

О.Ю. ЛИМАНСЬКА<sup>1, 2</sup><sup>1</sup> ДУ «Інститут мікробіології та імунології  
ім. І.І. Мечникова АМН України», Харків  
E-mail: olga.limanskaya@mail.ru<sup>2</sup> Національний науковий центр «Інститут експериментальної  
і клінічної ветеринарної медицини», Харків

## ПОЛІПУРИНОВІ/ПОЛІПІРИМІДИНОВІ ПОСЛІДОВНОСТІ З ПОТЕНЦІАЛОМ УТВОРЕННЯ ТРИПЛЕКСІВ У ПРОВІРУСНІЙ ДНК РЕТРОВІРУСІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ



*Визначено досконалі міжланцюгові триплекси, які потенційно можуть виникати у провірусній ДНК широко розповсюджених ретровірусів великої рогатої худоби (ВРХ) – вірусу лейкозу (ВЛ) та вірусу імунодефіциту (ВІ). У геномі ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ знайдено 5 та 10 фрагментів відповідно, які за кислотних значень рН можуть утворювати потрібні спіралі. Один з цих фрагментів (локалізований у гені gag ВЛ ВРХ) може існувати і як частина хрестоподібної структури. Експериментально існування триплексів підтверджено за допомогою атомно-силової мікроскопії шляхом візуалізації суперспіральної ДНК rGEMEX, у геномі якої знайдено шість дзеркально-симетричних фрагментів, необхідних для утворення внутрішньомолекулярних триплексів. Створено карти локалізації триплексів (які є одним з ланцюгів сигнальних механізмів функціонування геному) на геномі ретровірусів ВРХ.*

© О.Ю. ЛИМАНСЬКА, 2010

**Вступ.** Геномна РНК та провірусна ДНК (інтегрована в геном клітини-хазяїна еукаріотів, прокариотів і вірусів) є структурно гнучкими молекулами. В залежності від послідовності нуклеотидів (наприклад, за наявності інвертованих повторів) в одноланцюговій РНК можуть виникати дволанцюгові фрагменти (шпильки). У дволанцюговій ДНК також в залежності від послідовності (наприклад, за наявності поліпуринових або поліпіримідинових дзеркальних повторів уздовж одного ланцюга ДНК) при певних умовах можливе утворення триплексів, які складаються з одноланцюгового та триланцюгового фрагментів [1].

Неканонічні структури, які утворюються в РНК та ДНК, є гарячими точками геномної нестабільності еукаріотів, прокариотів, вірусів. Ця їхня особливість обумовлена можливістю утворення триплексів (або Н-ДНК), шпилькових (в одноланцюговому стані) та хрестоподібних (у дволанцюговому стані) структур при різних генетичних процесах. Повтори (прямі, інвертовані та дзеркальні в одному ланцюгу ДНК) широко представлені в геномі із залученням до мутагенезу та значних геномних перебудов. Раніше було показано, що інвертовані повтори блокують реплікацію ДНК *in vitro* [2–6], а також можуть бути сайтами зупинки РНК-полімерази при елонгації транскрипції [7].

Внутрішньомолекулярні міжланцюгові триплекси утворюються в гомопуринових (гомопіримідинових) послідовностях з формуванням триплетів у формі пур – пур : пір (наприклад, ААТ) або пір – пур : пір (наприклад, ТАТ та СС<sup>+</sup>), де пір та пур – піримідинові та пуринові нуклеотиди, С<sup>+</sup> – протонований цитидинфосфат. Послідовність повинна містити дзеркальний повтор – вона має бути такою ж у напрямку 3' → 5', як і у напрямку 5' → 3' вздовж одного ланцюга ДНК. Цим неканонічний паліндром відрізняється від звичайного паліндрому (інвертованого повтору), який утворює хрестоподібну структуру при однаковій послідовності фрагмента у різних ланцюгах ДНК. В залежності від орієнтації третього ланцюга по відношенню до центрального уотсон-кріківського ланцюга триплекси класифікують на дві категорії – паралельні та антипаралельні. При утворенні паралельних триплексів необхідне протонування N3 цитозину для коректного хугстинівського зв'язування з N7 гуаніну.

З цієї причини паралельні триплекси є найбільшійшими за кислих значень рН. На відміну від них антипаралельні триплекси не потребують протонування і характеризуються сильним зв'язуванням, що не залежить від рН.

У паралельному триплексі піримідиновий мотив потрійної спіралі зв'язується паралельно гомопуриновому ланцюгу дволанцюгової ДНК за допомогою хугстинівського водневого зв'язування з утворенням триплексів, подібних до  $T - A : T$  або  $C^+ - G : C$ , які містять канонічні пари  $A : T$  та  $G : C$  відповідно. За фізіологічних значень рН зв'язування третього ланцюга з дуплексом зменшується, оскільки для утворення водневого зв'язку цитозин повинен бути протонуваним. У антипаралельному триплексі гомопуриновий мотив потрійної спіралі зв'язується антипаралельно гомопуриновому ланцюгу дуплекса ДНК за допомогою зворотного хугстинівського зв'язування з утворенням триплексів типу  $A - A : T$  та  $G - G : C$  [8, 9].

