

2. Rulland P. S., Dube S. K. Specific interaction of an initiator tRNA fragment with 30S ribosomal subunits // *J. Mol. Biol.*—1969.—43, N 2.—P. 273—280.
3. Rose S. J., Lozary P. T., Uhlenbeck O. C. Binding of yeast tRNA^{Phe} anticodon arm to *Escherichia coli* 30S ribosomes // *Ibid.*—1983.—167, N 1.—P. 103—117.
4. Kirillov S. V., Makhno V. I., Semenov Y. P. Mechanism of codon-anticodon interaction in ribosomes. Direct functional evidence that isolated 30S subunits contain two codon-specific binding sites for transfer RNA // *Nucl. Acids Res.*—1980.—8, N 1.—P. 183—196.
5. Comparative study of the interaction of polyuridylic acid with 30S subunits and 70S ribosomes of *Escherichia coli* // V. I. Katutin, Y. P. Semenov, V. I. Makhno, S. V. Kirillov // *Ibid.*—N 2.—P. 403—421.
6. Aoyagi S., Inoue J. Isolation of dinucleotides and seven trinucleotides from RNA-ase T₁ digest of nucleic acids and their UV spectral characterization // *J. Biol. Chem.*—1968.—243, N 3.—P. 511—520.
7. Litt M. A simple procedure for the purification of tRNA^{Phe} // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1968.—32, N 3.—P. 507—511.
8. Bocher B. R., Ames B. A. Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography // *J. Biol. Chem.*—1982.—257, N 16.—P. 9759—9769.
9. Riggs A. D., Bourgeois S., Cohn M. The *lac* repressor-operator interaction. 3. Kinetic studies // *J. Mol. Biol.*—1970.—53, N 3.—P. 401—417.
10. Kinetic studies on the Ser-tRNA^{Ser} from yeast // A. Pingoud, D. Riesner, D. Boehme, G. Mass // *FEBS Lett.*—1973.—30, N 1.—P. 1—5.
11. Determination of binding parameters from Scatchard plots. Theoretical and practical consideration // H. G. Weder, Q. Schildknecht, R. A. Lutz, P. Kisselring // *Eur. J. Biochem.*—1974.—42, N 2.—P. 475—481.
12. Катутин В. И., Кириллов С. В. Связывание фенилаланиновой тРНК из дрожжей с рибосомами *Escherichia coli*. Влияние удаления модифицированного основания с 3'-стороны антикодона на келон-антикодоловое взаимодействие // *Молекуляр. биология.*—1981.—18, № 4.—С. 1486—1496.
13. Edsall J. T., Wyman J. *Biophysical chemistry.*—New York: Acad. press, 1958.—800 p.
14. Kirillov S. V., Makarov E. M., Semenov Yu. P. Quantitative study of interaction of deacylated tRNA with *Escherichia coli* ribosomes. Role of 50S subunits in formation of the E site // *FEBS Lett.*—1983.—157, N 1.—P. 91—94.
15. Grosjean H., Soll D. G., Crothers M. Studies of the complex between transfer RNAs with complementary anticodons // *J. Mol. Biol.*—1976.—103, N 3.—P. 499—519.
16. Потанов А. И. Механизм стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов на рибосомах в ходе трансляции // *Журн. общ. биологии.*—1985.—35, № 1.—С. 63—77.
17. Potanov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl-tRNA selection at the ribosome // *FEBS Lett.*—1982.—146, N 1.—P. 5—8.

Ленингр. ин-т ядер. физики
им. Б. П. Константинова АН СССР

Получено 16.12.87

УДК 577.113.6

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ РЕСТРИКТАЗ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ (2'-5')ОЛИГОАДЕНИЛАТОВ *in vitro*

З. Ю. Ткачук, Л. В. Ткачук, Е. И. Квасюк, Г. В. Зайцева,
Е. И. Калининченко, И. А. Михайлопуло, Г. Х. Мацука

Введение. В последнее время значительно возрос интерес к изучению биохимических эффектов (2'-5') олигонуклеотидов. Он обусловлен в первую очередь установлением важной роли 5'-трифосфатов (2'-5') олигоадениловой кислоты [(2'-5')pppA_n, главным образом n=3] в качестве ключевого медиатора одного из каскадов биохимических событий, вызываемых интерфероном [1—3]. Полагают, что путь биохимических превращений, включающий образование (2'-5')pppA_n, дает основной вклад в противовирусный эффект интерферона [1—3]. Однако этим не исчерпывается биохимическое значение указанных олигоаденилатов. Было показано, что наряду с (2'-5')pppA_n в клетках, обработанных интерфероном, присутствуют 5'-дефосфорилированные, «короткие» (2'-5') олигоаденилаты ((2'-5')A_n, главным образом n=3) [4], количество которых, по-видимому, не зависит от концентрации (2'-5')pppA_n. Более того, (2'-5')A₃ выполняют, по всей вероятности, само-

