

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ НУКЛЕАЗ, ПРЕИМУЩЕСТВЕННО ГИДРОЛИЗУЮЩИХ ОДНОНИТЕВЫЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ

Ж. И. АКОПЯН, Р. Е. АБРАМОВ

Приводятся литературные данные последних лет по изучению нуклеаз, специфически гидролизующих однонитевые полинуклеотидные цепи. Обсуждается сравнительная характеристика по субстратной специфичности данных ферментов.

Ключевые слова: нуклеаза, субстратная специфичность, ДНаза.

Многообразие нуклеаз очень затрудняет их рациональную классификацию; согласно международной классификации, все нуклеазы объединены в одну группу (К. Ф. 3.1.4.X), в пределах которой различным нуклеазам присвоены различные значения X.

По отношению к субстратам различают прежде всего нуклеазы, гидролизующие РНК (РНазы), ДНК (ДНазы), и нуклеазы, действующие на оба типа нуклеиновых кислот. Нуклеазы различают также по взаимодействию со вторичной структурой субстрата: нуклеазы, специфичные к однонитевым полинуклеотидным цепям (sss-нуклеазы), специфичные к двунитевым цепям нуклеиновых кислот (dss-нуклеазы)* и действующие на оба типа полинуклеотидов. Среди dss-нуклеаз имеется особая группа, названная гибридазами или РНазами II, которая включает в себя ферменты, избирательно расщепляющие РНК в составе ДНК/РНК гибрида. Кроме того, имеются нуклеазы, узнающие пространственную структуру полинуклеотида, например, нуклеазы процесса тРНК.

Нуклеазы классифицируют также по взаимодействию с первичной структурой субстрата; здесь различают нуклеазы, специфические по отношению к определенным основаниям или группе оснований и неспецифические.

Субстратная специфичность нуклеаз может выражаться и по месту гидролиза субстрата в полинуклеотидной цепи (экзонуклеазы, эндонуклеазы и неспецифические). Экзонуклеазы, как известно, действуют только на свободные концы полинуклеотидной цепи (либо на 3'-конец, либо на 5'-конец). Они не способны к образованию фермент-субстрат-

* Сокращения: sss — специфичная к однонитевым участкам (single stranded specific), dss — специфичная к двунитевым участкам (double stranded specific).

ных комплексов с кольцевыми полинуклеотидами, в то время как эндонуклеазы расщепляют фосфодиэфирную связь внутри полинуклеотидной цепи и способны к образованию комплексов с кольцевыми полинуклеотидами. Причем продуктами расщепления экзонуклеаз во многих случаях являются небольшие молекулы—олигонуклеотиды и мононуклеотиды в отличие от эндонуклеаз, для которых характерно образование крупных молекул олигонуклеотидов. Однако в последнее время показано, что конечными продуктами каталитического действия многих экзонуклеаз, как например, экзонуклеазы, участвующей в рекомбинации, могут быть также крупные полинуклеотидные молекулы. Кроме того, описаны ферменты, не проявляющие определенной специфичности по отношению к месту приложения к субстрату.

В последнее время в литературе накопилось много данных об особой группе ферментов (фосфодиэстераз), неспецифических относительно типа субстрата (РНК, ДНК), однако гидролизующих преимущественно однонитевые цепи полинуклеотида и в том числе абсолютно специфичных к денатурированным молекулам ДНК и РНК.

Линн и Леман в 1965 году описали эндонуклеазу из *Neurospora crassa*, которая при определенных условиях проявляет активность в отношении нативной ДНК приблизительно на 2%, по сравнению с активностью фермента, гидролизующего денатурированную молекулу ДНК [2]. Однако степень деградации нативной ДНК оптимальна при кислых значениях рН среды и в присутствии ионов Mn^{2+} , тогда как для гидролиза денатурированной молекулы ДНК необходимо присутствие в инкубационной среде ионов Mn^{2+} при щелочных значениях рН. Названная выше нуклеаза из *N. crassa* как бы дополняет экзонуклеазу I (фосфодиэстеразу) из *E. coli* [19]. Оба фермента показали почти абсолютную специфичность ко вторичной структуре полинуклеотидов, и в обоих случаях показан низкий уровень активности гидролиза нативной молекулы ДНК, что в некоторой степени отражает действие этого фермента на денатурированные или однонитевые участки внутри молекулы нативной ДНК. Важной отличительной особенностью этих двух ферментов является механизм каталитического действия, что дополняет действие их при использовании в качестве инструментов при различных исследованиях. Нуклеаза из *E. coli* по механизму действия является экзонуклеазой, тогда как нуклеаза из *N. crassa* действует по эндонуклеазному типу. Фермент из *N. crassa* по своей субстратной специфичности подобен ферменту, выделенному из мозга ягненка, для которого показана высокая избирательность степени деградации денатурированных молекул ДНК или однонитевых молекул ДНК [12].