Раніше встановлено, що довгі гомопуринові тракти з потенціалом утворення триплексів локалізовані не випадковим чином в геномі еукаріотів: типово вони розташовані поряд з промоторами генів, «гарячими» точками рекомбінації [10]. Існують експериментальні докази того, що внутрішньомолекулярні триплекси залучені до таких клітинних процесів, як реплікація, рекомбінація, транскрипція [11–14]. При вивченні різних властивостей триплексів як модельні системи зазвичай використовуються або синтетичні олігонуклеотиди, або довгі поліпуринові тракти, що екстраговані з мікроорганізмів та клоновані у плазмиди [15]. У той же час реальний розподіл фрагментів геному, які потенційно можуть утворювати триплекси, для вірусів і бактерій залишається нез'ясованим. У зв'язку з цим нами проведено пошук структур, що потенційно можуть утворювати міжланцюгові триплекси, у геномі ретровірусів – вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) та вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби (ВІ ВРХ). Ретровіруси знайдені в різних видах тварин у широкому таксономічному діапазоні.

Усі ретровіруси мають спільну особливість – необхідність синтезу копії ДНК з матриці геномної РНК за допомогою зворотної транс-

криптази [16]. Лентівіруси належать до унікального роду ретровірусів з подібними структурними, генетичними, біологічними та патологічними властивостями. До лентівірусів відносяться віруси імунодефіциту людини, великої рогатої худоби, мавпи, кішки, а також вірус вісна-маєді овець, вірус артриту-енцефаліту кіз, вірус інфекційної анемії коня, вірус хвороби Йембрана великої рогатої худоби. Лентівіруси, які є неонкогенними вірусами, викликають повільні, хронічні та дегенеративні патологічні зміни в інфікованій клітині-хазяїні, часто асоційовані з розвитком уражень імунної системи [17]. Усі лентівіруси інфікують моноцити та макрофаги. Лентівіруси на відміну від інших ретровірусів можуть реплікуватися у клітинах, що не діляться [18].

ВІ ВРХ, структурно схожий на ВІЛ, є лентівірусом, який викликає тривале інфекційне захворювання великої рогатої худоби, подібне до СНІДу, після варіабельної асимптоматичної фази [19]. ВЛ ВРХ, інший широко розповсюджений в світі ретровірус, асоційований з летальною формою лейкемії та персистуючим лімфоцитозом [20].

У даній роботі за допомогою комп'ютерного аналізу знайдено розподіл потенційних досконалих триплексів у провірусній ДНК ВЛ ВРХ і ВІ ВРХ та представлено фізичні карти вірусів з локалізованими триплексами. На основі аналізу створених карт локалізації потенційних триплексів показано, що розподіли триплексів у геномах ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ відрізняються якісно та кількісно. Візуалізацією суперспіральної ДНК рGEMEX, яка містить гомопуринові/гомопримідинові послідовності, за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ) підтверджено можливість утворення триплексів *in vitro*.

**Матеріали та методи. Комп'ютерний аналіз.** У роботі використані послідовності повністю секвенованих ізолятів вірусу лейкозу великої рогатої худоби (номер AF 033818 для бази даних GenBank, довжина 8419 пар нуклеотидів, п.н.), вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби (номер M32690, довжина 8482 п.н.), а також плазмиди рGEMEX (довжина 3993 п.н., «Promega», США). Для пошуку триплексів та визначення їх параметрів використовували програму Site пакета GeneBee [21]. Пошук

Таблиця 1

Триплекси, що можуть бути потенційно утворені в провірусній ДНК вірусу лейкозу великої рогатої худоби (номер AF033818 для бази даних GenBank)

№	Довжина		Послідовність, положення на геномі	Ген
	фрагмента	петлі		
1	11	3	<u>CTTTCTGTTTC</u> 273–283	<i>LTR</i>
2	18	6	<u>TCTCCCTCGGCGCCCTCT</u> 302–319	<i>LTR</i>
3	18	8	<u>CCCCCTCCTATAACCCCC</u> 452–469	<i>gag</i>
4	20	6	<u>CCCCCCTTATGACCCCCC</u> 740–759	<i>gag</i>
5	18	6	<u>CCCGTACCCCTCCTATGCC</u> 3621–3638	<i>pol</i>

Примітка. Тут і в табл. 2 підкреслено дзеркально-симетричні повтори. Потенційний триплекс, виділений курсивом (позиція № 4), може перебувати у конформації хрестоподібної структури (як її частина).