стоятельные биологические функции, например, ингибируют синтез ДНК в различных культурах клеток [5, 6], обнаруживают антимитогенный эффект [7], повышают противоопухолевую активность клеток природных киллеров [8]. В результате интенсивных биохимических исследований было показано, что аналоги $(2'—5')A_3$ обнаруживают широкий спектр биологических свойств, по крайней мере в некоторых культурах клеток (см., например, работы [5, 6, 8—12]).

Молекулярный механизм биологического действия $(2'—5')pprA_n$ заключается в связывании и последующей активации латентной эндогенной или индуцированной интерфероном эндорибонуклеазы, которая расщепляет мРНК и рРНК, ингибируя тем самым трансляцию [1—3, 11, 12]. Относительно механизма действия $(2'—5')A_3$ и ее аналогов имеется значительно меньше данных. На примере аналогов $(2'—5')A_3$, содержащих известные антиметаболиты 9-(β -D-ксилофуранозил)аденин $((2'—5')xylA_3)$ и 3'-дезоксиаденозин $((2'—5')3'dA_3)$ в качестве мономерных структурных единиц, было продемонстрировано, что они обнаруживают активность в отношении вируса герпеса простого типа 1 и 2 в результате действия клеточных фосфодиэстераз, что приводит к образованию соответствующих нуклеозид-5'-монофосфатов и нуклеозидов [10]. С другой стороны, в ряде работ убедительно было показано, что $(2'—5')A_3$ и ее 3'-дезоксипротивоположность $(2'—5')3'dA_3$ обнаруживают биологические эффекты как таковые [5—9, 12]. Следует подчеркнуть, что эти «коровые» тримеры имитируют многие эффекты действия интерферона на клетки [5—9]. Было показано также, что механизм действия «коровых» $(2'—5')$ тримеров не обусловлен их 5'-фосфорилированием в клетке и активацией эндорибонуклеазы, которая, в свою очередь, не активируется 5'-дефосфорилированными $(2'—5')$ тримерами [7, 11]. Для выяснения молекулярных механизмов функционирования «коровых» $(2'—5')$ тримеров нами начаты исследования по изучению влияния этой группы соединений на функциональные свойства ферментов обмена нуклеиновых кислот из различных источников. В настоящей работе изучены особенности функционирования ферментов рестрикции *EcoRI*, *BamHI* и *HindIII* в присутствии $(2'—5')A_3$ (I) и $(2'—5')3'dA_3$ (II).

Материалы и методы. В работе использовали нативную ДНК фага λ *c1857s7*, выделенную из очищенных и концентрированных в градиенте плотности CsCl частиц фага фенольной экстракцией по методу Кайзера и Хогнесса [13]. Синтез тримеров (I) и (II) осуществлен согласно данным работ [14] и [15] соответственно. Концентрацию исходных растворов олигоаденилатов определяли спектрометрически [14, 15]. В работе использованы ферменты рестрикции *EcoRI*, *BamHI* и *HindIII* производства НПО «Фермент» (Вильнюс). ДНК фага λ расщепляли, применяя следующие буферные растворы: *EcoRI* — 100 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl; *BamHI* — 6 мМ трис-НСl, рН 7,9, 6 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl, 0,02 %-ный тритон X-100; *HindIII* — 10 мМ трис-НСl, рН 7,4, 7 мМ MgCl₂, 60 мМ NaCl, 6 мМ 2-меркаптоэтанол. Буфер для рестрикции и растворы олигоаденилатов прогревали при 60 °С 15 мин для устранения случайных нуклеаз. Стандартную реакционную смесь, содержащую 2 мкг ДНК фага λ , 2 единицы активности фермента рестрикции и 0,1—10 мкг олигоаденилата в 30 мкл буферного раствора, инкубировали 1 ч при 37 °С. Реакцию останавливали прогреванием реакционной смеси при 60 °С в течение 10 мин, затем добавляли 3 мкл 0,25 %-ного раствора бромфенолового синего и наносили на агарозную пластинку [16]. В некоторых экспериментах олигоаденилаты пренкубировали с ферментами рестрикции в соответствующем буферном растворе при 37 °С в течение 30 мин. Далее к смеси добавляли ДНК λ и инкубировали, как описано выше. Фрагменты ДНК разделяли в 0,8—1 %-ной агарозе («Seriva», ФРГ) на пластинке при напряжении электрического поля 2 В/см в буфере, содержащем 0,04 М трис-НСl, рН 8,0, 0,02 М CH₃COONa, 1 мМ ЭДТА, 18 мМ NaCl, и окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) в течение 30 мин. Флюоресцирующие полосы ДНК определяли и фотографировали на ультрамикроскопе С-50 («San-Gabriel», США).

