

ской и специфической иммунной защиты, что сопровождается развитием инфекционных осложнений, в особенности при поражении лимбической системы головного мозга [9]. Таким образом, с одной стороны, сам факт персистенции ВПГ в ЦНС приводит к развитию иммунодефицита, при этом развитие инсульта на фоне персистенции ВПГ усугубляет иммунодефицит и приводит к переходу ВПГ из персистирующей формы в активную.

Итак, результаты проведенных исследований проливают свет на весьма сложный вопрос клинической неврологии: возможность активации латентной герпетической инфекции в ЦНС при остром инсульте и повышения эффективности лечения острого инсульта с данным видом осложнения.

Таким образом, через 1 сут после воспроизведения острого геморрагического инсульта у 30% животных, предварительно зараженных ВПГ, происходит активация персистирующей герпетической инфекции ЦНС, которая проявляется развитием энцефалита и проникновением вируса в периферическую кровь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Верещагин Н. В., Пирадов М. А. Инсульт: оценка проблемы // Неврол. журн. — 1999. — № 5. — С. 4—7.
2. Виленский Б. С. Инсульт. — СПб., 1995.
3. Виленский Б. С. Осложнения инсульта: профилактика и лечение. — СПб., 2000.
4. Воробьев А. А., Абакумова Ю. В. Роль вирусно-герпетической инфекции в развитии атеросклероза: клинические, вирусологические, иммунологические доказательства // Вестн. РАМН. — 2003. — № 4. — С. 3—9.
5. Грин А. Г., Букринская В. Г. Руководство к практическим занятиям по лабораторной диагностике вирусной инфекции. — Киев, 1992.

6. Ерохина Г. Р. Особенности иммунного статуса больных ишемическим инсультом // Здравоохр. Таджикистана. — 1987. — № 6. — С. 32—35.
7. Коротьев А. И., Бабичев С. А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. — СПб., 1998.
8. Косицын Н. С., Макаренко А. Н., Пасикова Н. В. и др. Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга // Журн. высш. нервн. деят. — 2002. — № 6. — С. 765—768.
9. Крыжановский Г. Н., Магаева С. В., Макаров С. В. Нейроиммунология. — М., 1997.
10. Макаренко А. Н., Кульчиков А. Е., Григорьева Т. Н. и др. Развитие энцефалита при моделировании острого геморрагического инсульта — ранее не описанный вариант соматического осложнения // Пат. физиол. — 2007. — № 4. — С. 25—27.
11. Малахия Ю. А., Надарешвили З. Г., Малахия Н. Ю. Мозг как орган иммунитета // Журн. невропатол. и психиатр. — 1999. — № 9. — С. 62—65.
12. Молчанов В. В., Панов М. В., Серова Г. А. Иммунологическая реактивность в остром периоде инсульта // Журн. невропатол. и психиатр. — 1980. — № 7. — С. 981—986.
13. Хроническое влияние малых доз облучения на нервную систему. Экспериментальные исследования и клинические наблюдения / Зозуля Ю. П., Атаманюк Н. А., Барабой В. А. и др. — Киев, 1998.
14. Espinola-Klein C., Rupprecht H. J., Blankenberg S. et al. Stroke induced immunodeficiency in patients // Stroke. — 2000. — Vol. 9, N 31. — P. 2127—2133.
15. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. — National Academy Press, Washington, 1996.
16. Mc Kenzie Joasso A. Stress and immune response in rats // Int. Arch. Allergy. — 1976. — Vol. 50. — P. 659—663.
17. Melnick J. L., Petrie B., Dreesman G. Herpes virus and cholesterol-induced diseases // Lancet. — 1983. — Vol. 2, N 8351. — P. 644—647.
18. Quereda C., Cjrra I., Laguna F. et al. Diagnostic utility of a multiplex herpes virus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders // J. Clin. Microbiol. — 2000. — Vol. 38, N 8. — P. 3061—3067.