Таблиця 2

Триплекси, що можуть бути потенційно утворені в провірусній ДНК вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби (номер M32690 для бази даних GenBank)

№	Довжина		Послідовність, положення на геномі	Ген
	фрагмента	петлі		
1	13	5	<u>GAAATTGTGAAAG</u> 2169–2181	<i>pol</i>
2	13	3	<u>AAGGGAACGGGAA</u> 2259–2271	<i>pol</i>
3	12	4	<u>AAGGTCCAGGAA</u> 2713–2724	<i>pol</i>
4	13	5	<u>AGGAGTAAAAGGA</u> 3096–3108	<i>pol</i>
5	14	4	<u>AGGGAAGAAAGGGA</u> 3363–3376	<i>pol</i>
6	14	4	<u>GGGGGAATAGGGGG</u> 4489–4502	<i>pol</i>
7	15	3	<u>GAAAGGAATGGAAAG</u> 4616–4630	<i>pol</i>
8	11	3	<u>GGGGAAGGGG</u> 5464–5474	<i>vif</i>
9	12	4	<u>GAGGATCCGGAG</u> 5477–5488	<i>vif</i>

міжланцюгових триплексів проводили за формулами  $R_n \cdot N_k \cdot R_n$  та  $Y_n \cdot N_k \cdot R_n$ , де  $R$  – пурини аденін (A) або гуанін (G),  $Y$  – піримідини цитозин (C) або тимін (T). Значення  $n$  змінювалося від 4 до 10, а значення  $k$  – від 4 до 7.

**Атомно-силова мікроскопія.** В роботі використовували атомно-силовий мікроскоп Nanoscope IV MultiMode System («Veeco Instruments Inc.», США) з E-сканером. АСМ-зображення ДНК були записані за допомогою вібруючого варіанта АСМ у повітрі в режимі «висота» з використанням OMCL-AC160TS кантилеверів («Olympus Optical Co.», Японія) з резонансною частотою 340–360 кГц та константою жорсткості 42 Н/м. Зображення отримані у форматі 512 × 512 пікселей, згладжені та проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Nanoscope (версія 5.12r3) («Veeco Instruments Inc.», США). Підготовку зразка здійснювали відповідно до раніше наведеної методики [22]. Коротко, процедура виглядала наступним чином. Для нанесення розчину ДНК на аміно-слюду використовували ТЕ буфер (10 мМ трис-НСІ рН 7,6, 1 мМ ЕДТА). На смугу слюди розміром 1 см<sup>2</sup> наносили краплю розчину об'ємом 10 мкл ДНК у ТЕ буфері, промивали після 2-хвилинної експозиції ультрачистою водою, вільною від РНКаз, обдували потоком аргону та після підсушування зразка проводили візуалізацію. Зазначимо, що свіжосколота слюди має сумарний незначний негативний поверхневий заряд. При модифікації свіжосколотої слюди у парах похідного аміносилану властивості аміногруп аміносилану, що знаходяться поблизу поверхні слюди, значно змінюються під впливом поверхні слюди. Якщо у водному розчині константа іонізації рК аміносилану 3-амінопропілтриетоксисилану (АПТЕС) становить ~ 10 [23], то константа іонізації АПТЕС на поверхні слюди зменшується приблизно на три одиниці рН, і рК становить ~ 7 [24, 25].

**Результати досліджень.** Раніше було встановлено, що *in vitro* можливість утворення Н-ДНК у гомопуринових/гомопіримідинових фрагментах довжиною менше 15 п.н. є проблематичною [26]. У роботі [27] продемонстровано, що триплекси утворюються для послідовності  $G_{16} \cdot C_{16}$ , у той час як вони не форму-

ються у послідовності  $G_{14} \cdot C_{14}$ . Беручи до уваги ці дані, для подальшого аналізу ми вибрали фрагменти геному ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ з потенціалом утворення триплексів з такими параметрами: довжина повтору  $\geq 11$  нуклеотидів, довжина стебла  $\geq 4$  п.н., петля – до 8 нуклеотидів.

На основі визначених потенційних триплексів в геномі провірусної ДНК ВЛ ВРХ (табл. 1) була побудована діаграма їхнього розподілу на фізичній карті геному ВЛ ВРХ (рис. 1). Провірусна ДНК ВЛ ВРХ має довжину приблизно 8420 п.н. і за своїм складом подібна до геному інших ретровірусів з типовою локалізацією генів *gag*, *pol* та *env*. Послідовність та вторинна структура одного із знайдених у геномі ВЛ ВРХ потенційних триплексів наведені на рис. 2. Запропонована модель триплекса відповідає структурі, що утворена досконалими дзеркальними повторами. В той же час у роботі [28] показано, що наявність дзеркальної симетрії не є обов'язковою для формування тріад нуклеотидів триплекса, а деякі нуклеотиди, що не збігаються, можуть мати місце при взаємодії між дуплексом та третім ланцюгом пурин/піримідинової послідовності.

Аналогічним чином були отримані діаграми розподілу (рис. 3) та параметри триплексів (табл. 2) для вірусу імунодефіциту ВРХ. ВІ ВРХ має найскладнішу геномну організацію серед лентівірусів (за винятком лентівірусів приматів). Довжина провірусної ДНК ВІ ВРХ становить понад 8480 п.н., а гени *prt*, *gag* та *tax* є унікальними генами для бичачих лентівірусів. Проведене порівняння діаграм розподілу триплексів для двох ізолятів ВІ ВРХ (поряд з ізолятом М32690 на наявність триплексів був проаналізований ізолят ВІ ВРХ номер L04974, дані не наведено) показало, що сім з дев'яти потенційних триплексів (позиції 3–9 табл. 2) є консервативними структурними мотивами з ідентичними сайтами локалізації в геномі обох ізолятів ВІ ВРХ. В той же час позиції та послідовності двох інших триплексів незначно відрізняються (обидва ці триплекси локалізовано в гені *pol* – позиції 1 та 2 табл. 2). Послідовність та вторинна структура двох знайдених у геномі ВІ ВРХ триплексів наведені на рис. 4. З'єднання стебла одного