Результаты и обсуждение. Нами найдено, что ферменты рестрикции *EcoRI*, *BamHI* и *HindIII* в присутствии некоторых $(2'—5')$ олигоаде-

интатов теряют свою сайт-специфичность и функционируют подобно неспецифическим ДНКазам. Этот эффект зависит от структуры (2'—5') олигоаденилата, его концентрации и типа рестриктазы. Так, обработка ДНК фага λ ферментом *EcoRI* в присутствии тримера (II) приводит к практически полному, неспецифическому гидролизу ДНК фага λ (рис. 1, дорожка 4). В аналогичных условиях в присутствии тримера (I) фермент полностью сохраняет свою сайт-специфичность (дорожка

Рис. 1. Анализ расщепления ДНК фага λ ферментами рестрикции в присутствии тримеров: 1—контроль рестрикции ДНК фага λ ферментом *EcoRI*; 2—преинкубация *EcoRI* с тримером (II) и последующее расщепление ДНК фага λ ; 3, 5—расщепление ДНК фага λ ферментом *EcoRI* в присутствии тримера (I); 4—то же в присутствии тримера (II); 6—контроль рестрикции ДНК фага λ ферментом *BamHI*; 7, 8—преинкубация *BamHI* с тримерами (II) и (I) соответственно и последующее расщепление ДНК фага λ ; 9, 10—расщепление ДНК фага λ ферментом *BamHI* в присутствии тримеров (II) и (I) соответственно

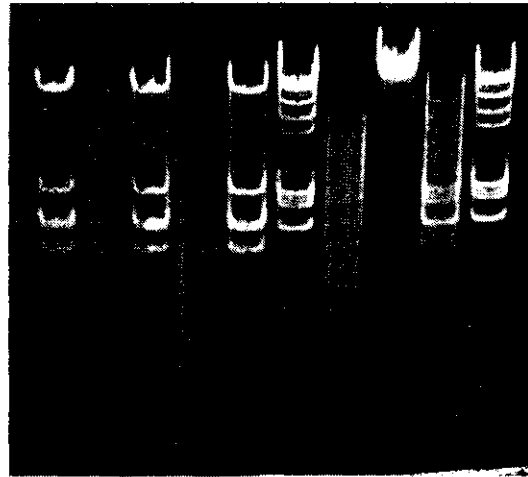


Fig. 1. Electrophoretic analysis of DNA phage treated with restriction endonucleases *EcoRI* and *BamHI* in the presence of (2'-5') A_3 (I) and (2'-5')3'dA₃ (II). 1—DNA λ treated with *EcoRI* preincubated, control; 2—DNA λ treated with *EcoRI* preincubated with (II); 3—DNA λ treated with *EcoRI* preincubated with (I); 4—DNA λ treated with *EcoRI* in the presence of (II); 5—DNA λ treated with *EcoRI* in the presence of (I); 6—DNA λ treated with *BamHI*, control; 7—DNA λ treated with *BamHI* preincubated with (II); 8—DNA λ treated with *BamHI* preincubated with (I); 9—DNA λ treated with *BamHI* in the presence of (II); 10—DNA λ treated with *BamHI* in the presence of (I)