Поступила 09.10.08

© О. Ю. ЛИМАНСКАЯ, А. П. ЛИМАНСКИЙ, 2009
УДК 578.828.1:578.3].083.2

Посвящается памяти директора Института экспериментальной и клинической ветеринарной медицины Украинской аграрной академии наук, доктора вет. наук, профессора, академика УААН Фукс Полины Павловны

О. Ю. Лиманская^{1, 2}, А. П. Лиманский¹

Распределение потенциальных шпилечных структур в геноме ретровирусов крупного рогатого скота

¹ГУ Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова АМН Украины, ²Национальный научный центр "Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины", Харьков

Определены инвертированные повторы, которые могут образовывать шпилечные (в геномной РНК) и крестообразные структуры (в провирусной ДНК) вирусов лейкоза (ВЛ) и иммунодефицита (ВИ) крупного рогатого скота (КРС). Созданы карты локализации шпилек (которые являются одной из цепей сигнальных механизмов функционирования генома) на геноме вирусов. Показано, что ретровирусы КРС — ВЛ КРС и ВИ КРС, имеющие длину геномов около 8,5 тыс. п. н., характеризуются различным количественным и качественным составом шпилечных структур. В геноме ВЛ КРС найдено 7 шпилек с энергией ($-\Delta G$) свыше 10 ккал/моль, в геноме ВИ КРС — 18. Кроме того, в геноме ВИ КРС локализованы 3 термодинамически стабильные (т. е. детектируемые на модельных системах в экспериментах *in vitro*) шпильки (размер петли которых не превышает 6 нуклеотидов), 2 из которых являются совершенными. Однако в геноме ВЛ КРС термодинамически стабильные шпильки не обнаружены.

Ключевые слова: вирус лейкоза крупного рогатого скота, вирус иммунодефицита крупного рогатого скота, шпилечная структура (шпилька), крестообразная структура (крест), инвертированный повтор, атомно-силовая микроскопия

Авторы. О. Ю. Лиманская, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., вед. науч. сотр. E-mail:olga.limanskay@mail.ru. А. П. Лиманский, доктор биол. наук, ст. науч. сотр., вед. науч. сотр.

Distribution of potentially hairpin-loop structures in the genome of bovine retroviruses

O. Yu. Limanskaya^{1,2}, A. P. Limansky¹

¹I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine
²National Research Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkov, Ukraine

Inverted repeats which can form hairpin-loop structures in the genomic RNA and cruciform structures in the proviral DNA of bovine leukemia virus (BLV) and bovine immunodeficiency virus (BIV) have been determined. Localization diagrams have been made up for hairpins (one of the elements of signaling genome function). The retroviruses BLV and BIV, about 8.5 kbp in length, are characterized by the varying quantitative and qualitative composition of hairpin-loop structures. The BLV and BIV genomes have been found to have 7 and 18 hairpins with energy ($-\Delta G$) of more than 10 kcal/mol, respectively. Furthermore, in the BIV genome, there are 3 thermodynamically stable (i.e. detectable on model systems *in vitro*) hairpins (with the loop up to 6 nucleotides), two of them are perfect. But thermodynamically stable hairpins have not been found in the BLV genome.

Key words: bovine leukemia virus, bovine immunodeficiency virus, hairpin-loop structure, cruciform structure, inverted repeat, atomic force microscopy

Даже через 50 с лишним лет после открытия молекулы ДНК внимание широкого круга исследователей приковано к структуре этой молекулы. Огромный интерес ученых и актуальность таких исследований обусловлены как ролью, которую играет ДНК в важнейших биологических процессах, так и возможностью получения принципиально новой информации посредством разработки новейших технологий и методов исследований. Завершенные проекты по секвенированию генома человека, значительного количества вирусов и бактерий предоставили обширную информацию для исследователей, однако для использования этого огромного массива данных необходимо продолжать разработку методологии для анализа ДНК, в том числе для изучения структурной организации ДНК с использованием современных подходов.

В настоящее время основные усилия ученых, работающих в области геномики (раздел биоинформатики, предметом которого является моделирование и исследование способов хранения информации о строении компонентов биосистемы), направлены на разработку эффективных средств анализа генетических "текстов" — последовательностей нуклеотидов (н.) генома живой материи. Компьютерный анализ является важным методом исследования ДНК. Анализ генетического текста предполагает установление возможных функций разных фрагментов последовательности ДНК: поиск генов, регуляторных сайтов и т. д.

Известно, что функционирование каждого гена регулируется многими факторами. Незначительное количество (по сравнению с общим числом генов) регуляторных факторов может обеспечить регуляцию значительного количества генов. В секвенированных последовательностях геномов эукариот и прокариот находится большой объем информации, связанной с их молекулярной генетикой. Для получения этой информации разрабатываются подходы для решения разнообразных задач геномики. Достаточно большое внимание уделяется поиску повторов, поскольку повторы разного типа составляют значительную часть генома. Например, в геноме человека повторы составляют свыше 50%. Некоторые классы повторов играют важную структурную и функциональную роль [13].