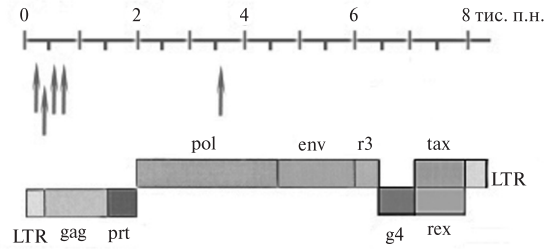


Рис. 1. Фізична карта геному вірусу лейкозу великої рогатої худоби з наведеними позиціями відомих генів. Стрілками показано позиції визначених дзеркально-симетричних поліпіримідинових послідовностей

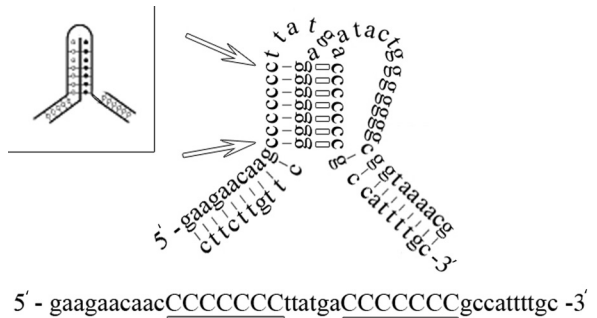
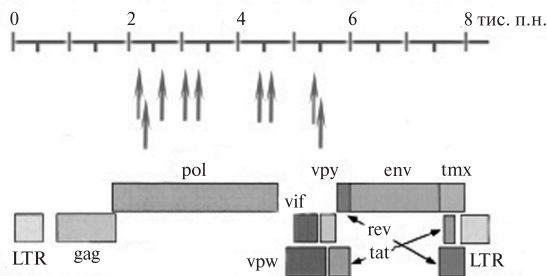


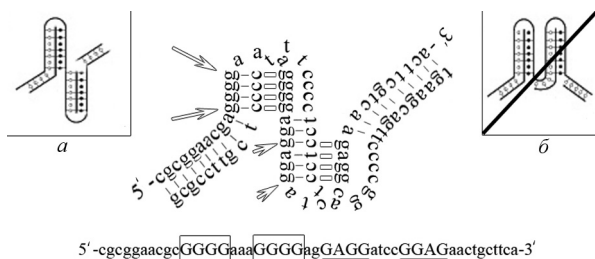
Рис. 2. Структура міжланцюгового триплекса (або Н-ДНК) для фрагмента провірусної ДНК вірусу лейкозу ВРХ. Стрілки вказують на потрібну спіраль. Підкреслені фрагменти послідовності « $\leftarrow$ »-нитки провірусної ДНК ВЛ ВРХ вказують на два симетричних повтори, які приймають участь в утворенні триплекса. Маленькими прямокутниками показано взаємодію третього ланцюга триплекса з фрагментом дволанцюгової ДНК за рахунок хугстинівського зв'язування. На вставці наведено модель даного триплекса

триплекса з іншим сусіднім триплексом може бути гнучким в залежності від довжини лінкерного дуплекса між двома триплексами. Для подвійного триплекса, знайденого у геномі ВІ ВРХ, довжина лінкера становить 2 п.н. Тому в даному випадку можливе формування тільки структури, модель якої показана на вставці а рис. 4. В той же час стеричні обмеження (рис. 4, вставка б) унеможливають утворення П-образної структури для даної триплексної структури, модель якої запропоновано в роботі [15].

Формування триплексів при іммобілізації ДНК на поверхні амінослюди із розчину за нейтральних значень рН було експериментально підтверджено за допомогою методу атом-



**Рис. 3.** Фізична карта геному вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби з наведеними позиціями відомих генів. Гени *rev* і *tat* складаються з двох кодувальних областей. Перший кодувальний екзон гена *rev* та кодувальна область *tmx* мають таку ж рамку зчитування, як і ген *env*. Кодувальні області геному вірусу показано трьома горизонтальними полосами, що відповідають різним рамкам зчитування. Стрілками показано позиції визначених дзеркально-симетричних поліпуринових послідовностей



**Рис. 4.** Структура двох триплексів (або Н-ДНК) для фрагмента провірусної ДНК вірусу імунодефіциту ВРХ, які відповідають положенню 5464–5488 гена *vif* провірусної ДНК ВІ ВРХ. Стрілки вказують на потрібні спіралі. У прямокутниках та підкреслено дзеркально-симетричні повтори «+»-нитки провірусної ДНК ВІ ВРХ, які утворюють два триплекси. Маленькими прямокутниками показано взаємодію третього ланцюга триплекса з фрагментом дволанцюгової ДНК за рахунок хугстинівського зв'язування: вставка *a* – модель запропонованого подвійного триплекса; вставка *б* – модель триплекса, яка є неможливою через стеричні обмеження, що виникають при формуванні даної вторинної структури, утвореної двома триплексами