5). Эта картина сохраняется при проведении предварительной инкубации *EcoRI* с (2'—5') олигомерами (I) и (II) и последующей обработке ДНК фага λ (дорожки 3 и 2). Проведенный эксперимент не позволяет дать ответа на вопрос, с каким компонентом — ферментом или ДНК — взаимодействуют (2'—5') тримеры. В случае фермента *BamHI* имеет место несколько иная картина. Следует отметить, что полученные нами данные по рестрикции ДНК фага λ под действием фермента *BamHI* отличаются от стандартных, описанных в каталоге фирмы «Promega corporation 85'86», по причине отличия экспериментальных условий (для сравнения см. обзор [17]). Подобно *EcoRI* преинкубация *BamHI* с тримером (II) и последующая обработка ДНК приводит к полному расщеплению ДНК фага λ (дорожка 7). Однако обработка ДНК ферментом *BamHI* без преинкубации в присутствии тримера (II) дает в результате промежуточные сведения, где проявляется и сайт-специфическая и неспецифическая ДНКазная активность (дорожка 9). Этот результат позволяет предположить, что тример (II) взаимодействует с ферментом, в результате чего сайт-специфичность исчезает полностью, как это имеет место в случае преинкубации тримера (II) и *BamHI*, или она нарушается частично. В последнем случае при одновременном смешивании всех компонентов реакции ДНК фага λ , по-видимому, также взаимодействует с тримером (II), что приводит к ослаблению действия тримера (II) на фермент. Таким образом, следует предположить возможность взаимодействия тримера (II) как с *BamHI*, так и ДНК фага λ . Более сложная ситуация возникает в случае с тримером (I), а именно: в результате преинкубации фермента с тримером (I) наблюдается ингибирование последующей реакции с ДНК фага λ (дорожка 8). В отсутствие преинкубации сохраняется картина рестрикции, характерная

для *Bam*HI (дорожки 6 и 10). Последние результаты подтверждают сделанное выше предположение, что (2'—5')тримеры могут взаимодействовать как с ферментом, так и с ДНК фага λ. В целом обнаруженные эффекты логически приводят к необходимости изучения концентрационной зависимости влияния (2'—5')олигомеров на ферменты рестрикции.

На рис. 2 приведены результаты изучения влияния концентрации (2'—5')олигомеров на примере *Bam*HI. Суммируя эти результаты, сле-

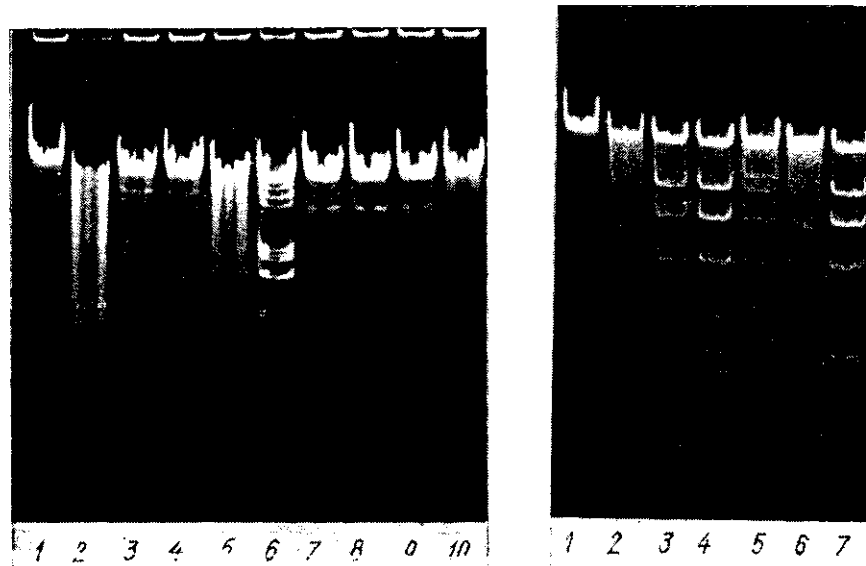


Рис. 2. Анализ расщепления ДНК фага λ ферментом рестрикции *Bam*HI в присутствии различных количеств тримеров: 1—ДНК фага λ, контроль; 2, 3—преинкубация фермента с 1 и 0,1 мкг тримера (II) соответственно и последующее расщепление ДНК фага λ; 4, 5—преинкубация фермента с 1 и 10 мкг тримера (I) соответственно и последующее расщепление ДНК фага λ; 6—контроль рестрикции ДНК фага λ ферментом; 7, 8—обработка ДНК фага λ ферментом в присутствии 0,1 и 0,5 мкг тримера (II) соответственно; 9, 10—то же в присутствии 1 и 5 мкг тримера (I) соответственно.