Неканонические структуры, которые образуются повторами в молекуле ДНК, являются горячими точками геномной нестабильности живых организмов. Эта их особенность обусловлена возможностью образования трехцепочечных структур (триплексов, или Н-ДНК), шпилечных (в одно цепочеч-

ном состоянии) и крестообразных (в двухцепочечном состоянии) структур при различных генетических процессах. ДНК-повторы (прямые, инвертированные и зеркальные в одной цепи ДНК), широко представленные в геноме, могут приводить к мутагенезу и значительным геномным перестройкам. Показано, что инвертированные повторы блокируют репликацию ДНК *in vitro* [6, 9, 10, 18, 20], а также могут быть сайтами остановки и последующей диссоциации РНК-полимеразы в области терминации транскрипции [12].

Ранее для 2 изолятов медленно растущих микобактерий туберкулеза с полностью секвенированным геномом H37Rv и CDC1551 определено распределение термодинамически стабильных (т. е. детектируемых на модельных системах в экспериментах *in vitro*) совершенных инвертированных повторов [5]. Несмотря на высокую степень гомологии (свыше 90%) генома этих изолятов микобактерий, они характеризуются разным уровнем вирулентности: H37Rv является лабораторным штаммом, а клинический изолят CDC1551 имеет высокий уровень вирулентности. Нами было показано, что оба изолята содержат по 8 длинных инвертированных повтора длиной 48—62 нуклеотида, из которых 6 шпилек полностью совпадают. В то же время в геноме CDC1551, в отличие от H37Rv, на 5'-конце локализована высокостабильная шпилька длиной 58 нуклеотидов [5]. Предполагается, что локализация высокостабильной шпилеки с энергией $\Delta G = -53,9$ ккал/моль в области 5'-конца ДНК изолята CDC1551 может приводить к разной степени стабилизации РНК-транскриптов или разной эффективности терминации транскрипции РНК-полимеразы штамма CDC1551 по сравнению с изолятом H37Rv. Это в свою очередь, несмотря на то что физические карты геномов для двух изолятов подобны, может служить одной из причин разной вирулентности штаммов.

Несмотря на достаточно интенсивное изучение локализации палиндромов (фрагментов ДНК, образованных симметрично расположенными инвертированными повторами) в геноме разных организмов, роль и распределение шпилечных структур в геноме многочисленных вирусов и бактерий остаются невыясненными. Исходя из этого, нами проведен поиск потенциальных шпилечных структур в геноме ретровируса — вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛ КРС) и вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (ВИ КРС). ВИ КРС является лентивирусом, который инфицирует крупный рогатый скот и вызывает заболевание, по-

Таблица 1

Совершенные (сов) и несовершенные (несов) шпильчатые структуры, которые могут быть образованы инвертированными повторами в провирусной ДНК и геномной РНК вируса лейкоза крупного рогатого скота (номер AF 033818 для базы данных GenBank)

Длина стебля, п. н.	Длина петли, нуклеотиды	Энергия (-ΔG), ккал/моль	Положение на геноме	Ген	Тип повтора
6	17	-10,1	370—400	<i>LTR</i>	сов-1
9	83	-13	687—787	<i>gag</i>	сов-1
11	23	-13,9	1340—1383	<i>gag</i>	несов-1
9	28	-14,1	1487—1532	<i>gag</i>	несов-1
8	57	-10,6	1987—2059	<i>prot</i>	сов-1
9	25	-14,6	2139—2181	<i>pol</i>	сов-1
13	36	-13,2	2529—2590	<i>pol</i>	несов-1

Примечание. Здесь и в табл. 2 повторы несов-1 (сов-1) соответствуют шпилькам со значением энергии (ΔG) свыше 10 ккал/моль.

добное СПИДу, после вариабельной асимптоматической фазы [8]. ВЛ КРС, другой распространенный ретровирус, ассоциирован с летальной формой лейкемии и персистирующим лимфоцитозом [7].

В данной работе с помощью компьютерного анализа найдено распределение термодинамически стабильных совершенных и несовершенных инвертированных повторов в геноме ВЛ КРС и ВИ КРС и представлены физические карты генома вирусов с локализованными шпильчатыми структурами. На основе анализа созданных карт локализации потенциальных шпильчатых структур показано, что распределения инвертированных повторов в геномах ВЛ КРС и ВИ КРС отличаются качественно и количественно.

Материалы и методы

Компьютерный анализ. В работе использованы последовательности полностью секвенированных изолятов ВЛ КРС (номер AF 033818 для базы данных GenBank, длина 8419 пар нуклеотидов, — п. н.), ВИ КРС (номер M32690, длина 8482 п. н.), а также плазмиды pGEMEX (номер X65317, длина 3993 п. н.). Для поиска шпильчатых структур и определения их параметров использовали программу RNA 2 пакета GeneVee [1]. Изоляты ВЛ КРС и ВИ КРС были проанализированы на наличие совершенных и несовершенных (имеющих неспаренные нуклеотиды) шпильек.