Весьма характерным для механизма ферментативного гидролиза субстратов олигомерной структуры является механизм действия ДН-азы, выделенной из поджелудочной железы [29]. При описанных условиях нуклеаза из *N. crassa* атакует гексануклеотиды (но не менее), которые имеют на конце 5'-фосфатную группу. Оба фермента преимущественно расщепляют внутренние связи, образуя в качестве продук-

тов реакции моно- и динуклеотиды [29]. Показано, что $d(pT)_{5p}$ атакуется ферментом почти с той же скоростью, что и $d(pT)_6$; эти результаты аналогичны экспериментальным данным, полученным Кораной и Ласковским, которые показали, что 3'-фосфомоноэфирная группа молекулы субстрата моделирует фосфодиэфирную связь, что создает оптимальные условия для действия панкреатической ДНазы [31].

Интересно, что эндонуклеаза, выделенная из *N. crassa*, не была способна к гидролизу олигонуклеотидных молекул, не содержащих концевые фосфатные группы, так как использованная в качестве субстрата ДНК была предварительно обработана высокоактивной фосфатазой. Активность нуклеазы тормозится в случае отсутствия терминальных фосфатных групп только при наличии небольших молекул кислоторастворимых субстратов. Дефосфорилированные олигонуклеотиды не являются субстратами для панкреатической ДНазы [31].

Нуклеаза из *N. crassa* относительно высоко специфична по отношению к связям, включающим гуанозиновые и дезоксигуанозиновые остатки. На начальной стадии гидролиза денатурированной молекулы ДНК уровень дезоксигуанозин-5'-фосфата был приблизительно в три раза выше трех других дезоксирибонуклеотидов (АМФ, ТМФ, ЦМФ). Аналогичные данные получены относительно рибосомальной РНК [21]. Авторы допускают по меньшей мере два объяснения этих результатов: препарат нуклеазы из *N. crassa* содержит как эндонуклеазную, так и неспецифичную экзонуклеазную активности; эндонуклеазная активность должна была бы продуцировать олигонуклеотиды с концевым дезоксигуанилатом, тогда как последующая экзонуклеазная активность должна была атаковать эти олигонуклеотиды с образованием первого дезоксигуанозин-5'-фосфата и затем, как продолжение экзонуклеазного действия, продуцировать другие мононуклеотиды [21]. Прямым следствием подобного механизма действия фермента было бы образование в результате гидролиза раннего дезоксигуанилата относительно высокой концентрации. Главным затруднением в объяснении этой гипотезы является непропорционально низкий уровень образованного дезоксицитидин-5'-фосфата, особенно в очень ранней стадии катализа. Другой трудностью является отсутствие значительной экзонуклеазной активности в очищенных препаратах нуклеазы. Таким образом, можно допустить отсутствие гидролизующего действия фермента на дезоксцитидиновые олигонуклеотиды, тем более что в пределах чувствительности хроматографических методов исследования не было обнаружено даже следовых количеств продуктов нуклеазной реакции—мононуклеотидов. Конечными продуктами реакции оказались тетрамер, тример и димер. С другой стороны, при достаточно высокой концентрации фермента и большой длительности инкубации (24 часа) молекула ДНК может деградировать почти полностью до мононуклеотидов. Вторая модель объясняет преобладание дезоксигуанилата среди продуктов ранней стадии деградации, во-первых, допуская, что фермент характеризуется исключительно эндонуклеазным механизмом, способным вызывать

высокую степень деградации при отсутствии абсолютной специфичности относительно дезоксигуанозинового остатка внутри полинуклеотидной цепи. После того, как были идентифицированы все четыре мононуклеотида среди конечных продуктов реакции, было постулировано, что расщепление может идти по диэфирной связи, включающей любые остатки, и что относительная частота найденных мононуклеотидов легко отражает относительную чувствительность этих связей к эндонуклеазе.

Ограниченная скорость гидролиза олигонуклеотидов, чрезвычайно богатых дезоксицитидином и относительно низкий уровень образования дезоксицитидилата на ранних стадиях гидролиза позволяет допустить, что диэфирные связи, включающие эти остатки, относительно стабильны в отношении гидролитического действия фермента [18].