Fig. 2. Electrophoretic analysis of DNA λ treated with restriction endonuclease *Bam*HI in the presence of (2'—5')A₃ (I) and (2'—5')3' dA₃ (II) with different concentrations: 1—DNA λ, control; 2—DNA λ treated with *Bam*HI preincubated with (II) (1 μg); 3—as in 2, but with 0.1 μg of (II); 4—as in 2, but with 1 μg of (I); 5—as in 4, but with 10 μg of (I); 6—DNA λ treated with *Bam*HI, control; 7—as in 6, but with 0.1 μg of (II); 8—as in 7, but with 0.5 μg of (II); 9—as in 8, but with 1 μg of (I); 10—as in 8, but with 5 μg of (I).

Рис. 3. Анализ расщепления ДНК фага λ ферментом рестрикции *Hind*III в присутствии различных количеств тримеров: 1—ДНК фага λ, контроль; 2, 3—расщепление ДНК фага λ в присутствии 1 и 0,1 мкг тримера (II) соответственно; 4, 5, 6—расщепление ДНК фага λ в присутствии 1, 0,1 и 10 мкг тримера (I) соответственно; 7—контроль рестрикции ДНК фага λ ферментом.

Fig. 3. Electrophoretic analysis of DNA λ treated with restriction endonuclease *Hind*III in the presence of (2'—5')A₃ (I) and (2'—5')3' dA₃ (II) with different concentrations: 1—DNA λ, control; 2, 3—DNA λ incubated with *Hind*III in the presence of 1 and 0.1 μg of (II), respectively; 4, 5, 6—DNA λ incubated with *Hind*III in the presence of 1, 0.1 and 10 μg of (I), respectively; 7—DNA λ treated with *Hind*III, control.

дует отметить следующее. Во-первых, тример (II) является приблизительно на порядок более эффективным активатором неспецифической ДНКазной активности в сравнении с природным тримером (I). Во-вторых, оба тримера в низких концентрациях ингибируют фермент *Bam*HI. Более детальное исследование обнаруженных эффектов позволит найти концентрационные диапазоны (2'—5')олигоаденилатов, определяющие оба эффекта, а также механизм влияния на рестриктазы и ДНК. Отмеченные закономерности для *Bam*HI в целом сохраняются и для фермента *Hind*III (рис. 3). Однако в случае *Hind*III подобно *Eco*RI не наблюдалось ингибирования сайт-специфической рестриктазной актив-

пости. Проведение реакции ДНК фага λ с *HindIII* в присутствии 0,1 мкг тримера (II) не приводит к нарушению сайт-специфичности фермента (дорожка 3). При увеличении в 10 раз количества тримера (II) *HindIII* функционирует как неспецифическая ДНКаза (дорожка 2). Аналогичные закономерности наблюдаются и при использовании тримера (I), однако в этом случае необходимы более высокие его концентрации (приблизительно на порядок) (дорожки 4—6).

CHANGES IN FUNCTIONAL PROPERTIES
OF RESTRICTION ENZYMES UNDER THE INFLUENCE
OF (2'-5') OLIGOADENYLATES IN VITRO

Z. Yu. Tkachuk, L. V. Tkachuk, E. I. Kvasnyuk, G. V. Zaitseva,
E. A. Kalnichenko, I. A. Mikhailopulo, G. Kh. Matsuka

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev
Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Summary

It is found that scores trimers of (2'-5') oligoadenylic acid, viz., (A2'p)₂A and (3'dA2'p)₂3'dA, exert an influence on functional properties of restriction enzymes *EcoRI*, *BamHI*, and *HindIII*. The presence of (2'-5') trimers in the reaction mixture containing DNA and the restriction enzyme results in (i) an inhibition of the restriction reaction, (ii) site-specific restriction of DNA λ , or (iii) nonspecific hydrolysis of DNA λ . In the last case restriction enzymes function as nonspecific DNAses.

1. Torrence P. F. Molecular foundations of interferon action // Mol. Aspects Med.—1982.—5, N 3.—P. 129—171.
2. Sen G. C. Biochemical pathways in interferon action // Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.—1982.—27.—P. 105—156.
3. Lenggel P. Biochemistry of interferons and their action // Ann. Rev. Biochem.—1982.—51.—P. 251—282.
4. Radioimmune, radiobinding and HPLC analysis of 2—5A and related oligonucleotides from intact cells / M. Knight, P. J. Cayley, R. H. Silverman et al. // Nature.—1980.—288, N 5787.—P. 189—192.
5. Core (2'-5') oligoadenylate and the cordycepin analog: inhibitors of Epstein—Barr virus-induced transformation of human lymphocytes in the absence of interferon / P. W. Doetsch, R. J. Suhadolnik, Y. Sawada et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 11.—P. 6699—6703.
6. Analogs of (A2'p)_nA. Correlation of structure of analogs of ppp(A2'p)_nA and (A2'p)_nA with stability and biological activity / D. A. Eppstein, Y. V. Marsh, B. B. Schryver et al. // J. Biol. Chem.—1982.—257, N 22.—P. 13390—13397.
7. Dephosphorylated core of 2'-5' oligoadenylate exerts its antimitogenic effect through mechanisms different from 2'-5' A-dependent endonuclease / D. A. Eppstein, B. B. Schryver, Y. V. Marsh et al. // J. Interferon Res.—1983.—3, N 3.—P. 305—311.
8. 2'-5'-oligoadenylate trimer core and the cordycepin analog augment the tumoricidal activity of human natural killer cells / P. L. Black, E. E. Hebderson, W. Pfeleiderer et al. // J. Immunol.—1984.—135, N 5.—P. 2773—2777.
9. 2'-5'-adenylate and cordycepin trimer cores: metabolic stability and evidence for antimitogenesis without 5'-rephosphorylation / R. J. Suhadolnik, P. W. Doetsch, Y. Devash et al. // Nucleosides and Nucleotides.—1983.—2, N 4.—P. 351—366.
10. Eppstein D. A., Marsh Y. V., Schryver B. B. Mechanism of antiviral activity of (XyloA2'p)₂XyloA // Virology.—1983.—131, N 2.—P. 341—354.
11. Strategies in the design of oligonucleotides as potential antiviral agents / P. F. Torrence, J. Imai, K. Lesiak et al. // Targets for the design of antiviral agents / Eds E. DeClereq, R. T. Walker.—New York: Plenum press, 1984.—P. 259—285.
12. Johnston M. I., Torrence P. F. The role of interferon-induced proteins, double-stranded RNA and 2', 5'-oligoadenylate in the interferon-mediated inhibition of viral translation // Interferon: mechanisms of production and action / Ed. R. M. Friedman.—Amsterdam: Elsevier, 1984.—Vol. 3.—P. 189—298.
13. Kaiser A. D., Hogness D. S. The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage ϕ // J. Mol. Biol.—1968.—2, N 6.—P. 392—415.

(Окончание см. на с. 106).

Представленное описание инициаторных элементов репликации имеет и прикладную направленность, связанную с возможностью трансформации высших растений с помощью автономных генетических структур на основе репликативных векторов растений и образования в клетках растений минихромосом. На фоне успехов получения трансгенных растений на основе интегративных векторов рассмотрены подходы к решению проблемы репликативных векторов растений.

Рецензируемая книга Е. И. Черепенко и А. П. Галкина впервые в мировой литературе суммирует данные изучения инициаторных элементов репликации различных репликонов прокариот и эукариот, написана на высоком профессиональном уровне и несомненно представляет интерес для широкого круга специалистов по молекулярной биологии.

В. М. КРУТЯКОВ

ОТ РЕДАКЦИИ

В статье Л. П. Буцацкого, О. М. Филенко «Некоторые физико-химические свойства ДНК вируса денсонуклеоза комаров», опубликованной в журнале «Биополимеры и клетка» в 1988 г. (т. 4, № 5), на странице 256 допущена опечатка. Следует читать: «... молекулярная масса изолированной одноцепочечной ДНК ВДК составляет $1,5 \cdot 10^6$; и «Средний размер ДНК ВДК составил 1,5 мкм (рис. 4), что соответствует молекулярной массе ДНК $1,4 \cdot 10^6$ [17]».

(Окончание. Начало см. на с. 69—73.)

14. *Nucleotides XXIV*; preparative synthesis of trimeric (2'—5') oligoadenylic acid / Е. I. Kvasyuk, Т. I. Kulak, N. B. Khrpach et al. // *Synthesis*.—1987.—N 6.—P. 535—541.
15. Химический синтез некоторых (2'—5') олигонуклеотидов, аналогов (2'—5') олигоадениловой кислоты / Е. И. Квасюк, Т. И. Кулак, Е. Н. Калининченко и др. // *Биоорг. химия*.—1985.—11, № 9.—С. 1227—1238.
16. Sharp Ph. A., Sugden B., Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose—ethidium bromide electrophoresis // *Biochemistry*.—1973.—12, N 15.—P. 3055—3063.
17. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—476 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
Ин-т биоорг. химии АН БССР, Минск

Получено 20.01.88