Атомно-силовая микроскопия. В работе использовали атомно-силовой микроскоп (АСМ) Nano-

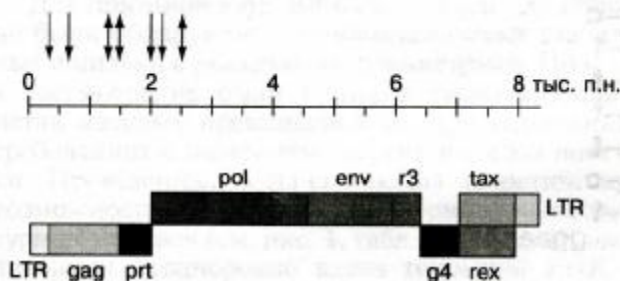


Рис. 1. Физическая карта вируса лейкоза крупного рогатого скота с приведенными позициями известных генов. ↔, ← — совершенные и несовершенные шпильчатые структуры с энергией свыше 10 ккал/моль.

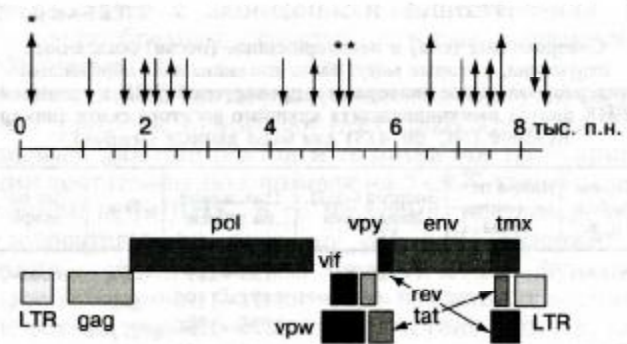


Рис. 2. Физическая карта вируса иммунодефицита крупного рогатого скота с приведенными позициями известных генов. Гены *env* и *tat* состоят из двух кодирующих областей. Первый кодирующий экзон гена *env* и кодирующая область гена *tmx* имеют такую же рамку считывания, как и ген *env*. Кодирующие области генома вируса показаны тремя горизонтальными линиями, соответствующими различным рамкам считывания. Стрелками показаны позиции шпильчатых структур. ↔, ← — несовершенные шпильки с энергией свыше 10 и 15 ккал/моль соответственно.

Звездочкой отмечены позиции термодинамически стабильных шпильек, размер петли которых не превышает 6 нуклеотидов.

scope IV MultiMode System (Veeco Instruments Inc., США) с E-сканером. АСМ-изображения ДНК были записаны с помощью вибрирующего варианта АСМ в воздухе в режиме "высота" с использованием стандартных кантилеверов от ЗАО "НТ-МДТ" (Россия) с резонансной частотой 300—360 кГц. Изображения получены в формате 512 × 512 пикселей, сглажены и проанализированы с помощью программного обеспечения Nanoscope (версия 5.12г3; "Veeco Instruments Inc.", США). Подготовку образца осуществляли в соответствии с ранее приведенной методикой [4].

Результаты

Известно, что крестообразные структуры могут быть включены в промоторы и терминаторы транскрипции — наличие крестов является сигналом для остановки РНК-полимеразы, терминации синтеза РНК-транскриптов с последующей диссоциацией элонгационного комплекса РНК-полимераза — ДНК — РНК-транскрипт [17]. Одним из таких терминаторов транскрипции для Т7 РНК-полимеразы является область терминации транскрипции плазмиды pGEMEX внутренний терминатор транскрипции длиной ~90 п. н., эффективность которого составляет 70—80% [16]. Проанализировав область терминации транскрипции ДНК pGEMEX на наличие термодинамически стабильных инвертированных повторов, мы нашли несовершенный инвертированный повтор длиной 28 п. н., свободная энергия которого (-ΔG) составляет 11,2 ккал/моль. Существование терминации транскрипции Т7 РНК-полимеразы при элонгации транскрипции на матрице ДНК pGEMEX, содержащей данный инвертированный повтор в области терминатора, было ранее продемонстрировано *in vitro* [3]. Поэтому, исходя из параметров шпильки ДНК pGEMEX и данных литературы относительно параметров шпильек крестообразных структур, наблюдаемых в экспериментах *in vivo* [14] и *in vitro* [15], для дальнейшего анализа были выбраны шпильки, длина петли которых не превышала, как правило, 6 нуклеотидов, минимальная длина стебля шпильки составля-