Мио и др. изучали механизм действия нуклеазы, выделенной из мицелия *N. crassa*, и показали эндонуклеазный характер действия фермента [22]. Линн и Леман, исследовавшие этот фермент из того же биологического объекта, показали незначительную активность фермента в отношении к нативной молекуле ДНК, что, по их мнению, объяснялось наличием в ферментных препаратах примесей других нуклеаз [21]. Более детальными исследованиями однозначно была показана способность нуклеазы из *N. crassa* катализировать гидролитическое расщепление нативной молекулы ДНК и молекулы ДНК, денатурированной нагреванием. После полного гидролиза денатурированной ДНК под действием нуклеазы обнаружили следующие олигонуклеотиды в качестве продуктов нуклеазной реакции, содержащие в основном 5'-концевые группы, %: мононуклеотидов—4,4, динуклеотидов—30,3, тринуклеотидов—36,4, тетрануклеотидов—21 и пентануклеотидов—3,3. Фракция 5'-мононуклеотидов имела следующий состав оснований: дТМФ > дЦМФ > дИМФ > дАМФ. 5'- и 3'-концевые участки олигонуклеотидов содержали тимидин. Аналогичные результаты были получены при анализе продуктов неполного гидролиза денатурированной ДНК. Авторы полагают, что нуклеаза из *N. crassa* преимущественно расщепляет последовательность —Т | рТ- или —Т | рХ. Активность нуклеазы в отношении синтетических полимеров распределялась следующим образом: поли-д(А—Т) >> поли-дА-поли-дТ > поли-д(Г—Ц) > поли-дГ-поли-дЦ [22].

Аналогичную субстратную специфичность к полимерам с 5'-концевым фосфатом проявляют нуклеазы, выделенные из *Thermus thermophilus* HB8 [23]. Ферменты гидролизуют дезоксиолигонуклеотиды с 5'-концевым монофосфатом, с накоплением в инкубационной среде 5'-мононуклеотидов в качестве продуктов реакции. Олигонуклеотиды, не имеющие 5'-концевой фосфатной группы, независимо от наличия или отсутствия 3'-фосфата при гидролитическом расщеплении, деградируют как до 5'-монофосфонуклеотидов, так и до динуклеозидмонофосфатов, которые отщепляются с 5'-конца. Показано также, что динуклеотиды с 5'-концевой фосфатной группой расщепляются до 5'-мононуклеотидов, а динуклеозидмонофосфаты устойчивы к действию фермента. Скорость гидролиза уменьшается в ряду денатурированная нагреванием

ДНК > нативная ДНК > РНК [22]. Фосфогидролазы с такой специфичностью в отношении к нуклеополимерам с 5'-фосфатным концом могут быть широко использованы при прямом определении последовательности у 5'-конца, а также предпоследнего положения в олигонуклеотидах при использовании газожидкостной хроматографии.

Сходную субстратную специфичность относительно олигонуклеотидов с 5'-концевым фосфатом проявляют также sss-нуклеазы, выделенные из плесневых грибов *Aspergillus oryzae* [1, 2].

Фермент, выделенный нами из амилоризина, гидролизует дезокси-олигонуклеотиды с 5'-концевым фосфатом с образованием 5'-моонуклеотидов. Показано, что тимидиннуклеотид является субстратом для данной нуклеазы и гидролизует до 5'-тимидиннуклеотидов [3].

Нами также показана корреляция связывания фермента с субстратами с образованием фермент-субстратного комплекса в зависимости от состава и строения субстратов. Показано, что аденин и аденозин проявляют слабую тенденцию к ассоциации с ферментом, в то время как 2'-АМФ, 5'-АДФ, 5'-АТФ образуют более устойчивый фермент-субстратный комплекс с нуклеазой. Эффективность ассоциации этих компонентов усиливается в ряду аденин < аденозин < 5'-АМФ < 3'-АМФ < 2'-АМФ < 5'-АДФ < 5'-АТФ (табл. 1). Исследование защиты нуклеазы теми же нуклеотидами и составляющими их компонентами от инактивирующего действия высокой температуры подтвердило полученные нами данные об эффективности ассоциации [4].