но-силової мікроскопії. Нами візуалізовано декілька незвичних поодиноких молекул суперспіральної ДНК рGEMEX, фрагменти яких утворюють своєрідну сітку (рис. 5). Проведений комп'ютерний аналіз показав, що послідовність ДНК рGEMEX містить шість фрагментів з потенціалом утворення триплексів. Три фрагменти мають довжину стебла 5 п.н.,

два фрагменти – 6 п.н., а один фрагмент – 7 п.н. Розмір петлі для усіх зазначених фрагментів становить 5 нуклеотидів.

Атомно-силовою мікроскопією дозволяє не тільки візуалізувати молекули, але і вимірювати їх геометричні параметри. Один з таких структурних параметрів (висота молекули) було виміряно за допомогою побудови поперечного перерізу молекули ДНК рGEMEX (рис. 5, б). Висота короткого міжланцюгового триплекса, визначена з профілю перерізу, становить 0,75 нм.

**Обговорення одержаних даних.** Життєвий цикл реплікації ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ є подібним до такого для інших ретровірусів. Після виходу геномної РНК до цитоплазми інфікованої клітини вірусна зворотна транскриптаза, яку кодує ген *pol*, транскрибує РНК у дволанцюгову молекулу ДНК (також відому як провірусна ДНК). Після цього провірусна ДНК інтегрується у геном клітини-хазяїна за допомогою вірусної інтегрази. Провірусна ДНК може залишатися у латентному стані або за наявності певних сигналів бути як ДНК-матриця для синтезу нових молекул вірусних РНК.

Ретровіруси використовують розмаїття цисрегуляторних сигналів та регуляторних і допоміжних білків для модуляції різних аспектів їхньої реплікації та інфекційної дії. Експресія генів ретровірусів істотно залежить від численних факторів, в тому числі від взаємодії транскрипційних факторів клітини-хазяїна з цисрегуляторними елементами, локалізованими у довгих кінцевих повторах (LTR), конформації регуляторних фрагментів геному.

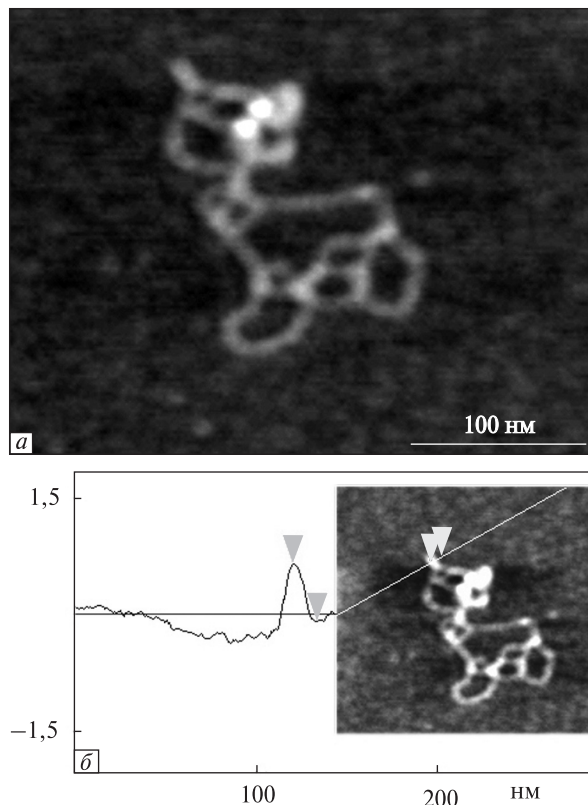
В роботі [28] показано, що інвертований повтор, клонований у плазміді, з довжиною стебла 7 п.н. за нейтральних значень рН може утворювати хрестоподібну структуру з сусіднім фрагментом, проте за кислих іонних умов хрестоподібна структура руйнується, і зазначений фрагмент утворює триплекс. З усіх проаналізованих потенційних триплексів в провірусній ДНК ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ тільки один фрагмент (позиція № 4, табл. 1) може приймати участь в утворенні хрестоподібної структури (аналіз геномної РНК ВІ ВРХ та ВЛ ВРХ на наявність шпилькових структур, які можуть утворювати хрестоподібні структури в провірусній ДНК, не показано). Дані щодо можливості тригерного переключення фрагмента

провірусної ДНК ВЛ ВРХ з конформації канонічної подвійної спіралі до конформації триплекса або конформації хрестоподібної структури вказують на особливу роль зазначеного фрагмента в геномній структурі ВЛ ВРХ. Крім того, привертає увагу відсутність досконалих потенційних триплексів в гені *env* обох ретровірусів ВРХ. З одного боку, це підтверджує, що ген *env* є найваріабельнішим з відомих генів ВЛ ВРХ та ВІ ВРХ [29, 30], а з іншого, надає додаткову інформацію для конструювання праймерів при створенні молекулярно-генетичних тест-систем для детекції і типування ретровірусів ВРХ.