Таблица 2

Совершенные (сов) и несовершенные (несов) шпилечные структуры, которые могут быть потенциально образованы инвертированными повторами в провирусной ДНК и геномной РНК вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (номер M32690 (NC_001413) для базы данных GenBank)

Длина стебля, п. н.	Длина петли, нуклеотиды	Энергия (-ΔG), ккал/моль	Положение на геноме	Ген	Тип повтора
15	3	-19,8	158—189	<i>LTR</i>	несов-2
6	14	-9,7	1171—1196	<i>gag</i>	сов-1
6	43	-9,9	1726—1780	<i>gag, pol</i>	сов-1
15	13	-10,7	1937—1979	<i>pol</i>	несов-1
6	14	-10,4	2090—2115	<i>pol</i>	сов-1
14	14	-14,8	2426—2468	<i>pol</i>	несов-1
9	57	-10,8	2756—2830	<i>pol</i>	сов-1
10	40	-10	4240—4299	<i>pol</i>	сов-1
10	32	-12,3	4762—4813	—	несов-1
9	4	-10,1	5243—5264	<i>vif</i>	сов-1
10	6	-11,7	5284—5309	<i>vif</i>	сов-1
18	24	-15,4	6604—6661	<i>env</i>	несов-2
8	49	-12,1	7106—7170	<i>env</i>	сов-1
19	27	-10,7	7331—7394	<i>env</i>	несов-1
12	38	-11	7615—7675	<i>env</i>	несов-1
12	113	-18,5	7745—7882	<i>env</i>	несов-2
7	23	-10,1	8404—8440	<i>LTR</i>	сов-1
12	8	-12,2	8441—8472	<i>LTR</i>	несов-1

Примечание. Повторы несов-2 соответствуют шпилькам со значением энергии (-ΔG) свыше 10 и 15 ккал/моль соответственно. Выделены позиции термодинамически стабильных шпилек, размер петли которых не превышает 6 нуклеотидов.

ла 6 п. н., а минимальная энергия (-ΔG) — ~10 ккал/моль.

На основе определенных потенциальных шпилек в геноме ВЛ КРС (табл. 1) была построена диаграмма их распределения на физической карте генома ВЛ КРС (рис. 1). Длина высокостабильных шпилек в геноме ВЛ КРС варьирует от 101 до

29 нуклеотидов, а энергия — от -14,6 до -10,1 ккал/моль. Преобладающее большинство определенных шпилечных структур на физической карте ВЛ КРС (5 шпилек из 7) локализовано в области генов *gag* (3 шпильки) и *pol* (2 шпильки).

Все проанализированные повторы были распределены на 2 вида — совершенные и несовершенные (стебель которых содержит некомплементарные нуклеотиды или делеции нуклеотидов в одной из цепей стебля шпильки). Кроме того, повторы дифференцировали на 2 группы по уровню энергии. Первую группу составляли повторы с энергией (-ΔG) 10—15 ккал/моль, а вторую — с энергией (-ΔG) 15—20 ккал/моль.

Аналогичным образом были получены диаграммы распределения (рис. 2) и параметры шпилькообразных структур (табл. 2) для ВИ КРС. Последовательность и вторичная структура двух найденных в геноме ВИ КРС совершенных инвертированных повторов, энергия которых (-ΔG) составляет около 11 ккал/моль, приведены на рис. 3. Длина высокостабильных шпилек в геноме ВИ КРС варьирует от 137 до 26 нуклеотидов, а энергия от -19,8 до -9,7 ккал/моль. При этом шпильки однородно распределены в геноме ВИ КРС — гены *gag*, *pol*, *env* содержат соответственно 2, 5 и 5 шпилечных структур, а 5'-*LTR* и 3'-*LTR* также имеют 1 и 2 инвертированных повтора соответственно.

Обсуждение

Отметим, что структура шпильки, которую определяют с помощью компьютерного анализа, существенным образом зависит от используемого алгоритма поиска, а также от параметров шпильки. Поэтому мы сосредоточили основное внимание на поиске термодинамически стабильных совершенных и несовершенных повторов, т. е. тех, которые

а



5'cttgggtggcgatgat|aatgttggccacagccca aagaaagctttggaggaaagccaatt|ggctggcttttctggaac3'