В 1956 году Канингхем и соотр. показали, что нуклеаза, выделенная из микрококков, оказалась более активной в отношении участков ДНК, богатых остатками дезоксиадениловой и тимидиловой кислот. Скорость реакции понижается в ряду (A—T)_n > денатурированная ДНК > нативная ДНК. Конечными продуктами являются 3'-монофосфаты. Фермент характеризуется как эндо-, так и экзонуклеазной активностями [8]. В противоположность нуклеазе из *N. crassa* для экзонуклеазы I из *E. coli* для проявления ферментативной активности крайне существенно наличие свободных 3'-гидроксильных групп дезоксирибоолигонуклеотидов. Авторами показана высокая специфичность этой нуклеазы к однонитевым молекулам ДНК. Фермент атакует дезоксирибонуклеотид с 3'-гидроксильного конца с образованием 5'-моонуклеотидов, однако последний динуклеотид не является субстратом для этого фермента. Экзонуклеаза I из *E. coli* атакует денатурированную молекулу ДНК в 40000 раз быстрее, чем нативную ДНК. Образование в качестве конечных продуктов гидролиза в большом количестве 5'-моонуклеотидов, в отличие от олигонуклеотидов, предполагает, что ограниченное действие очищенной экзонуклеазы на нативную ДНК не является результатом загрязнения эндонуклеазой. Введение ДНК-фосфатазы в инкубационную среду (от 78 до 90%) значительно увеличивало степень гидролиза ДНК, денатурированной нагреванием. Олигонуклеотиды с 3'-монофосфоэфирным концом, динуклеозиддифосфаты и динуклеозид-монофосфаты не являются субстратами для экзонуклеазы I [25]. С дру-

Отрицательные отклонения УФ-спектров от аддитивности при внесении в среду нуклеазы из амилоризина и производных ее субстратов

Производные субстрата	A_{265}	A_{265} нуклеаза + нуклеотид	A_{265} нуклеаза/ нуклеотид	Отклонения от аддитивности
Аденин	0,080	0,092	0,102	-0,010
Аденозин	0,082	0,094	0,112	-0,018
5' — АМФ	0,092	0,101	0,129	-0,025
3' — АМФ	0,091	0,103	0,134	-0,031
2' — АМФ	0,092	0,104	0,143	-0,039
5' — АДФ	0,093	0,105	0,153	-0,018
5' — АТФ	0,093	0,105	0,161	-0,056

 A_{265} нуклеазы — 0,012

Положительные отклонения УФ-спектров от аддитивности при внесении в среду нуклеазы из амилоризина и производных ее субстратов

Производные субстрата	A_{285}	A_{285} нуклеаза + нуклеотид	A_{285} нуклеаза/ нуклеотид	Отклонения от аддитивности
Аденин	0,063	0,089	0,086	+0,003
Аденозин	0,064	0,090	0,083	+0,007
5' — АМФ	0,078	0,104	0,195	+0,009
3' — АМФ	0,076	0,102	0,092	+0,010
2' — АМФ	0,077	0,103	0,091	+0,012
5' — АДФ	0,080	0,106	0,091	+0,015
5' — АТФ	0,081	0,107	0,089	+0,018

 A_{285} нуклеазы — 0,026

Условия опыта: 0,03 М ацетатный буфер, рН 4,6. Конечная концентрация нуклеазы $1,2 \times 10^{-5}$ М. Конечная концентрация нуклеотидов $1,5 \times 10^{-5}$ М.

гой стороны, олигонуклеотиды, содержащие более двух нуклеотидных остатков, атакуются ферментом почти с той же скоростью, что и денатурированная молекула ДНК. Однако концентрация субстрата, при которой тестируется половина максимальной скорости, несоизмеримо выше (10^6 раз) для олигонуклеотидов, чем для денатурированной ДНК. Подобные результаты получены и для экзонуклеазы II из *E. coli* [20]. Дезокситимидинтрипуклеотид (д-рТрТрТ) с 3'-концевым монофосфатом полностью инертен к действию экзонуклеазы I. Гидролиз тринуклеотида с 3'-концевой гидроксильной группой тормозит нуклеазную активность примерно в той же степени, что и 3'-концевой фосфотритимидилат. Эти результаты противоречат данным, согласно которым присутствие 3'-концевых монофосфоэфирных групп в полидезоксирибонуклеотидах в большей степени тормозит активность экзонуклеазы I с 3'-гидроксильного конца полинуклеотида. По-видимому, значительная разница в K_m между длиной цепи полидезоксирибонуклеотида и тринуклеотида может иметь важное значение в характеристике инги-

ингибиторных свойств, в связывании экзонуклеазы I, даже в очень высоких концентрациях тринуклеотида, с 3'-фосфатной группой.

Показано, что олигонуклеотиды, в которых ацетируется 3'-концевая гидроксильная группа, не являются субстратами экзонуклеазы I [9]. Такие же данные были получены Леманом и др. при изучении ферментативного гидролиза гексамидилата и его 3'-O ацетильного производного. Из вышесказанного следует: 1—цепи, в которых 3'-концевая гидроксильная группа блокируется фосфорильным или ацетильным остатками, становятся устойчивыми к действию экзонуклеазы I; 2—полтинуклеотиды с 3'-концевой фосфорильной группой являются ингибиторами ферментативной активности относительно олигонуклеотидов с 3'-концевой гидроксильной группой. Малые олигонуклеотиды (3 остатка) с 3'-фосфатом не являются ингибиторами фермента; 3-олигонуклеотиды с 3 и 6 остатками атакуются лучше, чем ss-ДНК, но K_m для них приблизительно в 10^6 раз выше, чем для денатурированной молекулы ДНК.

Как было уже описано, экзонуклеаза I гидролизует двунитевые биосинтетические и $d(A-T)_n$ полимеры, однако экзонуклеазная характеристика этого фермента из *E. coli* предусматривает ограничения, чего нельзя сказать о нуклеазе, выделенной из фасоли. Нуклеаза I из фасоли не узнает $d(A-T)_n$ участки, как типичную двунитевую структуру ДНК фага λ , но атакует именно в этой области, поскольку она известна высоким содержанием AT-богатых участков в середине молекулы [16]. Например, при температуре инкубационной среды 37° в присутствии ионов магния это значение равно 30000 для T4 ДНК, для $d(A-T)_n$ — 65, и менее чем 2—для биосинтетического субстрата. Авторы не обнаружили гидролиза поли-дГ, поли-дЦ даже при 100-кратном избытке фермента. Прибавление ионов магния в концентрации 1 мМ в 13 раз понижает степень гидролиза биосинтетического субстрата, но ускоряет в 2—3 раза гидролитическое расщепление денатурированной ДНК. Температурный коэффициент реакции в области $27-37^\circ$ в 5 раз выше для биосинтетического субстрата, чем для природной молекулы $d(A-T)_n$.

Наиболее важным свойством нуклеазы I из фасоли является: 1—ее способность в низких концентрациях удалять одонитевую молекулу ДНК из среды с обеими формами ДНК (нативной и денатурированной); 2—способность в высоких концентрациях специфически расщеплять AT-богатые участки двунитевой ДНК. Авторы дают название «область специфическая нуклеаза», которое предполагает, по-видимому, наличие нового класса ферментов, подобных нуклеазе I из фасоли. Нуклеаза I классифицируется как эндонуклеаза. Нативная ДНК, выделенная из тимуса теленка, расщепляется приблизительно на 2,5%. Хотя те же препараты ДНК полностью гидролизуются после денатурации субстрата нагреванием. Гидролиз 2,5%-ной нативной ДНК авторы объясняют как доказательство того, что их препарат нативной ДНК содержит примесь денатурированной формы [16].

Экспериментальные данные, полученные при изучении нуклеазы из фасоли, показали, что фермент гидролизует как нативную, так и денатурированную формы д (А—Т) полимеров. Опыты с линейной двуцепочечной молекулой ДНК фага λ , в которых использовали большие количества нуклеазы I, выделенной из фасоли, показали возможность расщепления молекулы субстрата на один и более фрагментов. Анализ двух больших фрагментов показал, что место разрыва насыщено АТ-парами [16].

При исследовании активности фермента на диэфирную связь, нуклеаза из фасоли не проявляла специфичности по отношению к сахарному остатку субстрата, а при наличии 3'-фосфомоноэфира проявляла определенную специфичность к углеводному остатку субстрата, ибо нуклеазному воздействию подвержены только 3'-рибонуклеотиды. Определенный интерес представляет обнаружение у нуклеазы I из фасоли нуклеотидазной активности. Исследования по определению 3'- и 5'-нуклеотидазных активностей проводились при значениях рН равной 5,0 денатурированной ДНК в качестве субстрата (ДНК-азная активность). При этом же значении рН исследовалась 5'-нуклеотидазная активность. 3'-нуклеотидазная активность определялась при рН 5,0 и 8,0. Было показано наличие всех трех ферментативных активностей примерно равной степени [15].

Микульский и Ласковский также показали неспецифическое действие нуклеазы I из фасоли на углеводную половину субстрата [24]. Было показано, что фермент гидролизует рибозо-, дезоксирибозо-, арабинозопроизводные, а также проявляет ω -монофосфатазную активность. Рибозные производные гидролизировались ферментом в 50 раз лучше, чем дезоксирибозные производные. Как ω -монофосфатаза, фермент проявлял предпочтение к различным основаниям (А > Т(У) > Ц > Г). По специфичности к рибозной половине субстрата нуклеаза I из фасоли очень напоминает эндонуклеазу, выделенную из яда змеи, но отличается от нуклеазы, выделенной из микрококков, которая гидролизует рибозо- и дезоксирибозопроизводные, но не расщепляет арабинозопроизводные. Нуклеаза I в низких концентрациях (около 0,015 единиц активности) способна в различной степени расщеплять АрАр, дАрАр, УрУр, ДТрЦр. Как нуклеаза, она отдает предпочтение рибогетерополимерам, чем ДНК. Был также установлен ряд предпочтения А > Т(У) > Ц > Г; поли-У гидролизует быстрее, чем поли-А. Эта аномалия, вероятно, вызывается специфичностью действия нуклеазы I из фасоли на ss-структуру.

При высокой концентрации нуклеазы I из фасоли нативная ДНК деградирует не только на ограниченное число гидролизованных участков, но расщепляется также по экзонуклеазному типу реакции. Эта направленная на концевые участки субстрата активность является результатом относительной термодинамической нестабильности пар оснований на концах дуплексов. Эти концы постоянно деградируют под действием sss-нуклеазы, с образованием моно- и динуклеотидов в качестве продуктов реакции [17]. Проведенные тщательные исследования

по изучению механизма действия нуклеазы I на двуниговую молекулу ДНК показали два возможных механизма его расщепления: 1—накопление разрывов на потенциально расщепляемых участках двуниговых молекул субстрата до образования второго разрыва на противоположной нити молекулы на участке либо совпадающем, либо близлежащем; 2—быстрое и предпочтительное расщепление противоположной нити субстрата, существующей до разрыва. Таким образом, фермент катализирует расщепление двуниговых субстратов на ограниченное число участков ДНК фага T7, предпочитая расщепление противоположной нити, существующей до разрыва. Авторами показано отсутствие высокой специфичности нуклеазы I из фасоли по отношению к фосфодиэфирным связям T₅-st (0) разрывов. Устранение только нескольких нуклеотидов на разрезанных участках фага T5 создает участки, благоприятные для быстрого эндонуклеазного расщепления, катализируемого нуклеазой I из фасоли.

Описано несколько моделей участков в субстратах дуплексной молекулы ДНК, которые расщепляются ss-нуклеазой: 1—термостабильные или «структурно-дышащие» области, т. е. области, богатые АТ-парами [14] или области, которые содержат модифицированные нуклеотиды [6]; 2—непарные основания как в крестообразной части молекулы ДНК [10], так и в петле [7] и в ошибочно-спаренных основаниях; 3—дуплекс по поп-ДНК В-типа спирали, т. е. области с измененным спиралевидным углом или измененным углом пар оснований [6]. Известно предпочтительное отношение фермента к A₁pN и T₁pN соединениям; термолабильность расщепляемых участков, вероятно, обуславливается скорее обогащенностью АТ последовательности, чем присутствием модифицированных нуклеотидов. Крокер и сотр. исследовали механизм гидролиза линейной дуплексной молекулы ДНК, содержащей разрывы или пропуски [17]. Эксперименты, выполненные с молекулой ДНК фага T5 в качестве субстрата, показали, что разорванные участки сами по себе недостаточны для узнавания дуплексной молекулы ДНК нуклеазой I из фасоли. Более важны разрывы в ДНК фага T5, которые содержат последовательность 5'-р-Г-Ц-Г-Ц [26], где определенной 3'-концевой последовательностью является радикал —R·R·A·OH, в котором R=Г на двух больших фрагментах и R=A на одном фрагменте [27]. Преимущественного расщепления участков, где R=A должно было привести к уменьшению мол. массы фага T5 на 8%, обнаружить не удалось. Участки, где R=Г, не удобны для ферментативного расщепления, что, по-видимому, обусловлено их природным богатством ГЦ-парами, которые склонны к минимизации структурного «дыхания». В отличие от нуклеазы из фасоли, нуклеаза SI преимущественно гидролизует ДНК фага T5 на большие фрагменты и превращает в линейную форму разорванную циркулярную молекулу ДНК [5]. Однако не показано действительно ли SI нуклеаза узнает разорванные участки сама, наоборот, узнает пропуски, которые являются результатом внутреннего или загрязненного экзонуклеазной активностью действия на

никкированный участок. Нуклеаза I из фасоли расщепляет линейные двунитевые молекулы ДНК фага T7, gh-1 и РМ2 на ограниченное число отрезков, размеры которых лежат в пределах 300—2100 нуклеотидных пар. Число отрезков и их величина для фага T7 совпадает с числом и величиной структурных генов. Исследование зависимости скорости гидролиза от температуры и ионной силы, а также использование ДНК фага T5 с естественными предшествующими надрезами одной из цепей позволили предложить модель, согласно которой специфичные к однонитевой ДНК эндонуклеазы, и в частности нуклеаза I, расщепляют нативную двунитевую ДНК в особых термолабильных участках, богатых АТ-парами [13].

В противоположность нуклеазе из фасоли и пшеницы [11] описана нуклеаза из другого растительного объекта—внеклеточная нуклеаза из культуры клеток табака, которая катализирует гидролиз ds-ДНК полностью, до образования кислоторастворимых фрагментов [28]. Такую же специфичность в отношении к нативной ДНК проявляют ферментные препараты из листьев овса [32] и клубней картофеля [30], которые катализируют быстрый гидролиз нативной молекулы ДНК, хотя скорость гидролиза денатурированной ДНК ферментными препаратами, выделенными из листьев овса и клубней картофеля, как и у нуклеазы из табака, значительно превышает скорость гидролиза нативной ДНК (90% от общей активности). В то время как нуклеазы из фасоли и пшеницы атакуют нативную ДНК только в областях, очень богатых АТ-парами, и количество кислоторастворимых продуктов, образованных в результате гидролиза, очень малос, нуклеаза из культуры клеток табака способна к полному гидролизу нативной ДНК, с образованием кислоторастворимых продуктов из всего пула ДНК.

Денатурированная нагреванием молекула ДНК под воздействием нуклеазы из культуры клеток табака деградирует на начальные кислоторастворимые фрагменты, либо на пентануклеотиды, либо на молекулы большей длины. В ходе дальнейшей реакции эти фрагменты гидролизуются до малых олигонуклеотидов и моонуклеотидов, что позволяет допустить эндонуклеазный характер действия фермента. Механизм действия нуклеазы окончательно не выяснен и требует дальнейшего детального исследования.

Нуклеаза из культуры клеток табака неспецифична в отношении углеводного остатка. Помимо способности к гидролизу денатурированной и нативной ДНК, фермент проявляет и нуклеотидазную активность, расщепляя с заметной скоростью и 3'-нуклеотиды. Для различных моонуклеотидов скорость ферментативного гидролиза различна. Действие внеклеточной нуклеазы на нуклеотиды и нуклеиновые кислоты выглядит следующим образом (табл. 2) [28].

Активность фермента, способного катализировать гидролиз 3'-АМФ, локализуется при электрофорезе препарата в двух областях полиакриламидного геля. Идентичная картина распределения активности при зональном электрофорезе выявлена и для ss-ДНК, РНК и ds-ДНК.

Т а б л и ц а 2

Субстратная специфичность нуклеазы из табака

Субстраты	Удельная активность
3' — АМФ	10,3
3' — УМФ	3,2
РНК рибосомальная (E. coli)	7,6
ДНК денатурированная фага Т4	11,1
ДНК нативная фага Т4	2,3

Таким образом, внеклеточная нуклеаза из культуры клеток табака очень напоминает ферменты, выделенные из различных тканей высших растений, следующими свойствами: активна при низких значениях рН среды; не требует для каталитического действия присутствия двухвалентных катионов; проявляет достаточно высокую активность в отношении 3'-нуклеотидов, РНК, ss-ДНК в качестве субстратов, полинуклеотиды гидролизуются до 5'-моонуклеотидов и олигонуклеотидов; ЭДТА является реагентом, тормозящим ферментативную активность [28].

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР

Поступило 3.VI 1981 г.

**ՄԵԿ ԸՂԹԱՅԱՆՈՑ ՊՈԼԻՆՈՒԿԼԵՈՏԻԴՆԵՐ ՀԻԴՐՈԼԻԶԱՑՆՈՂ
ՆՈՒԿԼԵՈՏԻԴՆԵՐԻ ՍՈՒՐՍՏՐԱՏԱՅԻՆ ՍՊԵՑԻՖԻԿԱՆ**

ժ. Ի. ՀԱԿՈՐՅԱՆ, Ռ. Ե. ԱԲՐԱՄՈՎ

Հոդվածում ներկայացված են վերջին տարիների գրականության տվյալները, որտեղ հետազոտվում են մեկ շղթայանոց նուկլեինային թթուներ հիդրոլիզացնող սպեցիֆիկ նուկլեազները, որոնք ընդհանրացվում են իրենց տիրատրատային սպեցիֆիկայով:

**ON SUBSTRATE SPECIFIC FEATURES OF NUCLEASES
HYDROLISING SINGLE-STRAND POLYNUCLEOTIDES**

J. I. HAKOPIAN, R. E. ABRAMOV

Recent data in the study of nucleases, which specifically hydrolyse single-strand polynucleotide chains, are given in this paper. Comparative characteristics according to substrate specific features of the mentioned enzymes is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Абрамов Р. Е., Безирджян Х. О., Акопян Ж. И. Биолог. ж. Армении, 30, 58, 1977.
2. Абрамов Р. Е., Акопян Ж. И. Мат. Всесоюз. симпоз. Макромолекула клетки. М., 1979.

3. *Абрамов Р. Е., Безирджян Х. О., Аюлян Ж. И.* Биохимия, 44, 990, 1979.
4. *Аюлян Ж. И., Абрамов Р. Е.* Докл. АН Армянской ССР, 71, 2, 1980.
5. *Beard P., Morrow I. E. and Berg P. J.* Virology, 12, 1303, 1973.
6. *Chan H. W. and Wells R. D.* Nature, 252, 205, 1974.
7. *Crick F. N. C. and Klug A.* Nature, 255, 530, 1975.
8. *Cunningham L., Cattlin B. W., Privat de Garlthe M. J.* Am. Chem. Soc., 78, 464, 1956.
9. *Falaszki A., Adler J. and Khorana H. G.* J. Biol. Chem., 238, 3080, 1963.
10. *Gierer A.* Nature, 212, 1480, 1966.
11. *Hanson D. M., Fairly J. C.* J. Biol. Chem. 244, 2440, 1969.
12. *Healy J. W., Stollar D., Simon M. J., Levine L.* Arch. Biochem. Biophys., 103, 461, 1963.
13. *Heflich R. H., Manohay-Leo E., Maher V. and McCormick J. J.* Photochem. and Photobiol., 30, 247, 1979.
14. *Hippel P. H., Felsenfeld G.* Biochemistry, 3, 27, 1964.
15. *Johnson P. H. and Laskowski M. S.* J. Biol. Chem., 243, 3431, 1968.
16. *Johnson P. H.* J. Biol. Chem., 245, 891, 1970.
17. *Kroecker W. D., Kowalski D. and Laskowski M. S.* Biochem., 15, 4463, 1976.
18. *Lehman J. R. J.* J. Biol. Chem., 235, 1479, 1960.
19. *Lehman J. R.* Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 2, 83, 1963.
20. *Lehman J. R. and Richardson C. C.* J. Biol. Chem., 239, 233, 1964.
21. *Linn S., Lehman J. R.* J. Biol. Chem., 240, 1294, 1965.
22. *Mitoh T., Tsuneko U.* Agr. and Biol. Chem., 41, 1395, 1977.
23. *Mitoh T., Tsuneko U.* J. Biochem., 83, 1521, 1978.
24. *Mikulski A. J. and Laskowski M. S.* J. Biol. Chem., 243, 5026, 1970.
25. *Morrison A. and Cazzarelli H. R.* Cell., 17, 175, 1979.
26. *Nichols B. P. and Donelson I. E.* J. Virology, 22, 520, 1977.
27. *Nichols B. P. and Donelson I. E.* J. Virology, 83, 396, 1977.
28. *Oleson A. E., Yanski A. M., Clark E. T.* Biochem. et Biophys. Acta, 366, 89, 1974.
29. *Ralph R. K., Smith R. A., Khorana H. G.* Biochemistry, 1, 131, 1962.
30. *Suno M., Nomura A. and Mizuno Y.* J. Biochem., Tokyo, 73, 1291, 1973.
31. *Vanesco S., Laskowski M. S.* J. Biol. Chem., 236, 3312, 1961.
32. *Wyen N. V., Erdel S. and Farkas G. L.* Biochem. et Biophys. Acta, 232, 472, 1971.