Відомо, що за фізіологічних умов паралельні триплекси є стабільнішими порівняно з антипаралельними [31]. Утворення паралельних триплексів (на відміну від антипаралельних потрійних спіралей [9]) є залежним від рН: гомопуринові/гомопіримідинові послідовності дуплекса ДНК утворюють потрійні спіралі за кислих значень рН (приблизно рН 4) [32]. За таких умов перехід до Н-ДНК спостерігали для релаксованої, ненадсуперспіралізованої ДНК [32]. Для молекул ДНК зазначені умови можна змоделювати при їх іммобілізації на поверхню слюди, яку використовують як субстрат при дослідженнях за допомогою атомно-силової мікроскопії.

Разом з тим під впливом поверхневих властивостей слюди може зменшуватися не тільки рК АПТЕС, а також рК нуклеотидів при іммобілізації ДНК на поверхні слюди. Це означає, що деякі нуклеотиди за умов іммобілізації ДНК на модифікованій амінослюді можуть бути протонуваними. Однією з причин формування візуалізованої структури (рис. 5) може бути саме формування внутрішньомолекулярних міжланцюгових триплексів. Потрійна спіраль ДНК утворюється для фрагментів пурин/піримідинових послідовностей ДНК за рН  $\sim 4$  у водному розчині, тобто за умови зниження рН на три одиниці від нейтрального значення відбувається структурний перехід від В-ДНК до Н-ДНК [33], а саме на три одиниці рН зсуваються у бік кислих рН значення констант іонізації молекул, іммобілізованих на слюді.

Зазначимо, що діаметр спіралі дволанцюгової ДНК за даними рентгеноструктурного ана-



**Рис. 5.** Зображення поодинокій молекули суперспіралі-ної ДНК рGEMEX, яке отримане за допомогою атомно-силового мікроскопа (а) (сегменти молекули утворюють своєрідну сітку, розмір кадру – 345 нм  $\times$  345 нм), та поперечний профіль перерізу фрагмента ДНК рGEMEX, що утворив триплекс (б) (переріз виконано вздовж лінії, перпендикулярно до площини рисунка; визначене значення висоти триплекса, на яке вказують два трикутники, становить 0,73 нм)

лізу становить приблизно 2 нм для В-форми [34]. В той же час під впливом поверхневих властивостей амінослюди висота молекули ДНК, іммобілізованої на амінослюді, зменшується і становить 0,4–0,5 нм. Різниця у значеннях висоти молекули для В-ДНК та триплекса свідчить про те, що структури, які візуалізовані за допомогою АСМ, є внутрішньомолекулярними триплексами. Ефективне утворення таких структур виникає через протонування нуклеотидів на поверхні амінослюди з високою поверхневою щільністю позитивного заряду, яке є необхідним для формування триплексів. Отримане нами збільшення висоти триплекса у 1,5 разу порівняно з В-ДНК збіга-

ється з результатами роботи [15] по визначенню структурних параметрів триплексів при іммобілізації на амінослюді.

Аналогічну сітку молекул плазмідних ДНК, іммобілізованих на свіжосколотій слюді, було візуалізовано у роботі [35] тільки для певного значення концентрації іонів  $Mg^{2+}$ . Таким чином, отримані результати свідчать про те, що, по-перше, утворення триплексів є можливим за наявності дзеркальних поліпурин/поліпіримідинових повторів в послідовності ДНК; по-друге, суперспіральні ДНК утворюють потрійні спіралі тільки у вузькому інтервалі як поверхневої щільності заряду слюди, так і концентрації ДНК.

Встановлення розподілу потенційних триплексів в геномі ретровірусів тварин є одним з етапів на шляху розуміння основних компонентів сигнального механізму функціонування геному віріонів. Внутрішньомолекулярні триплекси в геномі ретровірусів ВРХ можуть вказувати на сайти зупинки полімераз при реплікації та транскрипції.

Крім того, визначені триплекси можуть знайти застосування в генній терапії ретровірусів ВРХ, а саме для модулювання біологічних функцій, асоційованих з ДНК. Знання специфічних мішеней в ДНК з потенціалом утворення триплексів надає можливість створювати комплементарні до триплексів молекули для наступного маніпулювання генами (тобто їх селективного виключення). Такий підхід базується на інгібуванні транскрипції відповідних генів за рахунок комплексоутворення з триплексними мотивами на ДНК-мішені. Подальші фундаментальні дослідження на рівні поодиноких молекул та клітин дозволяють відповісти на численні питання — яка роль зазначених міжланцюгових триплексів? Як вони функціонують і взаємодіють з іншими ключовими молекулами?