б

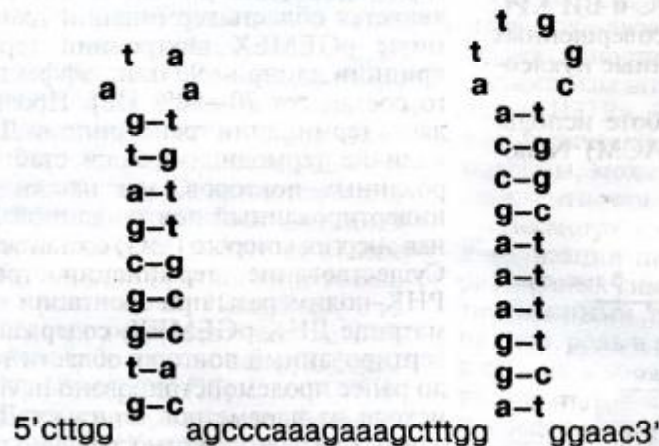


Рис. 3. Вторичная структура, которая образуется инвертированными повторами во фрагментах вируса иммунодефицита крупного рогатого скота. Выделены комплементарные последовательности. а — 2 совершенных инвертированных повтора длиной 22 и 26 нуклеотидов. Вертикальные линии указывают на их центры симметрии, а стрелки — на их ориентацию; б — шпилечные структуры, соответствующие инвертированным повторам № 10 и № 11, параметры которых приведены в табл. 2.

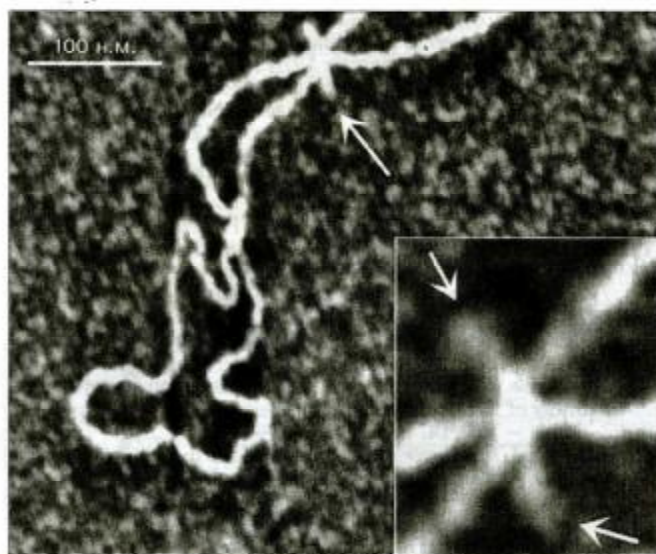


Рис. 4. АСМ-изображение суперспиральной плазмиды pUC8 в воздухе. Размер кадра 372 × 372 нм. Стрелками показаны 2 шпильки, которые образовали крестообразную структуру. Размер вставки с увеличенным изображением шпилек 55 × 62 нм.

реально наблюдали в предыдущих экспериментах. Исходя из этого, первоначально мы не рассматривали несовершенные повторы, в которых было больше 2 пар неспаренных нуклеотидов, а размер петли превышал 6 нуклеотидов. Примером такой термодинамически стабильной шпильки является крестообразная структура, образованная двумя шпилечными структурами в суперспиральной плазмиде pUC8 (рис. 4). Плазмида pUC8 содержит несколько инвертированных повторов, которые могут образовывать крестообразные структуры. Свободная энергия ΔG наиболее стабильной из них (показана стрелками на рис. 4) составляет $-17,8$ ккал/моль, стебель шпильки образуют 11 пар нуклеотидов, а петля имеет длину 4 нуклеотида. Однако в программе RNA2 пакета GeneBee, которую мы использовали для поиска вторичной структуры РНК ретровирусов КРС, пара G—T не учитывается как некомплементарная. Действительно, образование не уотсон-криковской пары G—T становится возможным за счет формирования редких таутомерных енольных и иминоформ нуклеотидов [2].

Приведенное АСМ-изображение крестообразной структуры ДНК pUC8 показывает, что среди нескольких палиндромов, содержащихся в ДНК pUC8, в условиях *in vitro* реализуется только одна крестообразная структура, термодинамически наиболее стабильная.

Для геномной РНК ВЛ КРС в результате поиска не были обнаружены термодинамически стабильные шпильки с указанными параметрами. Поэтому в рассмотрение были приняты шпильки, длина петли которых превышала 6 н., при неизменных требованиях к значениям энергии и стебля шпильки. Проведенный анализ показал теоретическую возможность образования 7 консервативных структурных мотивов (см. рис. 1, табл. 1), которые локализованы неоднородно вдоль геномной РНК — шпильки были выявлены только для генов *gag*, *prot*, *pol*, а также 5'-LTR.

Анализ полной последовательности геномной РНК другого ретровируса КРС — ВИ КРС — сви-

детельствует о возможности существования 18 шпилькообразных структур, которые равномерно расположены по всему геному.

Созданные карты распределения инвертированных повторов поднимают несколько вопросов. Во-первых, для инициации и терминации транскрипции достаточно двух шпилек на 5'- и 3'-концах матричной цепи ДНК. В то же время, например, последовательность гена *gag* ВИ КРС содержит 6 шпилек. Следовательно биологическая функция преобладающего большинства найденных шпилек не определена. Во-вторых, отсутствие шпилек, например, на 5'-конце ряда генов (например, гена *env* ВЛ КРС (см. рис. 1) и ВИ КРС (см. рис. 2)), свидетельствует о том, что наряду со шпильками другие неканонические структуры ДНК (в частности триплексы) могут выступать сигналами для переключения и связывания ферментов. В-третьих, ретровирусы КРС различаются не только качественным характером распределения шпилек, но и их количественными параметрами. Например, в геноме ВИ КРС содержатся 3 термодинамически стабильных повтора с длиной петли до 6 н., в то время как длина петель шпилек в геноме ВЛ КРС составляет не менее 17 н. Отметим также наличие значительно более высокостабильной шпильки в области 5'-LTR для ВИ КРС (см. позицию 1 в табл. 2) в отличие от шпильки в геноме ВЛ КРС (см. позицию 1 в табл. 1). Эти факты свидетельствуют о возможности использования распределения инвертированных повторов для структурной дифференциации вирусов.

Таким образом, проведенный компьютерный анализ изолятов ВЛ КРС и ВИ КРС показал, что основными сайтами локализации шпилек в геноме ВЛ КРС являются гены *gag* и *pol*, в то время как в геноме ВИ КРС шпильки распределены равномерно по всему геному и присутствуют в кодирующих и регуляторных генах. Распределения шпилек в геноме ретровирусов КРС различаются качественно, а параметры шпилек, найденных в геноме ВЛ КРС и ВИ КРС, различаются количественно. Сравнение распределений шпилечных структур может служить еще одним инструментом (наряду с филогенетическим анализом) исследования эволюционных взаимоотношений и геномной организации не только ретровирусов КРС, но и представителей других видов. Кроме того, полученные карты распределения шпилек могут быть важными для дальнейшего исследования молекулярных механизмов и регуляторной роли таких альтернативных структур, как шпилечные и крестообразные структуры, которые интенсивно обсуждают в литературе [11, 19].

Работа частично поддержана грантом АМН 72/2007 от Академии медицинских наук Украины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бродский Л. И., Драчев А. Л., Татузов Р. Л., Чумаков К. М. Пакет прикладных программ для анализа последовательностей биополимеров: GeneBee // Биополимеры и клетка. — 1991. — Т. 7, № 1. — С. 10—14.
2. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. — М., 1987.
3. Лиманская О. Ю., Лиманский А. П. Визуализация элонгационных комплексов Т7 РНК-полимеразы с помощью атомно-силовой микроскопии // Молекул. биол. — 2008. — Т. 42, № 3. — С. 533—542.

