մեթոդը ցույց է տվել, որ ԴԳԼՎՊ-ի, Լեյ4-ԼՎՊ-ի և կարդիոտրոպ հեքսապեպտիդների ազդեցության ներքո ավելացել է Դ-ՌՆԹ-ի և փ-ՌՆԹ-ի պարունակությունը: Դեամինո-ԼՎՊ-ն, Եռ-Գլի-ԼՎՊ-ն և ացետիլացված հեքսապեպտիդը խթանում են Դ-ՌՆԹ-ի և ԱՌ տեսակի ն-ՌՆԹ-ի (մ-ՌՆԹ-ի պրեկուրսոր) աճը: Ասն1-ԼՎՎՊ-ն ցուցադրում է ոչ սպեցիֆիկ ազդեցություն գլխուղեղի ՌՆԹ-ի կենսասինթեզի վրա: Առաջարկվել է վարկած գլխուղեղի տարբեր տեսակի ՌՆԹ-ների կենսասինթեզի կարգավորմանը նեյրոպեպտիդների մասնակցության մասին՝ որպես առաջնային հաղորդիչ (մեկնարկային ազդանշան) ցիկլոօքսիլատ- և ցիկլոգուանիլատ-զգայուն տրանսկրիպցիայի խթան՝ տարբեր ՌՆԹ-պոլիմերազների ֆոսֆորիլացման միջոցով: Ներկայացվել է սխեմա նեյրոպեպտիդների հաղորդականության հայեցակարգի և ցիկլիկ-3', 5'-մոնոֆոսֆատ նուկլեոտիդ-կախյալ տրանսկրիպցիայի փոխազդեցության միջև, որի համաձայն ցիկլոօքսիլատ-կախյալ տրանսկրիպցիան կարևոր դեր ունի Դ-ՌՆԹ-ի և փ-ՌՆԹ-ի կենսասինթեզի մեջ, իսկ ցիկլոգուանիլատ-կախյալ տրանսկրիպցիան՝ մ-ՌՆԹ-ի կենսասինթեզում: