

2. Галоян А. А. Докл. АН Арм. ССР, 34, 3, 109—111, 1962.
3. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Погосян М. А. Вopr. биохим. мозга, 11, 89—96, 1976.
4. Горизонтова М. П. Тез. 2-й всесоюз. конф. по микроциркуляции, М., 39—40, 1977.
5. Мелешин С. В., Плейшаков В. П. Научн. тр. Новосибирского мед. ин-та, 75, 59—61, 1974.
6. Назаров Г. Ф. Тез. 2-й всесоюз. конф. по микроциркуляции 164—165, М., 1977.
7. Катинас Г. С., Булгак В. И. и др. Архив АГЭ, 9, 97—104, 1969.
8. Мелешин С. В., Иркин И. В. и др. Научн. тр. Новосибирского мед. ин-та, 75, 55—59, 1974.
9. Пирс Э. Гистохимия. Теоретическая и прикладная. М., 1962.
10. Ростомян М. А., Абрамян С. С., Галоян А. А. Кровообращение, 10, 4, 3—7, 1977.
11. Ростомян М. А., Галоян А. А. Биолог. ж. Армении, 24, 1, 24—30, 1971.
12. Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков, 324, М., 1963.
13. Чернух А. М., Александров П. Н., Алексеев О. В. Микроциркуляция, 456, М., 1975.
14. Шурип С. П. Мат-лы 3-го Всесоюз. совещ. по соединит. ткани, Новосибирск, 17—25, 1968.
15. Skolnick P., Huang M. et al. J. Neurochem., 21, 1, 237—240, 1973.
16. Ćirstea M., Grünspan M. J. Physiol., Paris, 51, 4, 771—785, 1959.
17. Johnson F. R., Moran H. C. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 123, 886—889, 1966.
18. Rall T. W., Gilman A. G. Neurosci. Res. Progr. Bull., 8, 267—279, 1970.
9. Schayer R. M. J. Biol. Chem., 199, 1, 245—250, 1952.
0. Schayer R. W. Am. J. Physiol., 186, 2, 199—202, 1956.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 8, 1982

УДК 577.155.2

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ИЗУЧЕНИЯ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ НУКЛЕАЗ, ГИДРОЛИЗУЮЩИХ ОДНОНИТЕВЫЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ

Ж. И. АКОПЯН, Р. Е. АБРАМОВ

Обсуждаются некоторые вопросы субстратной специфичности нуклеаз; гидролизующих одонитевые молекулы нуклеиновых кислот, в частности, влияние условий гидролиза на специфичность этих ферментов.

Ключевые слова: ДНаз, нуклеаза, эндонуклеаза.

В предыдущем сообщении [4] нами были представлены данные о субстратной специфичности нуклеаз из различных биологических объектов, преимущественно гидролизующих одонитевые полинуклеотиды. В настоящем обзоре мы попытаемся обобщить результаты, полученные рядом авторов, которые использовали для выделения специфических нуклеаз другие биологические источники.

В 1977 году Томилиным и др. была описана нуклеаза из *M. luteus*, которая избирательно действует на депурицированные участки молекулы ДНК и не проявляет заметной активности по отношению к молекуле нативной ДНК. Фермент (АП—эндонуклеаза II) избирательно вызывает одонитевые разрывы в двухтяжевой или одотяжевой ДНК,

содержащей апуриновые участки, индуцированные нагреванием при слабокислом значении рН. Он неактивен по отношению к нативной или УФ-облученной ДНК, ионы магния в концентрации 0,002 М не стимулируют его активности и вызывают разрывы 3'-ОН—5'PO₄—концевыми группами с 5' конца апуриновых участков [5].

Рядом авторов в 1968 году были описаны эндонуклеазы из экстрактов *M. luteus*, индуцирующие однотяжевые разрывы в ДНК, метилированной метилметансульфонатом, и в депуринизированной ДНК [31]. В тех же экстрактах были обнаружены эндонуклеазы, узнающие повреждения в УФ-облученных ДНК [31]. Одна из УФ-эндонуклеаз обладает АП-эндонуклеазной активностью [24]. Этот фермент вызывает 3'-ОН—5'PO₄—однотяжевые разрывы с 5'-конца от пиримидиновых димеров или апуриновых участков. Показано, что АП-эндонуклеазная активность принадлежит ферменту (АП=эндонуклеазе II), который связывается с ДЕАЕ—целлюлозой при рН 7,5 и элюируется градиентом NaCl в концентрации 0,1—0,2 М. По всем своим свойствам этот фермент идентичен эндонуклеазе II из *E. coli* и АП-эндонуклеазе из клеток тимуса теленка [10,24].

Хефлихом и др. показана способность эндонуклеазы SI из *Asp. oryzae* удалять тиминсодержащие димеры из УФ-облученной (H³) ДНК фибробластов кожи человека (лимфобластоидная линия NC 37). Под действием нуклеазы SI происходит удаление пиримидиновых тиминсодержащих димеров из состава УФ-облученной человеческой (H³) ДНК, предварительно меченной (H³) тимидином. Однако эффективное удаление этих димеров с помощью нуклеазы SI происходило только при длительной инкубации (8 ч) с относительно высокой концентрацией фермента и на таком уровне УФ-облучения, который обеспечивал образование пиримидиновых димеров в (H³) ДНК порядка 1 на 100—300 пар оснований. Показано также, что удаление образованных димеров обычно происходит в результате атаки нити ДНК без индукции двунитевых разрывов [18].

Экстракты из *M. luteus* практически не содержат эндонуклеазной активности по отношению к нативной ДНК, если анализ проводить в присутствии ЭДТА, но добавление ионов магния стимулирует активность неспецифических нуклеаз. Очищенные препараты АП-эндонуклеазы II не содержат активности нуклеаз, гидролизующих нативную ДНК фага T4, даже в присутствии 0,022M MgCl₂.

Описан другой фермент, по субстратной специфичности напоминающий эндонуклеазу II из той же *M. luteus*, который активен в отношении депуринизированной, алкилированной, арилированной и арилами-дированной молекул ДНК [17]. Фермент не действует на нативную ДНК, но вызывает однонитевые разрывы в ее молекуле, содержащей апуриновые, апириимидиновые участки, образовавшиеся в результате нагревания или подкисления. ДНК, обработанная канцерогенами, становится чувствительной к действию эндонуклеазы. Сравнение количества образующихся под действием эндонуклеазы однонитевых разрывов с числом щелочнолабильных, т. е. апуриновых участков ДНК РМ2, модифицированной канцерогенами, показало, что число разрывов при-

близительно в 2 раза больше количества апуриновых участков. Авторы предполагают, что полученный препарат эндонуклеазы либо узнает как апуриновые участки, так и модифицированные основания ДНК, либо содержит еще ДНК-гликозидазную активность. Пиримидиновые димеры не являются субстратами эндонуклеазы, а количество однонитевых разрывов, которые фермент индуцирует в УФ-облученной ДНК РМ2, в 5 раз превышает количество щелочнолабильных участков. По-видимому, эндонуклеаза узнает некоторые минорные продукты фотоповрежденной ДНК, например, 5,6-насыщенные пиримидиновые основания [17].

Капланом и др. обнаружена сходная нуклеаза, которая активна в отношении метилметансульфонатобогатенной и депуризированной ДНК [20]. Описана и другая эндонуклеаза из *M. luteus* [13], по субстратной специфичности сходная с нуклеазой, описанной Гехтом и Томилиным [5,17]. Однако эндонуклеаза, описанная Гехтом и др., отличается от вышеперечисленных отсутствием активности в отношении пиримидиновых димеров. Она отличается от γ -эндонуклеазы способностью проявлять активность в отношении депуризированной ДНК и по своим свойствам кажется идентичной ферменту, описанному Томилиным и др. [17].

Из супернатантной фракции гибридных дрожжей *Saccharomyces fragilis* \times *Saccharomyces dozhanskii* выделена эндонуклеаза II, которая по своим каталитическим свойствам очень напоминает нуклеазу из *N. crassa* [23]. Она атакует денатурированную ДНК и дрожжевую рРНК приблизительно с одинаковой скоростью. Условия, оптимальные для гидролитического расщепления РНК, способствуют максимальной деградации и денатурированной молекулы ДНК. Действие этой нуклеазы II на полирибонуклеотиды исключительно эндонуклеазного типа. Большинство продуктов реакции ферментативного превращения гомополимеров ди- и тринуклеотиды, имеющие 5'-концевые фосфомоноэфирные группы. Образование мононуклеотидов очень незначительно. Поли-А и поли-У расщепляются на блоки, состоящие из малых олигонуклеотидов, имеющих 5'-концевые фосфомоноэфирные группы. Распределение этих олигонуклеотидов не случайно и, как показали авторы, зависит от строения субстрата. Гидролиз коротких цепей протекает медленнее, чем гидролиз длинных. Эта нуклеаза не специфична по отношению к основаниям полинуклеотидов. По данным авторов, фермент, по-видимому, специфичен по отношению к полинуклеотидам, имеющим беспорядочное спиралевидное строение. Ди-, тринитевые и спаренные структуры не лучшие субстраты эндонуклеазы II из гибридных дрожжей. Поли-А, поли-У и поли-И гидролизуются со значительно большей скоростью, чем поли-Ц, тРНК и рРНК. Фермент гидролизует денатурированную ДНК и рРНК с одинаковой скоростью. Высокополимерная нативная ДНК *E. coli* практически не гидролизуются этим ферментом [23]. Хроматографические исследования продуктов гидролиза на ДЕАЕ-целлюлозе выявили три пика: в первом обнаруживаются нуклеозид-5'-фосфаты (3—10%), во втором—динуклеотид-5'-фосфаты (около 50%), в третьем—тринуклеотиды (около 40%). Отсюда следует, что ди- и тринуклеотиды относительно резистентны к действию нуклеазы из

гибридных дрожжей. Частичное расщепление гомополимеров, имеющее место при различных условиях инкубации фермента с субстратами, показало, что из поли-А образуется множество (рА) гомологов, начиная с динуклеотида. Дальнейшее расщепление с большим количеством единиц фермента и увеличение времени инкубации приводят к накоплению ди- и тринуклеотидов с образованием ограниченного количества мононуклеотидов. Это позволяет предположить, что фосфодиэфирные связи, примыкающие к одному из двух концов олигонуклеотида, экстремально резистентны к расщеплению [23]. Показано, что фермент не специфичен к нуклеозидному окружению расщепляемого участка. Скорость гидролиза поли-Ц была неожиданно малой. Поли-И гидролизуется значительно быстрее, чем поли-У, где, как известно, отсутствует вторичная структура (беспорядочная спираль). Авторы считают, что это может быть результатом совместного эффекта рН среды, температуры, ионной силы, структуры и пространственного расположения нуклеотида в растворе. Детальными исследованиями показано, что ферментный препарат полностью свободен от неспецифической фосфодиэстеразной активности и содержит только следовую активность щелочной фосфатазы, которая при определенных условиях инкубации полностью ингибируется [23].

Эта нуклеаза по субстратной специфичности резко отличается от нуклеаз, описанных Даннером и др., Отакой и др., так как последние гидролизуют РНК до нуклеозид-3¹-монофосфатов [9,26]. Однако по ряду специфических свойств нуклеаза из дрожжевых экстрактов напоминает ферменты из ядер клеток печени [19], *Asotobacter agilis* [30].

Накао и др. показали, что нуклеаза, которая расщепляет как ДНК, так и РНК на 5¹-концевые фосфатные олигонуклеотиды, имеется также в *Rhodotorula glutinis* [25].

Описана новая нуклеаза из отечественного препарата амилоризина ПХ10, полученного из грибов *Aspergillus oryzae*, она напоминает по своей субстратной специфичности нуклеазу SI, свободную от неспецифической ДНазной активности, и практически не расщепляет гибридную молекулу (Н³) ДНК/РНК (табл.). Характерной чертой этой нуклеазы

Т а б л и ц а

Неспецифическая ДНазная активность на этапах очистки нуклеазы
из амилоризина ПХ10

Этапы очистки	Поглощение кислоторастворимой фракции при 260 нм	Активность	Удельная активность
Экстракция	1,8	78560	0,08
Нагревание до 65°	0,122	8360	0,017
Фракционирование сульфатом аммония	0,028	500	0,02
Хроматография на ДЕАЕ-целлюлозе	0,007	0	0
Контроль	0,007	0	0

является ее способность катализировать гидролитическое расщепление поли-А со скоростью, равной половине скорости гидролиза денатурированной молекулы ДНК. Фермент способен расщеплять фосфодиэфирную

связь динуклеотида рТрГ с образованием тимидиновых мононуклеозидфосфатов [1—3].

Одновременно в гибридных дрожжевых экстрактах описана другая нуклеаза I, очень сходная с нуклеазой II [23]. Различия между ними незначительны: их отличают разная степень ингибирования некоторыми соединениями, способность ионов магния восстанавливать активность фермента и, наконец, степень заряда белковой молекулы [23]. Биологическая значимость этих нуклеаз в супернатанте не известна, однако, как показал анализ конечных продуктов гидролиза, препарат нуклеазы II может быть использован для получения олигонуклеотидов с 5¹-фосфомоноэфирной связью без значительного загрязнения другими типами олигонуклеотидов. По специфичности действия на участке субстрата с беспорядочной структурой нуклеаза II из гибридных дрожжей аналогична нуклеазе, выделенной из почек барана [21]. Последняя неспецифична по отношению к основаниям и сахарной половине субстратов. Исследование гидролиза полинуклеотидов и полинуклеотидных комплексов, включающих сополимеры, показало, что фермент может атаковать только бесструктурные области нуклеиновых кислот. Конечными продуктами гидролиза являются олигонуклеотиды, большинство которых—тетраммеры с 5¹-фосфатным концом [21]. Хотя поли-Г не является субстратом этой нуклеазы, что обусловлено, по-видимому, особенностью его структурной организации, тем не менее комплексный полимер (УГ) в соотношении 2:1 расщепляется ферментом с достаточно высокой скоростью. Нативная ДНК полностью резистентна к действию фермента. Показано, что все молекулы тРНК могут служить субстратами нуклеазы. Это противоречит характеру некоторых эндонуклеаз, таких, как полинуклеотидфосфорилаза, которая при низкой температуре атакует только некоторые молекулы тРНК, тогда как остальные молекулы тРНК резистентны к действию нуклеазы. Предпочтение фермента бесструктурным областям субстрата делает его идеальным для изучения механизмов репликации ДНК и расположения петель в сРНК [21].

Из органов млекопитающих (мозг ягненка) получена эндонуклеаза, специфически гидролизующая денатурированную нагреванием ДНК. Очищенный фермент проявляет незначительную активность в отношении нативной ДНК [16]. Дополнительные данные о специфичности денатурированной ДНК в качестве субстрата были получены центрифугированием в градиенте CsCl и трансформацией *B. subtilis*. Частично денатурированная ДНК из *B. natto* проявила две зоны в градиенте CsCl. После обработки ферментом обнаружена одна зона, соответствующая нативной молекуле ДНК, хотя термическая денатурация ДНК из *B. subtilis* выявила наличие небольшой трансформированной ферментативной активности. Очищенный ферментный препарат не гидролизовал нативную ДНК даже при 13-часовой инкубации. Олигонуклеотиды составляли большую часть образованных конечных продуктов реакции. Средняя длина нуклеотидной цепи этой фракции составляла 5—14 остатков. Продуктами фосфодиэстеразы мозга ягненка

ка являются 5-олигонуклеотиды, а участком ферментативного гидролиза служит 3'-гидроксильный участок диэфирной связи.

Интересные данные были получены Дальтоном. Путем тиол-ди-сульфидного обмена получен гибридный фермент ДНаза/РНаза [8]. ДНаза и РНаза в отдельности были предварительно тиолированы в соответствующих условиях. Очищенный гибридный фермент содержит по одной молекуле ДНазы и РНазы и гидролизует ДНК и РНК со скоростями, равными 75 и 40% от исходных скоростей каждого из ферментов. Соответствующая РНК-цель в ДНК/РНК-гибриде гидролизуется ДНазой/РНазой, в то время как исходная РНаза ее практически не расщепляет. Ингибитор РНаз из плаценты человека угнетает гибридный фермент на 50% при концентрации, в 20 раз превышающей ту, которая требуется для ингибирования исходного фермента в той же степени [8]: Описана нуклеаза, выделенная из другого биологического объекта— пшеницы [22], которая со значительной скоростью катализирует расщепление денатурированных молекул ДНК и РНК до кислоторастворимых продуктов реакции, а также гидролизует 3'-моонуклеотиды. Показано, что нативная ДНК расщепляется в определенных участках с выходом больших дуплексных фрагментов ДНК. Нуклеаза характеризуется эндонуклеазным типом реакции в отношении денатурированной молекулы ДНК и проявляет преимущественно экзонуклеазную активность к молекуле РНК. Продуцированные моонуклеотиды имеют 5'-фосфомоноэфирные группы. Фермент предпочитательнее гидролизует 3'-фосфоэфирные связи адениловой кислоты, затем тимидиловой и цитидиловой кислот в ДНК и рибогомополимерах соответственно. Фосфоэфирные связи, образованные цитидиловой и особенно гуаниловой кислотами, относительно резистентны к действию фермента, выделенного из пшеницы. 3'-нуклеотидазная активность фермента при значениях рН 5,0 к различным моонуклеотидам также различна: нуклеотиды, содержащие аденин, гидролизуются ферментом значительно быстрее, а в ряду нуклеотидов— тимин (урацил) > цитозин > гуанин— активность понижается. Нуклеаза из пшеницы не действует на 5'-АМФ, бис-п-нитрофенилфосфат, 5'-п-нитрофениладенилат и 5'-нитрофенилтимидилат. Показан очень низкий уровень гидролиза п-нитрофенилфосфата и 3'-п-нитрофенилтимидилата. По своим свойствам расщеплять денатурированную ДНК, РНК и 3'-АМФ фермент из пшеницы подобен нуклеазе из фасоли [22].

Описана нуклеаза из *B. subtilis* (штамм Marburg 168 T1), которая преимущественно деградирует одонитевые ДНК и УФ-облученную денатурированную ДНК, тогда как препараты нативной и УФ-облученной двунитевой ДНК практически не разрушаются за 30 мин (инкубация при температуре 37° переводит в кислоторастворимую фракцию 2% ДНК). Анализ продуктов деградации одонитевой молекулы ДНК показал, что описанный фермент является эндонуклеазой [14].

Среди разных видов рода *Penicillium* обнаружено широкое распространение нуклеаз двух типов— нуклеазы Р1 и неспецифической РНазы [11]. Неспецифическая РНаза гидролизует РНК до 3'-моонуклеотидов через промежуточное образование 2', 3'-циклических нуклеотидов. Ско-

рость этого процесса уменьшается в ряду $A \geq C \geq U \geq G$. Установлено, что в клетках, выращенных на среде с пшеничными отрубями, нуклеаза P1 представлена в виде комплекса с малоноталоктаном.

Одной из наиболее специфических по отношению к однонитевым цепям нуклеиновых кислот нуклеаз является нуклеаза S1 [6, 34, 35]. В результате очистки экстрактов мицелия *Asp. oguzae* было обнаружено два пика активности, способных деградировать денатурированную молекулу ДНК. Нуклеазы, соответствующие этим пикам, обозначены как S1 и S2. При исследовании рибонуклеазной активности также было обнаружено два пика: один идентифицирован как рибонуклеаза T2 (К. Ф. 3.1.4.8), другой как T1 (К. Ф. 3.1.4.8) [27].

Показано, что нуклеаза S1 гидролизует денатурированную ДНК на 100%, слабо гидролизует нативную ДНК (10%) и еще слабее—бис-п-нитрофенилфосфат (5%). Исследовано также действие нуклеазы S1 на молекулу частично денатурированной ДНК. Показана определенная зависимость между температурой денатурации субстрата и степенью его гидролиза (время денатурации постоянно и равно 10 мин). По данным Андо, препарат свободен от нуклеазной активности к нативной ДНК или содержит ее следовые количества [6]. Конечными продуктами гидролиза денатурированной ДНК является 5'-мононуклеотиды и олигонуклеотиды. Нуклеаза S1 специфична по отношению к субстратам с различным составом и строением. А-богатые L-нити мышинной ДНК гидролизуются полнее, чем Т-богатые Н-нити при рН 4,0. (А+Ц)-богатые L-нити ДНК морской свинки гидролизуются быстрее, чем (Т+Г)-богатые Н-нити при рН 4,0—4,9. Нуклеаза S1 может также эффективно гидролизовать денатурированную нагреванием ДНК из *M. lysodeikticus* с содержанием ГЦ пар, равным 72% [32]. Результаты исследования указывают на слабое действие на молекулу двунитовой ДНК; после обработки нуклеазой S1 в кислоторастворимую фракцию переходит 20% материала. Показано также, что нуклеаза S1 расщепляет перемещенные петли в участках расположения 7S—иницирующих фрагментов, но не расщепляет родительский матричный тяж, комплементарный 7S фрагменту. Конечный продукт представляет собой циркулярную молекулу, содержащую минимум два разрыва, локализованных внутри участка, соответствующего смещенным петлям. Известно, что нуклеаза S1 переводит кольцевую ДНК в линейную суперспирализованную форму. Механизм действия фермента на кольцевую ДНК не совсем ясен. Существуют противоречивые мнения. Так, например, Уолдек и др. утверждают, что кольцевая молекула ДНК обезьяньего вируса SV 40 ковалентно замкнута и ослаблена и подвергается действию нуклеазы в одном месте, но участок разрезания на кольце является случайным; по утверждению авторов, действие нуклеазы S1 на кольцевую ДНК аналогично таковому первому типу ферментов рестрикции [36]. Другая точка зрения заключается в том, что кольцевая молекула ДНК из полиомы ковалентно замкнута, но не ослаблена и гидролизует нуклеазой S1 не случайно, а специфически, на определенном участке молекулы субстрата; авторы допускают, что участок действия нуклеазы S1 на молекуле ДНК является АТ-богатой областью, которая частично

денатурирована и вследствие этого, по-видимому, чувствительна к действию нуклеазы SI [12]. Обнаружено также, что нуклеаза SI специфична в отношении однонитевых молекул нуклеиновых кислот и образует разрывы в определенных участках кольцевых вирусных ДНК-интермедиатов, полученных от опухолевых клеток линий Т6 через один день после инфекции вирусом опухолей птиц. Однако в том случае, когда кольцевые ДНК предварительно обрабатывались рестриктазой, нуклеаза SI не проявляла активности на специфическом для нее участке. Последний, как установлено, находится в непосредственной близости от участка связывания затравочной тРНК. Генетическими и биохимическими методами показано, что нуклеаза SI обладает «откусывающим» свойством, она как бы «откусывает» концы дуплексной молекулы ДНК в ходе реакции, причем длина фрагментов, образовавшихся при этом, сильно варьирует [28].

При анализе скорости седиментации продуктов гидролиза молекулы ДНК бактериофага Т5 (двунитевая ДНК), которая имеет 4 однонитевых участка в определенных позициях, выявлено, что фермент может расщеплять участки на нити, противоположной петлям в двунитевой ДНК, вызывать сайт-специфическую фрагментацию ДНК при соответствующих условиях [29]. Показано также, что фермент узнает изменения в β -структуре, происходящие в результате действия малых доз УФ-облучения. Кроме того, нуклеаза SI расщепляет обе нити кольцевой ковалентно замкнутой суперспирализованной ДНК, вызывая образование линейной дуплексной молекулы, свободной от внутренних однонитевых участков [12,29]. В этих экспериментах в качестве субстратов были использованы ДНК вируса SV 40 и пилоры. Нуклеаза SI может расщеплять нить, противоположную нити с разрывом в цепи [15]. Сайт-специфическое расщепление в большой степени зависит от концентрации NaCl и температуры реакции. Однако это еще не значит, что в этих условиях происходит уменьшение ферментативной активности. Предполагается, что природная молекула фага Т5 содержит нестойкие к гидролизу однонитевые области, которые узнаются и разрезаются нуклеазой SI. Такое нестойкое плавление возможно при наличии однонитевого участка, где кооперативная стабилизация двуспиральности соседних пар оснований ослабевает. Разрыв сам по себе еще не достаточен для разрезания противоположной нити нуклеазой SI, необходима частично денатурированная двуспиральность. Авторы предполагают, что их препарат нуклеазы SI загрязнен незначительным количеством экзонуклеазной активности и фермент действует только после превращения разрывов в бреши (пропуски), хотя это служит доказательством того, что продукты расщепления циркулярной суперспирализованной ДНК SV40 [7] препаратом нуклеазы SI идентичны таковым в экспериментах Вогта при исследовании субстратной специфичности нуклеазы SI из того же биологического объекта—*Aspergillus oguzae* [34]. Фермент неспецифичен к последовательности оснований. 93% расщепленных продуктов денатурированных молекул ДНК тимуса теленка является 5¹-дезоксирибомононуклеотидами всех 4-х оснований.

Однако эти эксперименты были проведены с избытком фермента и не дали полной информации относительно скорости реакции. Для выяснения вопроса о предпочтительном отношении фермента к различным гомологам нуклеотидных последовательностей Вогт исследовал изменение скорости реакции в зависимости от скорости гидролиза четырех рибонуклеотидных гомополимеров в качестве субстратов [34]. В стандартной реакционной среде при значении рН 4,6 и при 45° поли-У деградировал с такой же скоростью, что и денатурированная молекула ДНК, в то же время скорость гидролиза поли-гЦ равнялась 5% этой скорости. Фермент практически (0,1% от скорости деградации денатурированной нагреванием молекулы ДНК) не действовал на поли-гА и поли-гГ. Однако эти результаты полностью не отражают субстратной специфичности нуклеазы к последовательности оснований в нуклеотидной цепи, поскольку поли-Ц, поли-А и поли-Г имеют выраженную вторичную структуру при использованных значениях рН среды и ионной силе стандартной реакционной смеси. Два полимера—поли гЦ и поли-гА,—как известно, проявляют значительную зависимость вторичной структуры от значений рН, используемых для выявления оптимальной скорости реакции нуклеазы. При рН 6,4, где нуклеаза проявляет лишь 5% активности, выявляемой при рН 4,6, эти полимеры образуют почти беспорядочную спираль, обнаруженную гипохромными измерениями [34]. Действительно, при этих значениях рН кислоторастворимость, вызванная действием нуклеазы на эти два полимера, соответственно равна приблизительно 30 и 50% скорости гидролиза денатурированной молекулы ДНК при рН 6,4. Относительные скорости расщепления поли-У и поли-Г, с другой стороны, не изменяются при значениях рН как 4,6, так и 6,4. Таким образом, по-видимому, активность нуклеазы S1 неспецифична к встречающимся последовательностям в участках ферментативного расщепления в зависимости от рН инкубированной среды.

Вогт применил более чувствительный метод—метод щелочной седиментации: меченую нативную молекулу ДНК фага λ инкубировал с нуклеазой S1. Хотя препарат фаговой ДНК не был полностью свободен от способности образовывать одностебельные разрывы, основной пик на седиментограмме, по-видимому, не принадлежит продуктам гидролиза этих участков. По сравнению с параллельно инкубированным субстратом, содержащим ту же фаговую ДНК, но денатурированную нагреванием, нуклеаза переводит 96% метки в кислоторастворимую фракцию. В присутствии 0,05 М NaCl, вместо 0,3 М NaCl, нуклеаза наносит один разрыв в каждой из двух интактных нитей ДНК фага λ. Менее очищенная фракция нуклеазы (фракция после ДЕАЕ-целлюлозной хроматографии α-амилазного экстракта) наносит 20—30 разрывов в нативной молекуле ДНК фага λ при описанных условиях.

Исследования показали, что нуклеаза S1 не атакует РНК/ДНК гибриды, образованные гибридизацией (H³) d ТТТР-меченой ДНК, синтезированной *in vitro* обратной транскриптазой частично разрушенных миелобластов птичьего вируса с 70 s РНК миелобластов птичьего вируса [33]. Продукт плавления разводили в Cs₂SO₄ и центрифугиро-

вали до уравнивания отдельных РНК и ДНК. Пик РНК, содержащий осажденную РНК и 30% из подсчитанных ДНК, был диализован и затем инкубирован с нуклеазой. Более чем 90% радиоактивности было резистентно к действию нуклеазы SI, тогда как та же фракция, денатурированная нагреванием, почти полностью подвергалась нуклеазному расщеплению.

Институт экспериментальной
биологии АН Армянской ССР

Поступило 11.XII 1981 г.

ՄԻ ՇՂԹԱՅԱՆՈՑ ՆՈՒԿԼԵՆԱՅԻՆ ԹԹՈՒՆԵՐԻ ՍՊԵՑԻՖԻԿ
ՆՈՒԿԼԵԱԶՆԵՐԻ ՍՈՒԲՍՏՐԱՏԱՅԻՆ ՍՊԵՑԻՖԻԿՈՒԹՅԱՆ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇ ՀԱՐՑԵՐ

ժ. Ի. ՀԱԿՈՐՅԱՆ, Ռ. Ե. ԱԲՐԱՄՈՎ

Տվյալ աշխատանքում քննարկում են մի շղթայանոց նուկլեինային թթուների հիդրոլիզող նուկլեազների սուբստրատային սպեցիֆիկության որոշ հարցեր, մասնավորապես, հիդրոլիզի պայմանների ազդեցությունը ֆերմենտների սպեցիֆիկության վրա:

SOME PROBLEMS OF STUDY OF SUBSTRATE SPECIFICITY
OF SINGLE STRAND NUCLEASES

J. I. AKOPIAN, R. E. ABRAMOV

Substrate specificity of single-strand nucleases has been discussed in this paper and, in particular, the influence of hydrolyse conditions on the specificity of the enzymes.

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., Безирджян Х. О., Акопян Ж. И. Биохимия, 44, 990, 1979.
3. Абрамов Р. Е., Акопян Ж. И. Мат-лы Всесоюзн. симп. «Макромолекулы клетки», 46, М., 1979.
4. Акопян Ж. И., Абрамов Р. Е. Биолог. ж. Армении, 34, 11, 1981.
5. Томилин Н. В. и Баренфельд Л. С. Биохимия, 42, 985, 1977.
6. Ando T. Biochim. et Biophys. acta, 114, 158, 1966.
7. Beard P., Morrow J. E. J. Virology, 12, 1303, 1973.
8. Dalton W. Biochemistry, 18, 4449, 1979.
9. Danner J. and Morgan R. S. Biochim. et Biophys. acta, 76, 655, 1963.
10. Friedberg E. C., Hadi S. M. J. Biol. Chem., 244, 5879, 1969.
11. Fujimoto M., Kuninaka A., Yoshino H. Agr. and Biol. Chem., 41, 1121, 1977.
12. Germond I. E. Europ. J. Biochem, 43, 591, 1974.
13. Hamilton L., Mahler J. and Grossman L. Biochemistry, 13, 1886, 1974.
14. Hayase E., Ando T. Agr. and Biol. Chem., 244, 2440, 1969.
15. Hayward G. S. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 71, 2108, 1974.
16. Healey J. W., Stollar D., Simon M. J., Levine L. Arch. Biochem. Biophys., 103, 461 1963.

17. Hecht R., Thielman H. *Europ. J. Biochem.*, 89, 607, 1978.
18. Heflich R. H., Mahoney-Leo E., Maher V. and McCormick J. J. *Photochem. and Photobiolog.*, 30, 247, 1979.
19. Heppel L. A. *Science*, 123, 415, 1956.
20. Kaplan I. C., Kushner S. R. and Grossman L. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 63, 144, 1969.
21. Kasal K. and Grunberg-Manago M. *Europ. J. Biochem.*, 1, 152, 1967.
22. Kroeker W. D., Hanson D. M. *J. Biol. Chem.*, 250, 3767, 1975.
23. Lee S. Y. *Biochim. Biophys. acta*, 151, 126, 1968.
24. Ljungquist S., Lindahl T. *J. Biol. Chem.*, 249, 1530, 1974.
25. Nakao Y., Lee S. Y., Halvorson H. O. and Bock R. M. *Biochim. et Biophys. acta*, 151, 114, 1968.
26. Ohtaka Y., Uchida K., Sakai T. *J. Biochem.*, 54, 322, 1963.
27. Sato K. and Egami F. *J. Biochem.*, 44, 753, Tokyo, 1957.
28. Shank T. E., Rhodes C., Rigby P. W. I., Berg P. *Progr. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 72, 989, 1975.
29. Shishido K. *Agr. and Biol. Chem.*, 43, 1093, 1979.
30. Stevens A. and Hilnoe R. J. *J. Biol. Chem.*, 235, 3016, 1960.
31. Strauss B., Robbins M. *Biochim. et Biophys. acta*, 161, 68, 1968.
32. Sutton W. D. *Biochim. et Biophys. acta*, 240, 522, 1971.
33. Temin H. M. and Mizutani S. *Nature*, 226, 1211, 1970.
34. Vogt V. M. *Europ. J. Biochem.*, 33, 192, 1973.
35. Vort V. M. *Meth. Enzymol. Nucl. Acids*, 65, 1, 248, 1980.
36. Waldeck W. *Biochim. et Biophys. acta*, 425, 157, 1976.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 8, 1982

УДК 591.1.15

СОДЕРЖАНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ И АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ В СИНАПТОСОМАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ ЦНС

Л. А. СТЕПАНЯН

Исследовались сдвиги в содержании норадреналина и адреналина и активность моноаминоксидазы в синапсосомах головного мозга при естественных физиологических воздействиях. При пищевом и условнорефлекторном пищевом возбуждении отмечается увеличение количества норадреналина и адреналина и понижение активности фермента. Условнорефлекторное пищевое торможение вызывает снижение содержания норадреналина и активности фермента.

Ключевые слова: катехоламины, моноаминоксидаза, синапсосомы.

В числе актуальных проблем современной биохимии и фармакологии ЦНС вопрос о роли центральных норадренергических структур занимает особое место. Данные о влиянии катехоламинов на поведение, выработку условных рефлексов, о количественных сдвигах катехоламинов при различных функциональных состояниях ЦНС противоречивы и спорны [2, 11]. Предполагается, что адренергические синапсы вовле-