4. Лиманский А. П. Визуализация крестообразной структуры суперспиральной ДНК посредством атомно-силовой микроскопии // Биофизика. — 2000. — Т. 45, № 6. — С. 1039—1043.
5. Лиманский А. П., Лиманская О. Ю., Волянский Ю. Л. Компьютерный анализ инвертированных повторов в геноме микробактерий туберкулеза // Журн. микробиол. — 2004. — № 5. — С. 48—52.
6. Chatberg M. D., Englund P. T. The effect of template secondary structure on vaccinia DNA polymerase // J. Biol. Chem. — 1979. — Vol. 254. — P. 7820—7826.
7. Gillet N., Florins A., Boxus M. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human // Retrovirology. — 2007. — Vol. 4, N 18. — P. 1—32.
8. Gonda M., Luther D., Fong S., Tobin J. Bovine immunodeficiency virus: molecular biology and virus-host interactions // Virus Res. — 1994. — Vol. 32, N 2. — P. 155—181.
9. Kaguni L. S., Clayton D. A. Template-directed pausing in *in vitro* DNA synthesis by DNA polymerase α from *Drosophila melanogaster* embryos // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1982. — Vol. 79, N 4. — P. 983—987.
10. Kang S., Ohshima K., Shimizu M. et al. Pausing of DNA synthesis *in vitro* at specific loci in CTG and CGG triplet repeats from human hereditary disease genes // J. Biol. Chem. — 1995. — Vol. 270, N 45. — P. 27014—27021.
11. Kim E., Peng H., Esparza F. et al. Cruciform-extruding regulatory element controls cell-specific activity of the tyrosine hydroxylase gene promoter // Nucl. Acids Res. — 1998. — Vol. 26, N 7. — P. 1793—1800.
12. Komissarova N., Kashlev M. Transcriptional arrest: Escherichia coli RNA polymerase translocates backward, leaving the 3' end of the RNA intact and extruded // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 94, N 5. — P. 1755—1760.
13. Palecek E. Local supercoil-stabilized DNA structures // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. — 1991. — Vol. 26, N 2. — P. 151—226.
14. Panayotatos N., Fontaine A. A native cruciform DNA structure probed in bacteria by recombinant T7 endonuclease // J. Biol. Chem. — 1987. — Vol. 262, N 23. — P. 11364—11368.
15. Panyutin I., Klishko V., Lyamichev V. Kinetics of cruciform formation and stability of cruciform structure in superhelical DNA // J. Biomol. Struct. Dyn. — 1984. — Vol. 1, N 4. — P. 1311—1324.
16. pGEMEX-1 and pGEMEX-2 vectors // Techn. Bull., Promega. — 2000. — N 253. — P. 1—13.
17. Santangelo T., Roberts J. Forward translocation is the natural pathway of RNA release at an intrinsic terminator // Mol. Cell. — 2004. — Vol. 14, N 1. — P. 117—126.
18. Sherman L. A., Getter M. L. Studies of the mechanism of enzymatic DNA elongation by Escherichia coli DNA polymerase II // J. Mol. Biol. — 1976. — Vol. 103. — P. 61—76.
19. Voineagu I., Narayanan V., Lobachev K., Mirkin S. Replication stalling at unstable inverted repeats: interplay between DNA hairpins and fork stabilizing proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — Vol. 105, N 29. — P. 9936—9941.
20. Weaver D. T., DePamphilis M. L. Specific sequences in native DNA that arrest synthesis by DNA polymerase alpha // J. Biol. Chem. — 1982. — Vol. 257, N 4. — P. 2075—2086.

Поступила 20.11.08

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009
УДК 616.98:578.827.11-076.5

В. А. Яковлева¹, Ф. В. Лисицын², А. А. Манькин², Т. А. Коньшева¹

Использование атомно-силовой микроскопии для исследования цитоморфологических признаков папилломавирусной инфекции

¹Медсанчасть № 170, г. Королев Московской области; ²ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва

Представлены результаты исследования клеток плоского эпителия гениталий пациенток, инфицированных вирусом папилломы человека, цитологическим методом и методом атомно-силовой микроскопии. Проведено сравнительное изучение клеток плоского эпителия: без признаков патологии, с цитоморфологическими признаками папилломавирусной инфекции (койлоцитоз, дискератоз, паракератоз, гиперкератоз). При исследовании поверхности клеток плоского эпителия получены количественные характеристики изменений поверхности под влиянием инфекции.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, цитологическая диагностика, атомно-силовая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия

Use of atomic force microscopy to study the cytomorphological signs of papillomavirus infection

V. A. Yakovleva¹, F. V. Lisitsyn², A. A. Manykin², T. A. Konysheva¹

¹Medical Sanitary Unit No. 170, Korolev, Moscow Region; ²D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Moscow

The paper presents the results of studying genital squamous epitheliocytes from human papillomavirus-infected female patients by cytology and atomic force microscopy. The squamous epitheliocytes with and without cytomorphological signs of papillomavirus infection (koilocytosis, dyskeratosis, parakeratosis, hyperkeratosis) have been compared. Examining the surface of the squamous epithelium has yielded quantitative characteristics of infection-induced surface changes.

Key words: human papillomavirus, cytological diagnosis, atomic force microscopy, scanning electronic microscopy

Актуальность изучения папилломавирусной инфекции (ПВИ), как было показано Х. Цур Хаузом, заключается в том, что при определенных условиях она приводит к образованию опухоли — раку шейки матки.

С 2002 г. в связи с выявлением большого разнообразия вирусных типов папилломавирусы были выделены в отдельное семейство Papillomaviridae, состоящее из 16 родов [3]. Инфицируя кожу или слизистые оболочки человека, вирус папилломы

Авторы. В. А. Яковлева, врач высшей категории клинической лабораторной диагностики. Тел.: 8-916-165-30-12. Ф. В. Лисицын, научный сотр. лаборатории. А. А. Манькин, вед. научный сотр. лаборатории. E-mail: an_manykin@mail.ru. Т. А. Коньшева, зав. гинекологического отделения, врач высшей категории