*Автор висловлює подяку О.П. Лиманському (ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України») за дискусію та допомогу при підготовці статті. Автор щиро вдячний рецензенту за конструктивні зауваження, направлені на покращення статті.*

*Робота частково підтримана грантом АМН 72/2007 від Академії медичних наук України.*

*O. Yu. Limanskaya*

POLYPURINE/POLYPIRIMIDINE SEQUENCES WITH POTENTIAL OF FORMING TRIPLEXES IN THE PROVIRAL DNA OF BOVINE RETROVIRUSES

Perfect interstranded triplexes that can potentially arise in the proviral DNA of wide-spread bovine retroviruses like as bovine leukemia virus (BLV) and bovine immunodeficiency virus (BIV) have been determined. In the BLV and BIV genomes 2 and 5 fragments respectively were found to form triple helices under acidic conditions. One of those fragments that is localized on the BLV *gag* gene can exist as cruciform structure too. Experimentally the existence of triplexes is confirmed by atomic force microscopic visualization of supercoiled pGEMEX DNA for which genome 6 fragments are found with mirror symmetry that is necessary for intramolecular triplex formation. The diagrams of triplexes (one of the elements of signaling genome function) localization on the genome of bovine retroviruses are obtained.

*О.Ю. Лиманская*

ПОЛИПУРИНОВЫЕ/ПОЛИПИРИМИДИНОВЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ С ПОТЕНЦИАЛОМ ОБРАЗОВАНИЯ ТРИПЛЕКСОВ В ПРОВИРУСНОЙ ДНК РЕТРОВИРУСОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Определены совершенные межцепочечные триплексы, которые потенциально могут возникать в провирусной ДНК широко распространенных ретровирусом крупного рогатого скота (КРС) — вируса лейкоза (ВЛ) и вируса иммунодефицита (ВИ). В геноме ВЛ КРС и ВИ КРС найдено 5 и 10 фрагментов соответственно, которые при кислых значениях pH могут образовывать тройные спирали. Один из этих фрагментов (локализованный в гене *gag* ВЛ КРС), может существовать и как часть крестообразной структуры. Экспериментально существование триплексов подтверждено с помощью атомно-силовой микроскопии посредством визуализации суперспиральной ДНК pGEMEX, в геноме которой найдено шесть зеркально-симметричных фрагментов, необходимых для образования внутримолекулярных триплексом. Созданы карты локализации триплексов (которые являются одной из цепей сигнальных механизмов функционирования генома) на геноме ретровирусом КРС.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Soyfer V.N., Potaman V.N. Triple-helical nucleic acids. — New York : Springer-Verlag, 1996. — 360 p.
2. Kang S., Ohshima K., Shimizu M., Amirhaeri S., Wells R.D. Pausing of DNA synthesis *in vitro* at specific loci in CTG and CGG triplet repeats from human heredi-

- tary disease genes // *J. Biol. Chem.* — 1995. — **270**, № 45. — P. 27014–27021.
3. *Sherman L.A., Gefter M.L.* Studies of the mechanism of enzymatic DNA elongation by *Escherichia coli* DNA polymerase II // *J. Mol. Biol.* — 1976. — **103**, № 3. — P. 61–76.
  4. *Chalberg M.D., Englund P.T.* The effect of template secondary structure on vaccinia DNA polymerase // *J. Biol. Chem.* — 1979. — **254**, № 16. — P. 7820–7826.
  5. *Kaguni L.S., Clayton D.A.* Template-directed pausing in *in vitro* DNA synthesis by DNA polymerase  $\alpha$  from *Drosophila melanogaster* embryos // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1982. — **79**, № 4. — P. 983–987.
  6. *Weaver D.T., De Pamphilis M.L.* Specific sequences in native DNA that arrest synthesis by DNA polymerase  $\alpha$  // *J. Biol. Chem.* — 1982. — **257**, № 4. — P. 2075–2086.
  7. *Komissarova N., Kashlev M.* Transcriptional arrest: *Escherichia coli* RNA polymerase translocates backward, leaving the 3' end of the RNA intact and extruded // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1997. — **94**, № 5. — P. 1755–1760.
  8. *Nagatsugi F., Sasaki S.* Chemical tools for targeted mutagenesis of DNA based on triple helix formation // *Biol. Pharm. Bull.* — 2004. — **27**, № 4. — P. 463–467.
  9. *Murphy D., Eritja R., Redmond G.* Monitoring denaturation behaviour and comparative stability of DNA triple helices using oligonucleotide – gold nanoparticle conjugates // *Nucl. Acids Res.* — 2004. — **32**, № 7. — e65. DOI: 10.1093/nar/gnh065.
  10. *Zain R., Sun J.S.* Do natural DNA triple-helical structures occur and function *in vivo*? // *Cell Mol. Life Sci.* — 2003. — **60**, № 5. — P. 862–870.
  11. *Bianchi A., Wells R.D., Heintz N.H., Caddle M.S.* Sequences near the origin of replication of the DHFR locus of Chinese hamster ovary cells adopt left-handed Z-DNA and triplex structures // *J. Biol. Chem.* — 1990. — **265**, № 35. — P. 21789–21796.
  12. *Kohwi Y., Kohwi-Shigematsu T.* Altered gene expression correlates with DNA structure // *Genes Dev.* — 1991. — **5**, № 12B. — P. 2547–2554.
  13. *Rooney S.M., Moore P.D.* Antiparallel, intramolecular triplex DNA stimulates homologous recombination in human cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1995. — **92**, № 6. — P. 2141–2144.
  14. *Kohwi Y., Panchenko Y.* Transcription-dependent recombination induced by triple-helix formation // *Genes Dev.* — 1993. — **7**, № 9. — P. 1766–1778.
  15. *Kato M., McAllister C.J., Hokabe S., Shimizu N., Lyubchenko Y.L.* Structural heterogeneity of pyrimidine/purine-biased DNA sequence analyzed by atomic force microscopy // *Eur. J. Biochem.* — 2002. — **269**, № 15. — P. 3632–3636.
  16. *Goff S.P.* Retroviridae: The retroviruses and their replication // *Fields Virology* / Eds D.M. Knipe, P.M. Howley. — Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2001. — P. 843–911.
  17. *Desrosiers R.C.* Nonhuman lentiviruses // *Ibid.* — P. 2095–2121.
  18. *Chen H., Wilcox G., Kertayadnya G., Wood C.* Characterization of the Jembrana disease virus tat gene and the cis- and trans-regulatory elements in its long terminal repeats // *J. Virology.* — 1999. — **73**, № 1. — P. 658–666.
  19. *Gonda M., Luther D., Fong S., Tobin J.* Bovine immunodeficiency virus: molecular biology and virus-host interactions // *Virus Res.* — 1994. — **32**, № 2. — P. 155–181.
  20. *Gillet N., Florins A., Boxus M., Burteau C., Nigro A., Vandermeers F., Balon H., Bouzar A., Defoiche J., Burny A., Reichert M., Ketmann R., Willems L.* Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human // *Retrovirology.* — 2007. — **4**, № 18. — P. 1–32.
  21. *Бродский Л.И., Драчев А.Л., Татузов Р.Л., Чумаков А.П.* Пакет прикладных программ для анализа последовательностей биополимеров: GeneBee // *Биополимеры и клетка.* — 1991. — **7**, № 1. — С. 10–14.
  22. *Лиманская Л.А., Лиманский А.П.* Компактизация единичных молекул суперспиральной ДНК, адсорбированных на аминокислоте // *Биоорганич. химия.* — 2006. — **32**, № 5. — С. 494–510.
  23. *Лиманский А.П.* Исследование аминомодифицированной слюды как субстрата для атомно-силовой микроскопии нуклеиновых кислот // *Биополимеры і клітина.* — 2001. — **17**, № 4. — С. 292–297.
  24. *Zhang H., He H., Wang J., Mu T., Liu Z.* Force titration of amino group-terminated self-assembled monolayers using chemical force microscopy // *Appl. Phys.* — 1998. — **A66**. — P. S269–S271.
  25. *Vezenov D., Noy A., Rozsnyai L., Lieber C.* Force titrations and ionization state sensitive imaging of functional groups in aqueous solutions by chemical force microscopy // *J. Amer. Chem. Soc.* — 1997. — **119**. — P. 2006–2015.
  26. *Lyamichev V.I., Mirkin S.M., Kumarev V.P., Baranova L.V., Vologodskii A.V., Frank-Kamenetskii M.D.* Energetics of the B-H transition in supercoiled DNA carrying  $d(CT)_x \cdot d(AG)_x$  and  $d(C)_n \cdot d(G)_n$  inserts // *Nucl. Acids Res.* — 1989. — **17**, № 22. — P. 9417–9423.
  27. *Kohwi Y.* Cationic metal-specific structures adopted by the poly (dG) region and the direct repeats in the chicken adult beta A globin gene promoter // *Nucl. Acids Res.* — 1989. — **17**, № 12. — P. 4493–4502.



28. *Klysik J.* An intramolecular triplex structure from non-mirror repeated sequence containing both Py: Pu·Py and Pu: Pu·Py triads // *J. Mol. Biol.* – 1995. – **245**, № 5. – P. 499–507.
29. *Лиманская О., Rola М., Віска L., Kuzmak J., Лиманский А.* Детекция провирусной ДНК вируса иммунодефицита крупного рогатого скота посредством полимеразной цепной реакции // *Вопр. вирусологии.* – 2005. – № 2. – С. 38–43.
30. *Limansky A.P., Limanskaya O.Yu.* Comparison of primer sets for detection of bovine leukemia virus by polymerase chain reaction // *Bull. Veterinary Inst. Pulawy (Poland).* – 2002. – **46**, № 1. – P. 27–36.
31. *Goni J., Crus X., Orozco M.* Triplex-forming oligonucleotide target sequences in the human genome // *Nucl. Acids Res.* – 2004. – **32**, № 1. – P. 354–360.
32. *Франк-Каменецкий М.Д.* Век ДНК. – М., 2004. – 240 с.
33. *Lyamichev V., Mirkin S., Frank-Kamenetskii M.* Structure of  $(dG)_n \cdot (dC)_n$  under superhelical stress and acid pH // *J. Biomol. Struct. & Dyn.* – 1987. – **5**, № 2. – P. 275–282.
34. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот : Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 584 с.
35. *Wu A., Li Z., Yu L., Wang H., Wang E.* Plasmid DNA network on a mica substrate investigated by atomic force microscopy // *Analyt. Sci.* – 2001. – **17**, № 5. – P. 583–584.

Поступила 26.11.08